

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



TITULO:

Administración de progesterona de acción prolongada después de la fertilización en ovinos superovulados, y su relación con el tamaño de cuerpos lúteos y embriones

Tesis previa a la obtención del título de Médica Veterinaria Zootecnista

AUTORES: Mariana Gabriela González Rosales
Sofía Margarita Quezada Moscoso

DIRECTOR: Dr. Fernando Pedro Perea Ganchou PhD

CO-DIRECTOR: Dr. Diego Andrés Galarza Lucero Mg Sc.

CUENCA

2016



RESUMEN

Se evaluó el efecto de la progesterona de corta y larga acción en el metaestro ovino temprano, sobre el tamaño y número de cuerpos lúteos (CL), progesterona, cortisol y número de embriones al día 13 post servicio. El estudio se realizó en la granja Irquis de la Universidad de Cuenca con 21 ovejas Corriedale, sometidas a sincronización del celo con una esponja vaginal de P4 y estimulación ovárica usando gonadotropina coriónica equina (Folligon ®) y hormona folículo estimulante (Folltropin ®). Luego del celo las ovejas fueron inseminadas (IA) y distribuidas aleatoriamente en tres grupos: (T1; n=7) control; (T2; n=7) 6 mg de P4 (Progestar ®) los días 2, 3 y 4 post-IA, y (T3; n=7) 18 mg de P4 de acción prolongada (Progesterona MAD-4 ®) el día 2 post IA. Se evaluó P4 y cortisol (ng/g) en heces los días 2, 3, 4 y 5 post-IA. El tamaño (mm), número de CL y embriones se determinó por cirugía abdominal los días 7 y 13, y se midió P4 (ng/ml) sérica el día 13. Se usó un diseño de bloques al azar para el análisis de los datos. No hubo diferencias estadísticas entre tratamientos en ninguna de las variables estudiadas. Tampoco se lograron recuperar embriones. En conclusión, la P4 de corta y larga acción aplicada en el metaestro temprano no afectó el tamaño, número de CL, P4 sérica; tampoco afectó la concentración de P4 ni de cortisol en heces.

PALABRAS CLAVE:

OVEJAS, PROGESTERONA, METAESTRO, CUERPO LÚTEO, EMBRIONES, CORTISOL



ABSTRACT

The effect of short- and long-acting progesterone (P4) in early ovine metaestrous upon the size and number of corpus luteum (CL), progesterone and cortisol concentration, and number of embryos recovery at days 7 and 13 post-artificial insemination (AI) were analyzed. The study was carried out in Irquis livestock farm owned by University of Cuenca with 21 Corriedale ewes, which were submitted to estrous synchronization with P4 intravaginal devices and ovary stimulation with equine chorionic gonadotropin (Folligon ®) and follicle-stimulating hormone (Folltropin ®). After estrus, ewes were inseminated and randomized assigned to one of the following treatments: (T1; n=7) control; (T2; n=7) 6 mg of P4 (Progester ®) on days 2, 3 y 4 post-IA, and (T3; n=7) 18 mg of long-acting P4 (Progesterone MAD-4 ®) on day 2 post-IA. Fecal P4 and cortisol were also assessed on days 2, 3, 4 and 5 post-AI. The size and number of the CL and embryos were performed by mid-ventral laparotomy on days 7 and 13; and also blood samples for P4 concentration determination were collected on day 13. A randomized block design was used to analysis of data. No statistics differences between treatments were found. Also, no embryos were recovered in any experimental group. In conclusion, the short- and long-acting P4 applied in early metaestrous did not affect the size and number of CL, serum P4 concentration, also, did not affect the concentration of P4 and cortisol in feces.

KEYWORDS:

SHEEP, PROGESTERONE, METAESTROUS, CORPUS LUTEUM, EMBRYO, CORTISOL.



INDICE

RESUMEN.....	2
ABSTRACT	3
INDICE	4
AGRADECIMIENTO.....	11
DEDICATORIA.....	13
CAPITULO I: INTRODUCCIÓN.....	19
Objetivo General	21
Objetivos Específicos	21
HIPÓTESIS	21
CAPITULO II: REVISIÓN DE LITERATURA	22
2.1. Generalidades	22
2.2. Fisiología reproductiva de la oveja	22
2.2.1. Pubertad	22
2.2.2. Estacionalidad.....	23
2.2.3. Control fisiológico del fotoperiodo.....	24
2.2.4. Control hormonal del ciclo estral.....	25
2.2.5. Características del ciclo estral	26
2.2.6. Ovulación.....	28
2.2.7. Cuerpo lúteo	28
2.3. Fecundación.....	30
2.3.1. Etapas de la fecundación:.....	30
2.3.2. Estadios de la fecundación	31
2.4. Desarrollo embrionario y evaluación morfológica.....	32
2.4.1. Desarrollo embrionario.....	32
2.4.2. Clasificación de los embriones.....	33



2.5.	Implantación embrionaria	34
2.6.	Mortalidad y supervivencia embrionaria	35
2.7.	Flushing.....	36
2.8.	Sincronización de celo.....	36
2.8.1.	Métodos de sincronización	37
2.9.	Superovulación.....	38
2.9.1.	Hormonas utilizadas en la Superovulación	38
2.10.	Inseminación Artificial.....	39
2.10.1.	Inseminación artificial transcervical en ovinos	40
2.11.	Progesterona.....	41
2.11.2.	Acción de la P4 en el útero	43
2.12.	Histotrofo.....	45
2.13.	Interferón TAU.....	45
2.14.	Estrés.....	46
2.15.	Cortisol.....	47
CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS.....		49
3.1.	Materiales.....	49
3.2.	Método	50
3.2.1.	Área de Estudio	50
3.2.2.	Unidad de análisis.....	51
3.3.	Metodología.....	52
3.3.1.	Selección de animales	52
3.3.2.	Adaptación	52
3.3.3.	Preparación.....	53
3.3.4.	Sincronización de celo y superovulación	53
3.3.5.	Colección del semen.....	55



3.3.6. Inseminación Artificial	56
3.3.7. Aplicación de progesterona exógena.....	56
3.3.8. Recolección de muestras de heces	57
3.3.9. Medición de Cuerpo Lúteo y Colecta de embriones	58
3.3.10. Deshidratación de las muestras de heces	59
3.3.11. Extracción de Lípidos.....	59
3.3.12. Variables en estudio	60
3.3.13. Operacionalización de las variables.....	61
3.3.14. Diseño experimental y pruebas estadísticas.....	62
CAPITULO IV: RESULTADOS	63
4.1. Progesterona día 13.....	63
4.2. Número y tamaño de cuerpos lúteos.....	65
4.3. Cortisol en heces.....	71
4.4. Progesterona en heces	74
4.5. Número y tamaño de embriones	76
CAPITULO V: DISCUSIÓN	77
CAPITULO VI: CONCLUSIONES.....	83
RECOMENDACIONES	83
BIBLIOGRAFÍA.....	84
ANEXOS.....	96



INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Regulación de la estacionalidad reproductiva de las ovejas.....	25
Figura 2. Efecto del fotoperiodo en el ciclo estral	26
Figura 3. Control neuroendocrino de la reproducción.....	27
Figura 4. Colocación y retiro de esponjas durante el tratamiento de sincronización de celos.....	39
Figura 5. Inseminación transcervical	42
Figura 6: Niveles de progesterona en los días del ciclo estral.....	43
Figura 7. Sitios del eje hipotálamo – hipófisis – gónadas (HHG) en donde el estrés afecta negativamente a la secreción de GnRH, gonadotropinas y esteroides sexuales.	49
Figura 8. Hacienda Irquis.....	51
Figura 9. Protocolo de superovulación con eCG	55
Figura 10. Protocolo de superovulación con FSH.....	56
Figura 11. Tratamiento control.....	57
Figura 12. Tratamiento N° 2: aplicación de P ₄ corta acción en el día 2, 3 y 4 post inseminación	58
Figura 13. Tratamiento N° 3: aplicación de P ₄ MAD – 4 de larga acción en el día 2 post inseminación.....	58
Figura 14. Valores promedios del nivel de progesterona sérica en ng/ml del día 13 por tratamientos	65
Figura 15. Valores promedios del número de CL por tratamientos al día 7	67
Figura 16. Valores promedios del tamaño en mm de CL por tratamientos al día 7 .	68
Figura 17. Valores promedios del número de CL por tratamientos al día 13.....	70
Figura 18. Valores promedios del tamaño en mm de CL por tratamientos al día 13	71
Figura 19. Valores de cortisol en diferentes días de medición por tratamiento.....	74
Figura 20. Valores de progesterona por tratamiento en los días de medición por tratamiento	77



INDICE DE TABLAS

Tabla N° 1. Distribución de bloques	53
Tabla 2. Valores promedio y error estándar de la progesterona plasmática en el día 13 post-inseminación.	64
Tabla 3. Valores promedios y error estándar del número y tamaños de los CL al día 7.	66
Tabla 4. Valores promedios y error estándar del número y tamaños de los CL al día 13.	69
Tabla 5. Valores promedio y error estándar de la cortisol en heces (ng/g de heces)73	
Tabla 6. Valores promedio y error estándar de la concentración de progesterona en heces durante el período experimental.	76

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Desarrollo en días del embrión	33
Cuadro 2. Clasificación de los embriones de acuerdo a su calidad y características morfológicas	35



INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Registro de las ovejas	97
Anexo 2. Programa de sincronización de celo.....	98
Anexo 3. Programa de Superovulación	99
Anexo 4. Protocolo de aplicación de progesterona.....	100
Anexo 5. Colecta de muestras de heces	101
Anexo 6. Hoja de campo para cirugía.....	102
Anexo 7. Fotos de la investigación	103
Anexo 8: Prueba de Shapiro Wilk para progesterona plasmática al día 13 post ...	108
Anexo 9: Prueba de Levene para progesterona plasmática al día 13 post	108
Anexo 10: ANOVA para progesterona plasmática al día 13 post	108
Anexo 11: Prueba de Kruscal Wallis para progesterona plasmática al día 13 post	109
Anexo 12: Pruebas de Normalidad para el número y tamaño de cuerpos lúteos al día 7	109
Anexo 13: Prueba de Levene para el número y tamaño de cuerpos lúteos al día 7	109
Anexo 14: ANOVA para el número y tamaño de cuerpos lúteos al día 7	110
Anexo 15: Prueba de Kruscal Wallis para el número y tamaño de cuerpos lúteos al día 7	110
Anexo 16: Pruebas de Normalidad para el número y tamaño de cuerpos lúteos al día 13	111
Anexo 17: Prueba de Levene para el número y tamaño de cuerpos lúteos al día 13	111
Anexo 18: ANOVA para el número y tamaño de cuerpos lúteos al día 13	111
Anexo 19: Prueba de Kruscal Wallis para el número y tamaño de cuerpos lúteos al día 7	112
Anexo 20: Prueba de Shapiro Wilk para cortisol en heces.....	112
Anexo 21: Prueba de Levene para cortisol en heces	113
Anexo 22: ANOVA de cortisol en heces	114
Anexo 23: Prueba de Kruscal Wallis para cortisol en heces	115
Anexo 24: Prueba de Shapiro Wilk para progesterona en heces	116



Anexo 25: Prueba de Levene para progesterona en heces	116
Anexo 26: ANOVA para progesterona en heces	117
Anexo 27: Prueba de Kruscal Wallis para progesterona en heces.....	117



AGRADECIMIENTO

Primeramente le damos gracias a Dios por darnos la fuerza suficiente para permitirnos culminar con esta etapa tan importante de nuestras vidas.

Agradecemos a la Universidad de Cuenca por los años de estudio y las experiencias vividas en cada aula. De igual manera, a todos los docentes que nos han brindado sus conocimientos para formarnos a lo largo de esta etapa como profesionales y personas de bien.

A los doctores Andrés Galarza, Ulises Iñiguez, Daniel Argudo, Juan Vásquez, Ing. Patricio Bueno, Dr. Manuel Soria y a los administradores de la granja Irquis, por su apoyo brindado para llevar a buen término nuestra investigación.

A Ricardo Alberio por su apoyo y dedicación, quién con sus conocimientos, experiencia y motivación nos supo guiar en esta etapa; hacemos extensivo este agradecimiento al Dr. Fernando Perea por su colaboración desinteresada para con nosotros y nuestro trabajo.

Y por último pero no menos importante a nuestros amigos Pablo Peñaloza y Jonathan Romero por la ayuda brindada durante la realización de este trabajo.



DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado especialmente a mis padres Mariana y Vinicio por el inmenso apoyo que me han brindado a lo largo de mi vida, ayudándome día a día a cumplir mis metas y superar los obstáculos que se han presentado en el camino.

A mi hermano Antonio, quién me ha acompañado durante los buenos y malos momentos de esta etapa.

A Jaime Burbano por sus palabras de aliento para salir adelante y luchar por mis metas.

Mariana González Rosales



DEDICATORIA

Dedico esta tesis de manera especial a mis padres Patricia y Roberto, quienes han sabido confortarme con sus consejos, su apoyo incondicional y sobre todo con su paciencia, ellos han sido mi impulso y fuerza para superarme personal y profesionalmente.

A mis hermanos Ana Patricia, Juan, José y Diana por ser esos amigos y acompañantes incondicionales, con su ejemplo me han ayudado a querer sobresalir cada día.

Sofía Quezada Moscoso



ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

ACTH: hormona adenocorticotropica

ADN: ácido desoxirribonucleico

BSA: albúmina sérica bovina

CEEP: células endometriales epiteliales

CEES: células endometriales estromales

CL: cuerpo lúteo

CRH: hormona liberadora de corticotropina

eCG: gonadotrofina coriónica equina

FSH: hormona folículo estimulante

GnRH: hormona liberadora de gonadotrofinas

HCG: hormona gonadotrofina coriónica humana

HHA: eje hipotálamo – hipófisis – adrenales

HHG: eje hipotálamo – hipófisis – gónadas

IA: inseminación artificial

IFN – t: interferón TAU

LH: hormona luteinizante

MAP: acetato de medroxiprogesterona

MIP: motilidad individual progresiva

MM: motilidad masal

ng/ml: nano gramos por mililitro

P₄: progesterona

PGE₂: dinoprostona

PGF₂α: prostaglandina F 2 alpha

SO: superovulación

UI: unidades internacionales

VA: vagina artificial



CLAUSULA DE DERECHO DE AUTOR

Mariana Gabriela González Rosales, autora de la tesis “**Administración de progesterona de acción prolongada después de la fertilización en ovinos superovulados, y su relación con el tamaño de cuerpos lúteos y embriones**”, 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 Medica Veterinaria Zootecnista. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora

Cuenca, 17 de Noviembre del 2016

Mariana Gabriela González Rosales

C.I: 0105334338



CLAUSULA DE DERECHO DE AUTOR

Sofía Margarita Quezada Moscoso, autora de la tesis “Administración de progesterona de acción prolongada después de la fertilización en ovinos superovulados, y su relación con el tamaño de cuerpos lúteos y embriones”, 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 Medica Veterinaria Zootecnista. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora

Cuenca, 17 de Noviembre del 2016

Sofía Margarita Quezada Moscoso

C.I: 0104427844



CLAUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

Mariana Gabriela González Rosales, autora de la tesis “**Administración de progesterona de acción prolongada después de la fertilización en ovinos superovulados, y su relación con el tamaño de cuerpos lúteos y embriones**”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 17 de Noviembre del 2016

A handwritten signature in blue ink that reads 'Mariana González Rosales'.

Mariana Gabriela González Rosales

C.I: 0105334338



CLAUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

Sofía Margarita Quezada Moscoso, autora de la tesis “Administración de progesterona de acción prolongada después de la fertilización en ovinos superovulados, y su relación con el tamaño de cuerpos lúteos y embriones”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 17 de Noviembre del 2016

A handwritten signature in blue ink, reading "Sofía Margarita Quezada M.", written over a horizontal line.

Sofía Margarita Quezada Moscoso

C.I: 0104427844



CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

En el Ecuador, la crianza y manejo de ovinos ha sido subdesarrollada, existiendo actualmente poco interés productivo, reproductivo e investigativo (Chalán, 2007). En nuestro país, el número de cabezas de ganado ovino es de 792.498 (INEC, 2011). Sin embargo, esta especie ha jugado y juega un rol fundamental en los sistemas de producción animal de muchos países del mundo. (Ramírez & Robalino, 2012)

Considerando los aspectos reproductivos de esta especie se conoce que la tasa de fecundación es del 75%, y la tasa de preñez corresponde al 85% (Gordon, 2010). Esta diferencia entre fecundación y gestación está constituida por la muerte embrionaria antes de su implante, estimándose que entre un 25 – 40% de los embriones llegan a morir en las 3 primeras semanas de preñez a pesar de ser normales. (González, 1991)

Las pérdidas embrionarias pueden ser precoces y tardías. Las primeras son aquellas que se presentan desde la concepción hasta los 21 días, y las segundas corresponden a las ocurridas entre el día 21 hasta 40 días post-servicio. Existen varias causas que provocan las pérdidas embrionarias dentro de las que se encuentran factores genéticos, internos y ambientales. (Guamán, 2006)

En el aspecto genético se debe tomar muy en cuenta el defecto de los gametos ya que debido a su temprana formación en la vida embrionaria y el tiempo transcurrido desde este momento hasta que eventualmente un folículo pueda ovular, pueden pasar desde 6-8 meses a varios años. Durante este período, las gametas que se encuentran en el ovario están sometidas a diversos factores endógenos y exógenos modificadores del ADN nuclear como radiaciones, intoxicaciones, altas temperaturas externas e internas, lo cual se va a traducir en gametas con defectos. Estas gametas pueden llegar a ser fecundadas pero no proseguir su desarrollo y morir a los pocos días post fecundación, esta causa de mortalidad embrionaria es una de las más frecuentes. (Guamán, 2006)



Sin embargo, otra causa que contribuye con la mortalidad es la asincronía que existe entre la capacidad del embrión para segregar interferón TAU. El embrión interfiere en la secreción de PGF y activa mecanismos como el que lleva a cabo la PGE2 que protegen al CL de la acción luteolítica de la PGF2alfa, si este no logra alcanzar su desarrollo apropiado antes que el útero secreta PGF2alfa, se provocará la desaparición del cuerpo lúteo (luteolisis), y posteriormente el embrión muere por falta de sostén progesterónico. (Rodríguez, 2001)

Considerando los factores que ocasionan la mortalidad embrionaria, se ha demostrado que existen algunas alternativas que permitirían modificar esta situación de asincronía y así poder disminuir la mortalidad embrionaria y mejorar la fertilidad (Rodríguez, 2001). Dentro de las alternativas que se pueden utilizar con el fin de disminuir la muerte embrionaria por asincronía entre el desarrollo del embrión y secreción de PGF por parte del útero, el aumento de la progesterona (P4) en el metaestro temprano puede ser una de ellas (Guamán, 2006).

En este momento existen niveles mínimos de P4 porque el CL aún está en formación, y la aplicación exógena de P4 en este momento es capaz de producir modificaciones en el endometrio que posibilitan la activación de genes que inducirán la síntesis de componentes que liberados a la luz uterina, aumentan la velocidad de crecimiento de los embriones. Lo que permitirá que éstos lleguen entonces en forma adelantada a producir el interferón TAU, contribuyendo con la inhibición de PGF2alfa (Pope *et al.*, 1994).

Lo que se propone en esta investigación, es administrar progesterona de manera directa con el fin de determinar la acción e incremento de los niveles P4 durante la fase lútea temprana sobre el tamaño de los embriones en los días 7 y 13 después de la fecundación mediante cirugía abdominal. Se ha usado la inyección durante tres días. La P4 de larga acción podría corregir esto y aseguraría niveles apropiados de P4 durante 3 a 4 días (Pope *et al.*, 1994).

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



Objetivo General

Evaluar el efecto de la administración de dos tipos de progesterona en el metaestro temprano de ovejas sometidas a superovulación, sobre el tamaño de los cuerpos lúteos y de los embriones en el día 13 de vida.

Objetivos Específicos

Valorar los niveles de progesterona en sangre, el tamaño de los cuerpos lúteos y embriones en el día 13, después de la fertilización en ovejas tratadas con progesterona.

Valorar el estrés producido por 3 aplicaciones de P4 en relación con la administración de una sola dosis de P4 de larga acción, siendo evaluado a través de los niveles de cortisol y P4 en heces.

HIPÓTESIS

La progesterona de larga acción, aplicada en el metaestro temprano afecta el tamaño de los cuerpos lúteos y embriones de 13 días de vida.



CAPITULO II: REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Generalidades

La oveja doméstica (*Ovis aries*) es un mamífero ungulado rumiante que se originó del muflón. Tienen un temperamento alerta, tranquilo y asustadizo, siendo manso si se los cría desde recién nacidos. La vida útil de los ovinos comienza desde sus primeros días de vida hasta los 8 o 9 años, pudiendo llegar a vivir hasta los 20 años. Éstos animales poseen instinto gregario, es decir viven en grandes agrupaciones con una gran capacidad de adaptación a los distintos ambientes en los que se encuentran. La cría de ovinos se basa principalmente en la producción de carne, lana y leche. (López, 1996)

2.2. Fisiología reproductiva de la oveja

2.2.1. Pubertad

Representa una fase dentro del desarrollo fisiológico, en el que el individuo alcanza su madurez sexual y reproductiva. Durante esta etapa existe un mayor crecimiento y desarrollo de las gónadas; siendo regulado por el sistema nervioso central particularmente por el hipotálamo quien secreta gonadotrofinas que actúan sobre las gónadas (Padilla *et al.*, 2006).

La pubertad se inicia con la primera ovulación y termina una vez adquirida la ciclicidad ovárica, y aquellos acontecimientos que suceden antes de lo mencionado se conoce como período prepuberal el cual está determinado por el genotipo y factores como el fotoperiodo y la nutrición (Camacho *et al.*, 2010). El desarrollo sexual se ve afectado por factores genéticos, ambientales (estación del año) y su interacción. A su vez también existen variaciones entre razas, edad y peso (Buratovich, 2013).



Existen diferencias en la edad en la que se alcanza la pubertad, relacionadas con la época del año en la que ocurren los nacimientos. Estos ocurren en la primavera, la pubertad se alcanza a los 6 meses de edad con un peso aproximado de 21kg según, mientras que las nacidas en otoño ciclan a partir de los 9 meses así hayan alcanzado los 21kg de peso en ovejas Pelibuey. (Porrás, Zarcos & Valencia, 2003)

2.2.2. Estacionalidad

La estacionalidad, es un mecanismo adaptativo llevado a cabo por algunas especies, el cual tiene la finalidad de minimizar el efecto de ciertos factores ambientales como la temperatura, humedad y alimento sobre la supervivencia de las crías (Arroyo, 2011).

El hecho de que los partos se produjeran en estaciones específicas, originó un patrón reproductivo que se repetía anualmente (Porrás, Zarcos & Valencia, 2003), y que se encuentra dividido en dos etapas fisiológicas bien definidas. Una es la fase de anestro que ocurre durante los (días largos) y se caracteriza por la ausencia de ciclos estrales regulares, (López *et al.*, 1993). Durante este proceso la hipófisis se encuentra inactiva y secreta escasas gonadotropinas al torrente sanguíneo, por lo que el crecimiento folicular no es estimulado y la hembra no presenta celo ni ovula. (Galora, 2006)

La siguiente etapa es la receptividad sexual y ovulación (días cortos), caracterizada por incremento de la actividad adenohipofisiaria, mayor secreción de gonadotropinas, estímulo de crecimiento y maduración folicular, estrógeno y ovulación (Galora, 2006)

Para que estos eventos puedan llevarse a cabo, debe existir la influencia del fotoperíodo, puesto a que en ovejas su sistema neurofisiológico es capaz de transformar una señal luminosa en una señal hormonal (Arroyo, 2011).

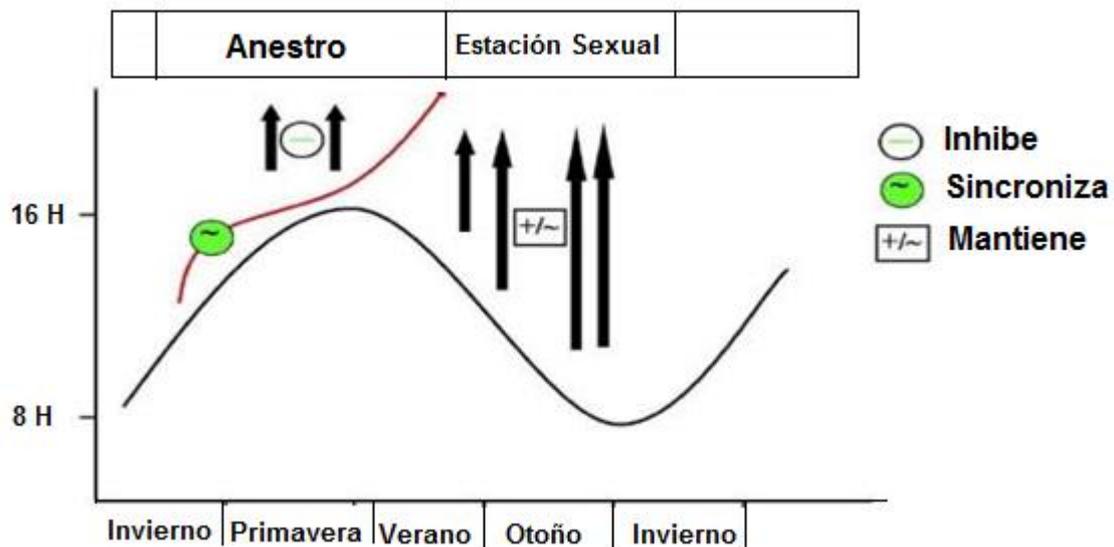


Figura 1. Regulación de la estacionalidad reproductiva de las ovejas.

Fuente: Forcada, Abecia, Casao & Vásquez (2009)

2.2.3. Control fisiológico del fotoperiodo

El fotoperiodo es un factor físico que regula la actividad reproductiva de los animales determinando así el tiempo óptimo para su reproducción (Porras, Zarcos & Valencia, 2003)

Los impulsos luminosos son captados por la retina y transportados por el tracto retino hipotalámico hasta la glándula pineal (Chemineau, 2004). La oveja traduce el estímulo de luz a través de la hormona melatonina, secretada por la glándula pineal durante la noche (Forcada *et al.*, 2009).

La melatonina activa al sistema neuroendocrino y el hipotálamo aumenta la producción de hormona liberadora de gonadotropinas, estimulando así la hipófisis anterior que secreta las hormonas FSH y LH, particularmente esta última quien cumple un rol fundamental en la ovulación y la luteinización posterior de los folículos ovulados. Una vez formados las células luteínicas, producen grandes cantidades de

progesterona (P4) que a su vez ejercen un efecto de retroalimentación negativa sobre la hormona LH. (Galora, 2006)

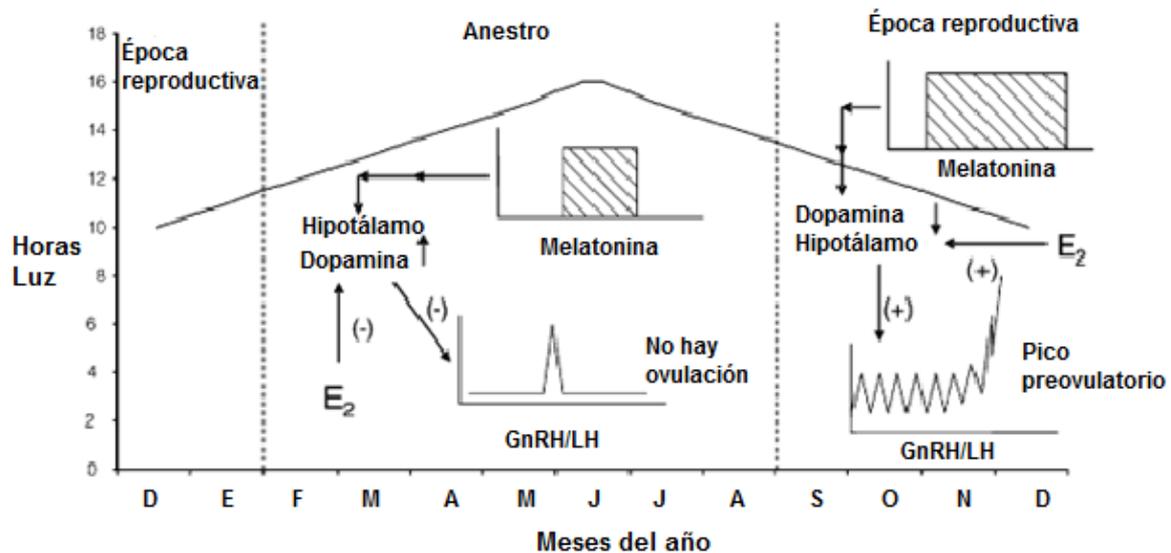


Figura 2. Efecto del fotoperiodo en el ciclo estral

Fuente: Ledezma & Gallegos (2006)

2.2.4. Control hormonal del ciclo estral

El proceso reproductivo es similar en todos los animales, con ligeras diferencias. (Ptaszynska, 2007). La reproducción es regulada por un mecanismo neurohumoral sincronizado, iniciando con cambios químicos, e influenciado variables fisiológicas, psicológicas y ambientales. (Prieto & Velásquez, 2002).

Fisiológicamente, actúan las hormonas gonadotrópicas que van a permitir tanto el desarrollo de las células sexuales, como la aparición de las conductas necesarias para llevar a cabo el apareamiento (Prieto & Velásquez, 2002).

El sistema nervioso central recibe información externa y la lleva a las gónadas a través del eje hipotálamo – hipófisis – útero ovárico, siendo estos últimos tejidos productores de hormonas y órganos diana, cuya secreción de esteroides gonadales creando una

retroalimentación homeostática que regula la secreción de las hormonas hipotalámicas – hipofisiaria. (Calva & Cantos, 2014)

El hipotálamo produce GnRH que al llegar a la hipófisis anterior estimula la secreción de FSH y LH, que a su vez estimulando el desarrollo folicular, la ovulación y el mantenimiento del cuerpo lúteo. (Ptaszynska, 2007)

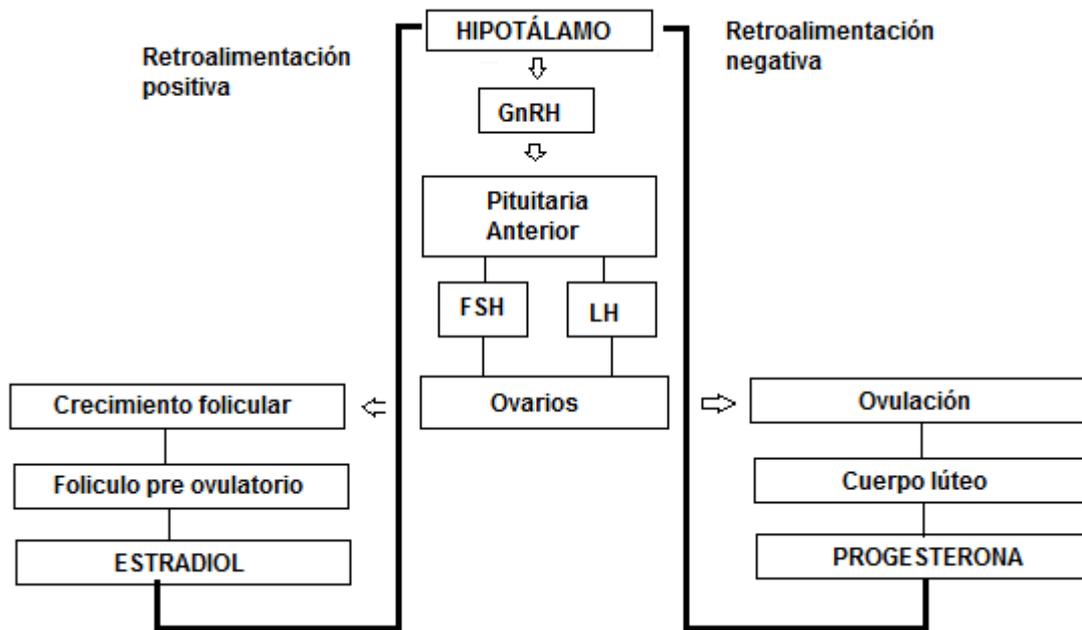


Figura 3. Control neuroendocrino de la reproducción.

Fuente: Rippe, (2009)

2.2.5. Características del ciclo estral

El ciclo estral es un conjunto de procesos anatómicos, hormonales y de comportamiento que se repite sucesivamente, definiéndose como el intervalo entre dos estros consecutivos (Márquez, 2014). En las ovejas, éste ciclo tiene una duración aproximada de 17 días, de los cuáles 15 días corresponde a la fase lútea y 2 días a la fase folicular. (Ramírez et al., 1988)



Existen 2 fases durante el ciclo estral que son las siguientes:

- **Fase folicular:** proestro y estro
- **Fase luteal:** metaestro y diestro

Proestro

Es la etapa que da inicio al ciclo estral; en la oveja tiene una duración de 2 días, y durante la misma ocurre crecimiento y maduración de los folículos ováricos, y el incremento de los niveles de estrógenos. También existe la liberación de prostaglandina a la cual se le atribuye la desaparición del cuerpo lúteo mediante el mecanismo de luteólisis de manera que el aparato reproductor se prepara para la siguiente fase. (Rodríguez, 2005). Entre las manifestaciones clínicas, se puede observar intranquilidad, inapetencia, intento de monta entre las hembras. (Cobos, 2011)

Estro

En la oveja, el estro corresponde al período que prosigue al proestro, el estradiol es la hormona dominante y es la principal responsable de los cambios comportamentales que conllevan a la receptividad sexual y al apareamiento. La ovulación es un proceso espontáneo que no requiere coito, ocurre entre 24 a 30 horas después de iniciadas las manifestaciones conductuales (Atuesta; Gonella, 2011).

Metaestro

Tiene una duración de 2 días. Es el período durante el cual los restos del folículo ovulado se transforman en una glándula endocrina llamada cuerpo lúteo, y a su vez está presenta funcionalidad completa, existe mayor secreción de progesterona (Atuesta; Gonella, 2011). Durante esta etapa ocurre la ovulación a las 14 horas de presentado el celo (Rippe, 2009).



Diestro

Es la fase más larga del ciclo estral y se caracteriza por la máxima funcionalidad lútea y la influencia de la progesterona; en la oveja tiene una duración de 11 a 12 días. Esta fase finaliza con la luteólisis que es controlada por la PGF2a, la oxitocina y la progesterona. Es necesario que ocurra la luteólisis para que vuelva a iniciarse un nuevo ciclo estral. (Uribe, Correa & Osorio, 2009)

2.2.6. Ovulación

Es el proceso en el que el folículo maduro se rompe, y el ovocito es liberado. Este proceso en la oveja sucede de forma espontánea, sin la presencia del macho y tiene lugar a las 14 horas después del inicio del estro. (Galora, 2006)

La tasa de ovulación está influenciada por la raza, edad, estado reproductivo, estación, nutrición y condición corporal de la oveja. Al principio de la estación reproductiva las tasas de ovulación suelen ser menores y el estro breve, que se manifiesta de forma menos intensa y está asociado con menor fertilidad. (Viñoles, 2011)

La ovulación se inicia con el incremento de la vascularización de la pared folicular, a excepción del ápice, el cual por acción enzimática se romperá liberando al ovocito. A su vez los niveles de PGF2 y de PGE2 aumentan notablemente, lo cual incrementa el tono de las fibras musculares lisas que contribuye a la ruptura del folículo y a la expulsión del ovocito. (Galora, 2006)

2.2.7. Cuerpo lúteo

El cuerpo lúteo es una glándula ovárica endocrina y transitoria, que resulta del crecimiento y diferenciación de las células de la teca y granulosa después de la ovulación (Torres, 2013). Se forma después de la ovulación, a partir de los restos del folículo, siguiendo un proceso de luteinización en las células de la granulosa y de la teca interna. (Moyes & Schulte, 2007)



El cuerpo lúteo se encarga principalmente de la secreción de progesterona, hormona que regula la duración del ciclo reproductivo de la hembra, y prepara al útero para el inicio y mantenimiento de la gestación (Cunningham & Bradley, 2009). El cuerpo lúteo sintetiza progesterona a partir del colesterol circulante, capacidad que solamente posee este tejido glandular transitorio. (Torres, 2013)

Existen disfunciones por parte del cuerpo lúteo, entre las que se menciona el acortamiento de su vida media, y la producción subnormal de P4. Estas alteraciones han sido definidas como causa de mortalidad embrionaria (Hernández & Zarco, 1998). Un cuerpo lúteo de vida corta presenta deficiencia de receptores para progesterona durante los primeros días del ciclo, razón por la cual ese CL libera niveles subnormales de P4, y a su vez esta hormona no puede bloquear en forma efectiva la síntesis de receptores para estradiol, quienes contribuyen para la liberación de PGF, llegando a producirse regresión lútea temprana. (Hernández & Zarco, 1998)

Las células del cuerpo lúteo tienen vida finita, es decir, si se produce la gestación el embrión envía una señal para impedir la degeneración del CL, y en caso de que no haya preñez, la PGF2a origina la degeneración de las células lúteas y causa disminución de los niveles de progesterona. (Hill, Wyse & Anderson, 2006)

La regresión del CL es importante para que se inicie un nuevo ciclo reproductivo. En 1923, se desarrolló una teoría en la que se hacía responsable al útero del control de la vida del CL, sabiendo que su regresión se iniciaba por la síntesis uterina de PGF2a. (Cunningham & Bradley, 2009)

Para que el CL sea sensible a la PGF2a, requiere de cierto estado de madurez, caracterizado por una amplia vascularización y niveles de P4 mayores a 1ng/ml, proceso que culmina aproximadamente el día 5 del ciclo estral. (Torres, 2013)



2.3. Fecundación

La fecundación es un proceso complejo en el cual se da la mutua asimilación de los gametos, tanto del macho como la hembra para formar una nueva célula denominada cigoto, la cual dará origen a un nuevo organismo (Robles, 2002). Dentro de los aspectos esenciales de la fertilización se encuentra la asociación del genoma paterno y materno, y la activación del ovulo. (Galina & Valencia, 2009)

2.3.1. Etapas de la fecundación:

2.3.1.1. Desplazamiento de los espermios por las vías genitales de la hembra

El avance de los espermatozoides se produce por flexiones y rápidos enderezamientos de la cola, lo que les impulsa desde líquido circundante hacia adelante, este desplazamiento coincide con la fase secretora, en la cual el útero crea las condiciones necesarias para dirigir a los espermatozoides al oviducto. (Robles, 2002)

2.3.1.2. Desplazamiento del óvulo

La fecundación también depende de la expulsión del ovulo a través del folículo de Graff. Durante la ovulación, este gameto se encuentra rodeado por la corona radiada. En las ovejas el ligamento es débil por lo cual los movimientos ciliares del epitelio del ligamento impulsan el líquido desde la cavidad abdominal hacia el útero y la corriente lleva al ovulo hacia el ampulla del oviducto, este período tiene una duración de 2 – 4 días. (Robles, 2002)

2.3.1.3. Penetración

La última barrera que deben atravesar los espermatozoides para fertilizar al ovulo es la zona pelúcida, en este proceso interviene un mecanismo mecánico y otro enzimático; en el primero las fuerzas generadas por el movimiento hiperactivado



permiten el paso del espermatozoide a través de la zona pelúcida, y en el segundo las enzimas liberadas durante la reacción acrosomal (acrosina), abren la zona pelúcida y el espermatozoide entra al ovulo; una vez dentro, el espermatozoide ingresa al espacio perivitelino y la cabeza espermática se une a la membrana plasmática del ovulo, y es incorporada dentro del citoplasma del mismo. (Galina & Valencia, 2009)

2.3.2. Estadios de la fecundación

- **Primer estadio:** Periodo de denudación de las células foliculares de la corona radiada, y del montículo de ovulo, se realiza en el oviducto.
- **Segundo estadio:** Penetración de los espermios al espacio vitelino, termina la maduración del ovulo y se genera el segundo corpúsculo polar dirigido. En este estadio el ovulo adquiere selectividad y bloquea la fecundación, si son gametos de diferentes especies.
- **Tercer estadio:** En este proceso la cabeza y el cuello de los espermios, ingresan al citoplasma del óvulo. La cabeza se trasforma en un pronúcleo masculino, con la mitad del número de cromosomas, y el óvulo comienza la segunda división del ovocito de segunda orden.
- **Cuarto estadio:** Formación del cigoto. En este período, el núcleo del óvulo y del espermio se aproximan, y se fusionan dando origen a un nuevo organismo. Esto sucede en el tercio superior del oviducto, y el nuevo organismo se desplaza en dirección al útero. El cigoto llega al cuerno en forma de blastocito.

(Robles, 2002)



2.4. Desarrollo embrionario y evaluación morfológica

2.4.1. Desarrollo embrionario

Al liberarse el ovocito durante la ovulación, este es atrapado por las fimbrias y llega al oviducto para ser fecundado, momento a partir de cual se inicia el proceso de desarrollo embrionario previo a la implantación. (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 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)

Cuadro 1. Desarrollo en días del embrión



DÍAS	Diferentes etapas antes y después de la ovulación	Tiempos desde la aparición del celo (h)
0	Aparición de los celos Pico de LH	
	Acoplamiento o inseminación	0 - 12
1	Ovulación	24 - 30
	Fecundación	25 - 31
2	Huevo en el	56
	Estadio 2 blastómeros	
3	Estadio 4 blastómeros	60
	Estadio 8 blastómeros	72
4	16 células: mórula	
5	48 células (16-76 células: mórula)	96
6	Embriones libres en el blastocisto	
7	útero 200 células (138-308): Blastocisto	
8	400 células (150-650 células): Blastocisto saliendo de la zona pelúcida	
9	400 células (250-550 células): Blastocisto sin zona pelúcida	
10	700 células (230-1620 células): Blastocisto en expansión al salir de la zona pelúcida	
14	Implantación Primeros contactos entre las células del trofoblasto y el epitelio del endometrio que señalan el inicio de implantación	

Fuente: Chesné, Baril & Brevion (1995)

2.4.2. Clasificación de los embriones

Se realiza en base a sus características morfológicas, observando la forma esférica y la integridad de la membrana pelúcida; su desarrollo debe ser acorde con el día de colecta, mostrándose claros y de contorno regular. En algunos se observa células desprendidas en el espacio perivitelino. (Sánchez, Mejía & Manzur, 2014)

Para la calificación de los embriones, se utiliza una escala del 1-4, la cual se describe a continuación:

- 1. Calidad 1:** Excelente, embriones esféricos, simétricos, con células uniformes. Son ideales para congelar.
- 2. Calidad 2:** Regulares, blastómeros sueltos, vesículas o células degeneradas. Aceptables para transferencias en fresco.



- 3. **Calidad 3:** Malos, blastómeros sueltos, células degeneradas y heterogéneas, no se debe congelar y su uso en fresco no da buenos resultados.
- 4. **Calidad 4:** Muertos o degenerados, blastómeros sueltas y muchas vesículas, aspecto granular y crecimiento retardado. No se congelan ni se transfieren en fresco (Palma, 2001).

Cuadro 2. Clasificación de los embriones de acuerdo a su calidad y características morfológicas

Según su estadio	código	Según su calidad	código
Ovulo	1	Excelente	1
Embrión de 2 a 16 células	2	Bueno	2
Mórula temprana	3	Regular	3
Mórula compacta	4	No transferible	4
Blastocito temprano	5		
Blastocito maduro	6		
Blastocito expandido	7		
Blastocito en eclosión	8		

Fuente: Sánchez, Mejía & Manzur, (2014).

2.5. Implantación embrionaria

La implantación embrionaria es un complejo proceso que inicia con la fijación del blastocito al útero, y termina con la formación definitiva de placenta. Este proceso depende de la sincronía entre el estado fisiológico del útero y el estadio de desarrollo del embrión, el cual es controlado por los estrógenos y la progesterona (Góngora, Grajales & Hernández, 2002).

La implantación ocurre durante la fase de elongación del blastocito, en los ovinos sucede en el día 17, pero solo puede ocurrir cuando el embrión y el endometrio han alcanzado un estado de madurez preciso. (Castañeda, 2011)



Existen tres etapas en las que se produce la implantación del embrión, las cuales son:

1. **Preadhesión:** el embrión comienza a elongarse considerablemente.
2. **Aposición:** existe contacto entre el trofoblasto y el epitelio uterino
3. **Adhesión:** culmina con un incremento en la estructura celular de la placenta epiteliocorial. (Góngora, Grajales & Hernández, 2002)

2.6. Mortalidad y supervivencia embrionaria

En los rumiantes la tasa de fecundación después de la IA es alta, en la mayoría de los casos corresponde al 80%; mientras que la de supervivencia embrionaria disminuye hasta el 56%. Por lo tanto, en las dos primeras semanas de gestación se presentan pérdidas embrionarias substanciales (Torres, 2013).

La mortalidad embrionaria constituye un problema reproductivo que genera grandes pérdidas económicas a los productores. En la oveja, existen ciertos factores que van a perjudicar la supervivencia de los embriones, limitando de esta manera la función reproductiva de los rebaños (Gonella, Grajales & Hernández, 2010).

Dentro de las pérdidas embrionarias encontramos:

1. **Pérdidas embrionarias basales:** Están relacionadas con anomalías genéticas o deficiencias en el sistema materno para mantener la preñez.
2. **Pérdidas embrionarias inducidas:** Asociadas a factores ambientales, nutricionales y estresantes los cuales alteran la concentración de las hormonas que controlan la supervivencia embrionaria.

(Tabarez *et al.*, 2009)

El embrión puede morir debido a que no produce una cantidad necesaria de interferón TAU para no inhibir la luteólisis, o también por deficiencias del sistema materno debido a que los niveles de progesterona no son los adecuados y existe una asincronía entre el conceptus, el cuerpo lúteo y el endometrio. (Gonella, Grajales & Hernández, 2010)



2.7. Flushing

Se puede incrementar la tasa de preñez en los animales, mediante el factor genético al utilizar individuos más prolíficos, pero también brindando un manejo nutricional como el flushing que permite utilizar cualquier ejemplar sin considerar sus características genéticas. (Banchemo & Quintans, 2008)

El flushing consiste en aumentar la cantidad y calidad de alimentos para mejorar la condición corporal de las borregas en determinados momentos de su vida productiva. (Romero & Bravo, 2012)

Con ésta práctica, se estimula los ovarios para que produzcan más óvulos, mejora la implantación del embrión y a su vez la cantidad de crías por parto (Acurero, 2000). Es una técnica que generalmente se aplica en animales de mediana y baja condición corporal, y debe ser equivalente a un 20-30 % de las necesidades energéticas de mantenimiento de la oveja. (Romero & Bravo, 2012)

Esta sobrealimentación puede ser corta cuando se aplica durante un lapso de unos pocos días y que no causan cambios en el peso vivo del animal, o puede utilizarse por un periodo de varias semanas lo cual va a producir cambios en el peso vivo y una mejora en la condición corporal de las hembras, este manejo alimenticio es conocido como flushing tradicional. (Banchemo & Quintans, 2008)

2.8. Sincronización de celo

El proceso de sincronización implica la administración de ciertas hormonas que simula los acontecimientos endócrinos que ocurren en forma natural, con el objeto de inducir el celo y la ovulación en un momento determinado del ciclo estral. (Sánchez, Mejía & Manzur, 2014)



2.8.1. Métodos de sincronización

Existen varios métodos empleados para sincronizar celo, empleando tratamientos hormonales, que producen un estímulo temporal en la actividad ovárica (Chesné, Baril & Brebión, 1995).

- 1. Prostaglandina F2a:** actúan sobre cuerpo lúteo provocando luteólisis, como resultado disminuyen los niveles sanguíneos de P4. A continuación los niveles de estrógenos incrementan produciendo signos de celo y la ovulación (Alberio & Butler, 2001). Galina y Valencia, mencionados por Sánchez, afirman que el uso debe ser en la fase lútea (7 – 11 días en ovinos) (Sánchez, Mejía & Manzur, 2014). El tiempo que transcurre entre su aplicación y la ocurrencia del celo varía entre 2 y 5 días y depende principalmente de la dinámica folicular, tamaño del folículo y estado del CL (Calva & Cantos, 2014). La administración de una doble dosis de PGF2a en un lapso de varios días logra que, en la segunda aplicación, todas las ovejas presenten cuerpo lúteo y que las manifestaciones de celo sean más concentradas en el tiempo (Prieto *et al.*, 2010).
- 2. Progestágenos:** modulan funciones endócrinas y reproductoras como: facilitar la liberación de ovocitos maduros, la implantación y mantenimiento de la gestación, y además participa en la supresión de la síntesis y liberación de gonadotropinas y GnRH (Sagbay, 2014). Para su aplicación se usan dispositivos intravaginales impregnados de un análogo de progesterona o progestágeno; la hormona es liberada en forma lenta, absorbiéndose y pasando al torrente circulatorio, bloqueando el estro y la ovulación (Calva & Cantos, 2014). La finalidad de este método consiste en la inducción de una fase lútea artificial, en donde elevadas concentraciones de P4 inhiben la secreción pulsátil de GnRH, y consecuentemente de LH, bloqueando de este modo la ovulación (Sánchez, Mejía & Manzur, 2014). En forma natural tiene vida media muy corta entre 3 – 4 minutos (Calva & Cantos, 2014).

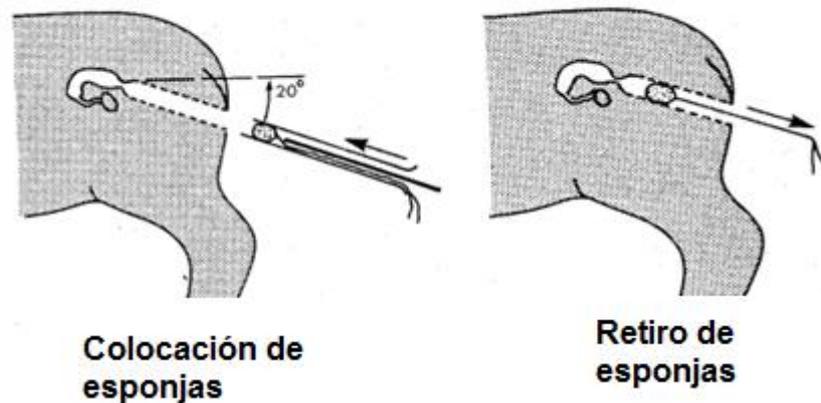


Figura 4. Colocación y retiro de esponjas durante el tratamiento de sincronización de celos.

Fuente: Gibbons & Cueto (2011)

2.9. Superovulación

Es un método mediante el cual se logra inducir una mayor tasa ovulatoria en hembras mediante tratamientos hormonales (Simonetti, 2008). En ovejas este protocolo tiene como finalidad la obtención de un máximo número de embriones transferible con alto porcentaje de preñez. (Conde, 2015)

Existen factores externos, fisiológicos y farmacológicos que se encuentran involucrados en la respuesta de dichos tratamientos. Entre estos cabe destacar

1. **Externos:** Nutrición, estación, manejo y semen.
2. **Fisiológicos:** Especie, raza, edad, fertilidad, dinámica y ondas foliculares
3. **Farmacológicos:** Tipo (FSH), relación FSH/LH, dosis, frecuencia administración, protocolo, sobre estimulación. (Jiménez, 2009)

2.9.1. Hormonas utilizadas en la Superovulación

1. Hormona Folículo estimulante (FSH)

Hormona sintetizada en la hipófisis anterior, que regula la función ovárica (Conde, 2015), favorece el crecimiento y maduración de folículos y ovocitos, estimula en el



folículo la aparición de receptores de LH y estimula la síntesis y la secreción de estrógenos. (Chesné, Baril & Brebion, 1995)

Posee una vida media corta de 110 minutos (Pliego, 2015), razón por la cual requiere de varias aplicaciones para lograr su efecto (Conde, 2015) y para mantener un nivel continuo en la sangre que garantice la acción de esta sobre los folículos ováricos. (Córdova, 2011)

2. Gonadotropina coriónica equina (eCG)

Es una glucoproteína extraída del suero de yeguas grávidas durante la primera mitad de la gestación, y actúa como FSH – LH (Chesné, Baril & Brebion, 1995). Es secretada naturalmente por las copas endometriales de la yegua entre los días 40 y 120 de gestación. (Simonetti, 2008)

Posee una vida media de 21 horas, provoca una estimulación ovárica continua, folículos anovulatorios, perfiles endocrinos anormales y baja calidad embrionaria (Conde, 2015).

La eCG actúa sobre la población folicular, promueve su desarrollo, e induce la liberación endógena de LH. En ovejas 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. (Simonetti, 2008)

2.10. Inseminación Artificial

Es una técnica de reproducción, en el cual el semen es colectado y los espermatozoides viables son depositados en el tracto reproductivo de la hembra, de manera que exista fecundación y gestación (Rodríguez, 2013). El proceso requiere la sincronización previa de las ovejas. (Simmons & Ekarius, 2011)



El momento óptimo para realizar la inseminación transcervical con semen fresco y detección de celo es de 6 a 8 horas luego de su detección, y sin la detección del celo entre 48 a 58 horas luego de haber retirado los dispositivos con progesterona. (Latorre & Sales, 2000)

Existen tres métodos de IA: vaginal, intracervical e intrauterina. En las 2 primeras se utiliza semen fresco, mientras que en la IA intrauterina se usa semen congelado. La obtención del semen puede ser mediante el uso del electroeyaculador o vagina artificial. Un carnero adulto eyacula aproximadamente 1 ml con una concentración entre 2000 – 3000 millones de espermatozoides por eyaculado. (Sepúlveda, 2012)

2.10.1. Inseminación artificial transcervical en ovinos

Esta técnica utiliza una pistola multidosis, que facilita graduar el volumen de semen, luego se debe colocar a la oveja inclinada. Se procede a realizar el debido aseo, introduciendo el vaginoscopio hasta fondo de vagina, luego se localiza el orificio de entrada del cuello uterino (cérvix), y se deposita el semen en la mitad del mismo. El porcentaje de preñez de este método varía entre 60 y 70%. (Gibbons & Cueto, 2011)

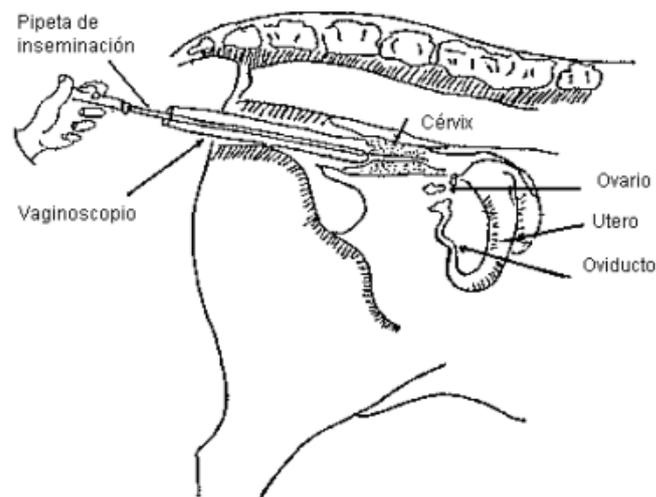


Figura 5. Inseminación transcervical

Fuente: Gibbons & Cueto (2011).

La baja fertilidad al aplicar esta técnica se debe al transporte defectuoso de los espermatozoides por el cérvix y a la reducida viabilidad de los mismos. Un bajo rendimiento se da como consecuencia de la mortalidad embrionaria, reacciones inmunológicas o estrés al que han sido sometidos los animales. (Parraguez, Muñoz & Latorre, 2002)

2.11. Progesterona

Se la conoce como la hormona de la preñez, siendo secretada principalmente por el cuerpo lúteo (Galora, 2006). Tiene una función reguladora en la reproducción de la hembra, debido a que facilita la liberación de ovocitos maduros, la implantación y el mantenimiento de la gestación, además de modificar el crecimiento del endometrio y disminuir la actividad contráctil del músculo uterino (Botana, Landoni & Jiménez, 2002).

A su vez, regula cambios que ocurren en el oviducto y útero para que el embrión se desarrolle; esta hormona regula las secreciones uterinas, de las cuales los embriones recibirán los nutrientes y sustancias que estimularán su crecimiento y diferenciación. (Botana, Landoni & Jiménez, 2002)



Con el proceso de luteinización se inhibe la aromatización de andrógenos y se comienza a producir P4 desde niveles no detectables, hasta el día 2 post - estro donde se registran niveles séricos mayores de 1ng/ml, para en el día 5 post estro llega a niveles mayores de 5 ng/ml, considerándose como funcional el CL. Si el embrión logra ser reconocido por la madre, la producción de P4 se mantiene y favorece la producción de IFN-t, molécula responsable del reconocimiento de la gestación, caso contrario entra en regresión mediante luteolisis. En el caso de existir fase lútea subnormal, los niveles de P4 serán bajos y como resultado se obtendrá un embrión poco desarrollado con incapacidad para producir IFN – t. (Hernández & Zarco, 1998)

Especie	Días del ciclo estral / Intervalos de concentración de P4 (ng/ml)				
	0 - 2 días	3 - 5 días	6 - 12 días	13 - 16 días	17 - 21 días
Ovina	0,5 - 1	2 - 4	5 - 7	1 - 3	

Figura 6: Niveles de progesterona en los días del ciclo estral

Fuente: Franco & Velásquez, 2012

En la oveja, las concentraciones varían entre 3 a 7 nmol/L en la fase lútea, mientras que durante la preñez las concentraciones aumentan encontrándose en el rango de 15 a 40 nmol/L. (Agazzi & Larrobla, 2005)

2.11.1. Farmacocinética de la progesterona

- **Absorción:** existen diferencias en la capacidad de absorción, siendo variaciones interpersonales que podrían deberse a un porcentaje variable de absorción, aclaramiento y diferente distribución en el tejido graso.

La progesterona no se disuelve en agua, por lo que requiere diluirse en aceite y ser micronizada para mejorar su absorción.

- **Distribución:** La vida media de los diferentes componentes está determinada por su unión a las proteínas plasmáticas. En plasma la progesterona se une a la albúmina y la globulina de unión a corticosteroides pero no muestra unión apreciable a la globulina de unión a esteroides sexuales. . La unión total a las



proteínas plasmáticas es $\geq 90\%$, aunque la distribución de la unión a las diferentes proteínas es específica para el compuesto.

- **Metabolismo:** La vida media de la progesterona natural es de alrededor de 5 min, mientras que los progestágenos sintéticos tienen vidas medias mucho más prolongadas como 24 h para el acetato de medroxiprogesterona. La hormona que se metaboliza principalmente en el hígado a través del sistema citocromo P450 por hidroxilación oxidativa hasta generar metabolitos hidroxilados y sus conjugados, sulfato y glucorónido.
- **Eliminación:** La mayor parte de la progesterona y sus metabolitos que han alcanzado la circulación general son excretados por los riñones, principalmente como metabolitos glucorónidos de pregnandiol y pregnandolona. La segunda vía más importante es la biliar y las heces (20%).

(Orizaba, Alba & Ocharán, 2013)

2.11.2. Acción de la P4 en el útero

El efecto de la progesterona sobre el desarrollo embrionario se encuentra mediado a través del endometrio, sabiendo que no es necesario que el embrión ya se encuentre presente en el útero durante el momento de elevación de los niveles de P4 para poder beneficiarse de ella. (Clemente et al., 2009)

Durante el ciclo estral, los cambios histológicos que se producen en el endometrio se encuentran asociados a la progesterona que estimula el crecimiento y desarrollo del mismo, estimula la acumulación de glucógeno y 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)

El control materno se hace a través de la P4 la cual inhibe la expresión de algunas moléculas de la familia de factores de crecimiento, que normalmente son estimulados en la fase folicular por acción del estradiol, y a su vez, disminuye el edema y aumenta la producción glandular del útero. Y si no hay una señal de reconocimiento materno



habrá lisis del cuerpo lúteo, dando inicio a un nuevo ciclo estral. (Cullinam & Koos, 1993)

Cuando termina el diestro, la oxitocina estimula la producción de $PGF2\alpha$ 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 P_4 , E_2 y oxitocina, las cuales actúan a través de sus receptores específicos. (Cullinam & Koos, 1993)

En hembras que repiten celo constantemente, se ha observado que tienen menores niveles de P_4 , por lo cual se han implementado técnicas como el suministro de P_4 exógena o la inducción de cuerpo lúteo accesorio para aumentar la tasa de preñez. Al realizar biopsias endometriales y relacionarlas con los perfiles hormonales, se han demostrado cambios histológicos anormales en el útero de las hembras repetidoras con menores niveles de P_4 durante su fase lútea. (Gonella, Grajales & Hernández, 2010)

En el 2011, Depaz y colaboradores afirmaron que el uso de un tratamiento corto con progestágenos para sincronizar el celo en ovejas, es viable ya que nos permite obtener una muy buena fertilidad y prolificidad. (Depaz, Álvarez & Mellisho, 2011)

Garrett y colaboradores, en 1988 administraron 100 mg P_4 en los días 1, 2, 3, y 4 de preñez que resultó en un aumento de la concentración plasmática periférica de P_4 en los días 2-5 dando como resultado conceptus más grandes en el día 14 (Garret *et al.*, 1988). Otros investigadores, usaron un implante de P_4 en el día 3 de preñez, obtuvieron concentraciones elevadas de P_4 en el día 8. (Tovio, Duica & Grajales, 2008)

En un estudio realizado por Clemente en el 2009, se aplicó 25 mg de P_4 , 36 horas luego del apareamiento, resultando un incremento de 220% en el diámetro del blastocito en el día 9 y a su vez el alargamiento de los blastocitos el día 12 y la aparición de un conceptus filamentoso. Según este autor los efectos de P_4 están



directamente ligados al embrión o su desarrollo está mediado únicamente a través de cambios inducidos en el endometrio". (Clemente *et al.*, 2009)

La administración exógena de progesterona no interfiere en la capacidad el cuerpo lúteo para producir progesterona. Woody y col. (1967), mencionan que la P4 administrada al principio del ciclo estral de la oveja acorta la vida del cuerpo lúteo, y para producir este efecto su acción sería luteotrópica o luteolítica. Estos autores indican además, que la aplicación de P4 en el ciclo estral causará variación en la concentración de progesterona periférica durante el desarrollo del cuerpo lúteo, disminución de los niveles periféricos de LH, o aumento temprano en las concentraciones de PGF en el útero. (Woody, First & Pope, 1967)

2.12. Histotrofo

Las secreciones uterinas son necesarias para el crecimiento de los blastocitos, tomando en consideración de que en los rumiantes el *conceptus* se encuentra libre en el lumen uterino antes de la implantación. Las proteínas contenidas en la secreción endometrial son de vital importancia para su desarrollo. Se desconoce la función de algunas, debido a su complejidad y origen de las mismas. (Torres, 2013)

Según Kayserly col. (2006) mencionado por (Torres, 2013) existen proteínas que han sido reconocidas, como la úteroferrina y la proteína unida al retinol, las cuales participan como fuente de hierro y retinol para el concepto, además de las serpinas y algunos factores de crecimiento. De manera que la P4 es esencial en la fase de implantación al estimular la producción de proteínas endometriales o histotrofo. (Torres, 2013)

2.13. Interferón TAU

El interferón o proteína trofoblástica (INT-t), favorece los procesos luteotrópicos funcionales y estructurales, garantizando la producción de progesterona y la integridad de las células que constituyen el cuerpo lúteo. El reconocimiento materno embrionario



es uno de los eventos de mayor importancia en la reproducción. Este proceso está regulado por múltiples señales celulares y endocrinas, entre el embrión, el endometrio y el cuerpo lúteo. (Yasser *et al.*, 2010)

Durante este proceso el embrión secreta interferón TAU (IFN – t), el cual determina su presencia en el tracto reproductivo materno con el fin de inhibir la luteólisis provocada por la $PGF_{2\alpha}$ sobre el CL. La secreción de esta proteína está estimulada por la acción de la LH y es indispensable para el mantenimiento de la gestación (Yasser *et al.*, 2010). Una de las principales causas para la pérdida embrionaria temprana es la respuesta inadecuada en el endometrio ante el INT-t, lo cual trae como consecuencia un aumento de la síntesis y la secreción en pulsos de la PGF_{2a} , que induce los procesos luteolíticos. (Yasser *et al.*, 2010)

El endometrio está constituido por dos tipos de células: las endometriales epiteliales (CEEP) y las endometriales estromales (CEES); en éstas células se encuentra un receptor para PGE_2 , la cual protege al CL de la acción luteolítica de la $PGF_{2\alpha}$ Hashizumey col. (2006). El INT-t interfiere en la secreción y activa mecanismos como el que lleva a cabo la PGE_2 . (Yasser *et al.*, 2010)

El IFN – t actúa a nivel del epitelio uterino suprimiendo la transcripción de los genes para los receptores de estrógenos y oxitocina, bloqueando los mecanismos luteolíticos como la liberación de los pulsos de PGF_{2a} , sin afectar la expresión del receptor para P4. El mantenimiento de la secreción de P4 por el CL, asegura el establecimiento y mantenimiento de la preñez. (Yasser *et al.*, 2010)

2.14. Estrés

El estrés se considera como aquella alteración de la homeostasis, esta puede ser de origen externo o interno que al actuar sobre el individuo afecta y reduce la eficacia de sus sistemas de control (Carabajo, 2011), comprende cambios en la conducta, respuesta inmune, activación del sistema nervioso autónomo (incremento de la frecuencia cardíaca) y en la activación del eje hipotálamo-pituitario-adrenal (Arias & Velapatiño, 2015); como consecuencia a estas alteraciones fisiológicas ocurren pérdidas



reproductivas y productivas (Carabajo, 2011). Situaciones de estrés contribuyen con la aparición de anestro que causa infertilidad. Durante este proceso existe depresión temporal o permanente de la actividad ovárica, principalmente en la función lútea asociada a cambios estacionales, físicos y deficiencias nutricionales. (Hernández & Zarco, 1998)

La activación del eje hipotálamo hipófisis adrenal (HHA), inducen la secreción de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) desde el hipotálamo, que a su vez estimula la hipófisis que secreta hormona adenocorticotropica (ACTH), al mismo tiempo se estimula la secreción de glucocorticoides en la corteza adrenal, que afecta de modo significativo el funcionamiento reproductivo. Dicho eje puede inhibir la secreción de GnRH desde el hipotálamo, la LH desde la hipófisis y la producción de estradiol folicular. (Álvarez, 2007)

2.15. Cortisol

El cortisol y otros corticosteroides son transportados en la sangre de manera libre o unida a globulinas específicas como la transcortina. Su catabolismo se lleva a cabo principalmente en el hígado, aunque también ocurre en el riñón, tejido conectivo, fibroblastos, y músculo. En el intestino estos metabolitos pueden ser reabsorbidos por la circulación enterohepática, desconjugados y separados por las bacterias de la flora intestinal, y eliminados por las heces (Brousset *et al.*, 2005). Metabolito que es eliminado entre 8 – 16 horas (Bertulat, 2013). Los glucocorticoides son rápidamente eliminados de la circulación y la vida media es de 80 a 120 minutos. (Brousset *et al.*, 2005)

En los ovinos los niveles basales varían de 10 a 40 nmol/L y bajo estímulo de la ACTH pueden llegar a aproximadamente 350 nmol/L (Agazzi & Fernández, 2005), en heces corresponde a 2,21 nmol/kg de heces (Mostl *et al.*, 2005).

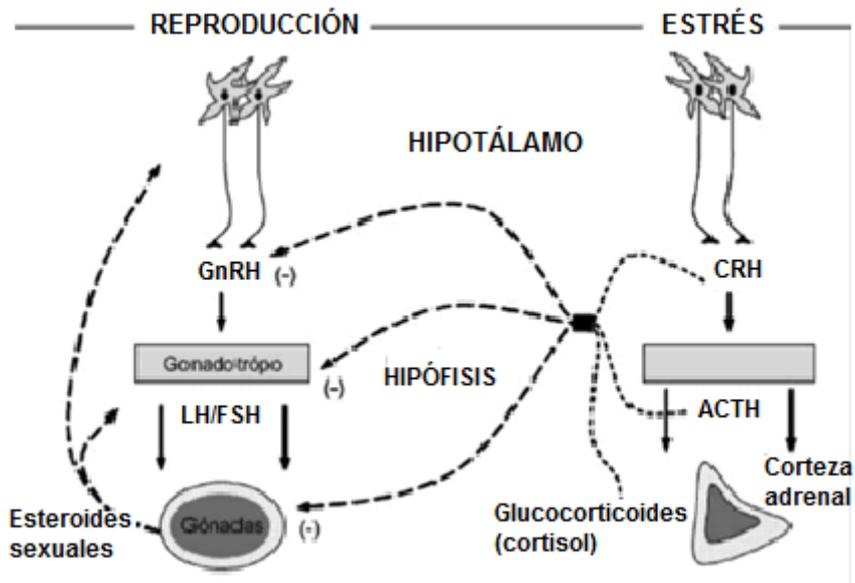


Figura 7. Sitios del eje hipotálamo – hipófisis – gónadas (HHG) en donde el estrés afecta negativamente a la secreción de GnRH, gonadotropinas y esteroides sexuales.

Fuente: Vélez & Uribe (2010)



CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

Materiales Biológicos

- 21 ovejas
- 3 carneros

Materiales Físicos

- Equipo de cirugía
- Calibrador o vernier
- Pistola de inseminación
- Sonda Foley
- Caja Petri Bolsca

Fármacos utilizados

- Acepromacina (Acedan[®])
- Lidocaína
- Oxitetraciclina + Flunixin (Oxiter[®])
- Progesterona natural (Progestar[®] 25mg/ml)
- Progesterona larga acción (Progesterona MAD-4[®] 25 mg/ml)
- Progestágenos sintéticos (Acetato de medroxiprogesterona)
- Hormona folículo estimulante (Folltropin[®])
- Gonadotrofina coriónica equina (Folligon[®])
- Prostaglandinas (Lutalyse[®])
- Vitaminas, antibióticos y antiparasitarios

3.2. Método

3.2.1. Área de Estudio

La investigación se realizó en la granja Irquis de la Universidad de Cuenca, ubicada en la parroquia Victoria del Portete, cantón Cuenca, provincia del Azuay, en el km 23 vía Girón, coordenadas: 3044181 S y 79040813 O, encontrándose a 2.714 msnm con una temperatura variante entre 9 y 22°C. La humedad relativa es del 80% y presenta una pluviometría de 800mm a 2.000mm. La superficie destinada a los animales experimentales fue de aproximadamente una hectárea. El estudio se llevó a cabo en los meses de octubre y diciembre del 2015.



Figura 8. Hacienda Irquis

Fuente: Google earth (2016)

El análisis de progesterona plasmática (P4) se realizó en el laboratorio CENBIOCLI S.A ubicado en las calles Francisco Moscoso en el Edificio Torres del Yanuncay de la ciudad de Cuenca; el análisis de cortisol y progesterona en las heces se realizó en el laboratorio del Dr. Rupert Palme. Department of Biomedical Sciences/Biochemistry, University of Veterinary Medicine Vienna, Austria.



3.2.2. Unidad de análisis

Se utilizaron 21 ovejas consideradas como unidades experimentales, las cuales fueron seleccionadas de acuerdo a una condición corporal entre 3 a 3,5, un peso promedio de 42 Kg , una edad entre 12 meses a 6 años, clínicamente sanas y todas adaptadas a un mismo manejo, alimentación y sanidad en la granja Irquis. Se excluyeron a aquellos animales que mostraron anormalidades durante el proceso de adaptación en el experimento.

Las ovejas fueron divididas aleatoriamente en tres grupos experimentales T1 (n=7) grupo control; un segundo tratamiento T2 (n=7) tres dosis de P4 los día 2,3,4 post IA; que recibieron P4 exógena los días 2 y 4 post-IA; y T3 (n=7), única dosis de P4 en el día 2 post-IA.

En cada grupo se evaluó el tamaño de CLs, número y tamaños de embriones, niveles de cortisol y P4 en heces a los 2 – 5 días post-inseminación y el nivel de P4 plasmática en el día 13.



3.3. Metodología

3.3.1. Selección de animales

El periodo experimental inició con 21 ovejas de raza correidale, seleccionadas de acuerdo a los criterios anteriormente descritos.

Se dividió a los animales en siete bloques homogéneos, los cuales fueron conformados por siete individuos cada uno. Para esto se consideró peso, edad y condición corporal, siendo repartidos en los mismos los tres tratamientos aplicados. Con la finalidad de facilitar el manejo y la aplicación de los diferentes protocolos realizados.

Tabla N° 1. Distribución de bloques

BLOQUE 1	BLOQUE 2	BLOQUE 3	BLOQUE 4	BLOQUE 5	BLOQUE 6	BLOQUE 7
T1	T3	T2	T1	T3	T2	T1
T2	T1	T3	T2	T1	T3	T2
T3	T2	T1	T3	T2	T1	T3

Fuente: Las autoras

3.3.2. Adaptación

Las ovejas fueron adaptadas a las condiciones de sanidad, nutrición, y manejo de la Granja Irquis por 60 días antes de iniciar el estudio. Se realizó la inmunización de las mismas, mediante la aplicación de una bacterina triple (Sintosep[®]), adicionalmente se las desparasitó con antihelmínticos en dosis de 10mg/kg (Albenzazol 2,5%[®]) + levamisol dosis 5mg/kg (Levamisol 15% Genfar[®]), así como también se aplicó vitaminas (AD₃E). Durante este periodo se realizó la esquila, acondicionamiento de pezuñas y chequeos reproductivos (ecografía) para descartar hembras gestantes.



También se aplicó 0.5 ml de prostaglandina (decloprostenol - Lutalyse®) para finalizar las eventuales gestaciones no detectadas. El rebaño se alimentaba al pastoreo en un potrero compuesto por kikuyo, raygrass y trébol; y por las noches se las trasladaba al establo (25m²).

3.3.3. Preparación

En esta etapa se administró un flushing alimenticio de 10 días en cuya fórmula había maíz, afrecho, soya, melaza, prebióticos, antibióticos, tenía un contenido de proteína entre 14 y 16 %. Además la dieta fue enriquecida con sales minerales (Suprafost®) y se les ofreció agua a voluntad.

La dieta brindada fue específicamente de mantenimiento. La cantidad que se dispuso diariamente a cada oveja fue de 200 gramos.

La importancia de haber suministrado esta dieta rica en proteína y energía radicó en que incrementa la producción de gonadotrofinas, el crecimiento folicular y la tasa ovulatoria, y mejorando la implantación del embrión (Núñez & Alcáraz, 2013).

3.3.4. Sincronización de celo y superovulación

Para la sincronización de celo se aplicó un dispositivo intravaginal (esponja de poliuretano impregnada con 60mg de acetato de medroxiprogesterona), a la cual se le adiciono 2,5 ml (500 miligramos) de oxitetraciclina al 20% con la finalidad de prevenir infecciones intravaginales, tomando en consideración la asepsia durante el proceso de inserción. El dispositivo intravaginal fue retirado a los 12 días después de su colocación.

La superovulación se inició 10 días después de la colocación del dispositivo intravaginal. Para este proceso las 21 ovejas fueron separadas en 2 grupos, a el primer grupo G1 (n=11) se les administró gonadotrofina coriónica equina (eCG – Folligon®), y el segundo grupo G2 (n=10) hormona folículo estimulante (FSH – Folltropin®).

3.3.4.1. Superovulación con eCG

En este protocolo se aplicó 1000 UI (5ml) de eCG (Folligon®) IM en el día 10 posterior a la colocación del dispositivo intravaginal, más 500 UI en el día 12 que coincidió con el retiro del dispositivo, se aplicó una dosis de 100 μ cg de D-cloprostenol (CICLASE DL®)

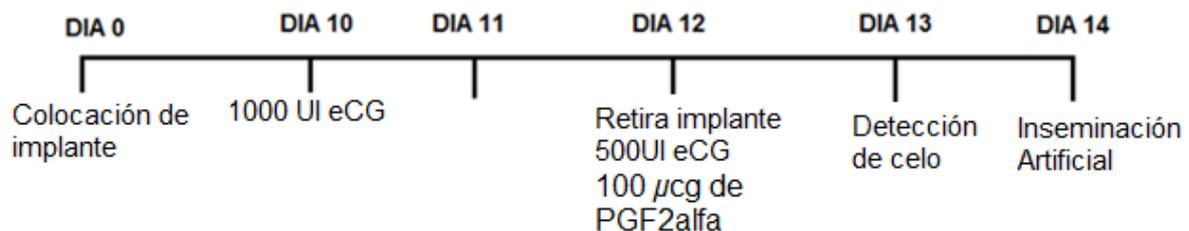


Figura 9. Protocolo de superovulación con eCG

Fuente: Las autoras

3.3.4.2. Superovulación con FSH

Este proceso consistió en la aplicación de 6 inyecciones de FSH (Folltropin®), empleando dosis decrecientes cada 12 horas durante 3 días. Se inició con una dosis de 20 mg el primer día, 16 mg el segundo día y 14 mg el tercer día (día 0, colocación del dispositivo intravaginal). Paralelamente a la penúltima dosis de FSH, se aplicaron 500 UI de eCG (Folligon®), y una dosis luteolítica de D-cloprostenol (CICLASE DL®) y se retiró del dispositivo (Tabla 1).

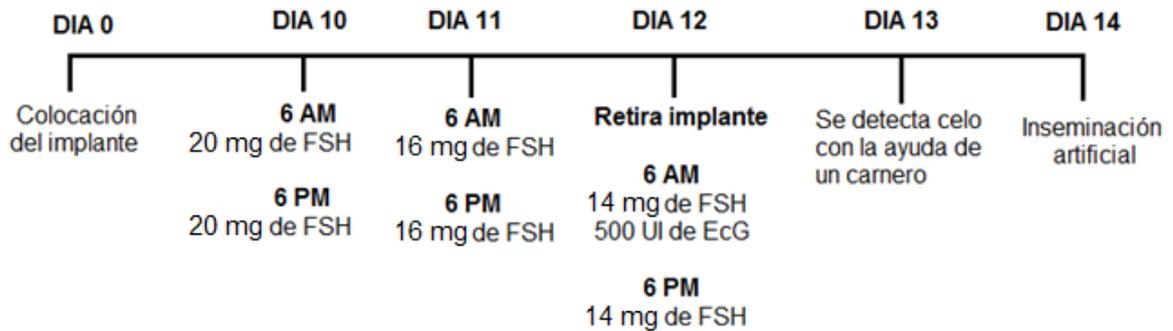


Figura 10. Protocolo de superovulación con FSH

Fuente: Las autoras

3.3.5. Colección del semen

Para este proceso se empleó el semen de 2 carneros, el cual fue colectado mediante el uso de una vagina artificial (VA). Estos reproductores fueron adaptados a esta técnica dos meses antes de iniciar la sincronización de celo de las ovejas. La VA consistió en un tubo de propileno térmico (17cm x 5,5 cm), y una camisa interna de látex, dentro de la que se adicionó un volumen de 40 – 60ml de agua a 40°C, que sirvió para provocar la estimulación térmica y mecánica de la eyaculación. El semen fue colectado en un tubo Falcom plástico de 15 ml adaptado al final de la VA.

Se analizó la calidad de los eyaculados, considerando parámetros como volumen (0,5 a 1 ml), motilidad masal (MM): ≥ 3 , motilidad individual progresiva (MIP): $\geq 70\%$, concentración: $\geq 1600 \times 10^6$ esp/ml, vitalidad: $\geq 70\%$, espermatozoides normales: $\geq 70\%$, e integridad de la membrana espermática por HOS-Test: $\geq 70\%$; según Galarza *et al.*, (2015). Se excluyeron los eyaculados que no cumplían estas características seminales.

Luego de su recolección y evaluación, el semen es apto para la IA, por lo que se le mantuvo temperado a 37°C y protegido de los cambios bruscos de temperatura, contacto con el agua y metales, radiación solar directa, e impurezas.

3.3.6. Inseminación Artificial

Esta etapa se desarrolló 48 horas luego del retiró del dispositivo intravaginal.

Se separó al primer grupo de hembras (G1), y se las inseminó con el uso de una pistola dosificadora, con una dosis de 200×10^6 espermatozoides de semen fresco por cada oveja. Con la hembra correctamente sujeta, se procedió a insertar el especulo en el interior de la vagina, a través de la cual se visualizó el cérvix y a continuación se depositó el semen a nivel transcervical. El mismo procedimiento fue aplicado al segundo grupo (G2) de animales.

3.3.7. Aplicación de progesterona exógena

Para la aplicación de progesterona, las ovejas fueron divididas en tres grupos de acuerdo a cada tratamiento, T1 (n=7) identificadas con cinta azul y consideradas como grupo control; T2 (n=7) identificadas con cinta rosada, a las cuales se le administró 6 mg de P4/día (IM) los días 2,3 y 4 post-IA; T3 (n=7), identificadas con cinta verde, a las cuales se les aplicó 18 mg/oveja (SC) de P4 en el día 2 post-IA.

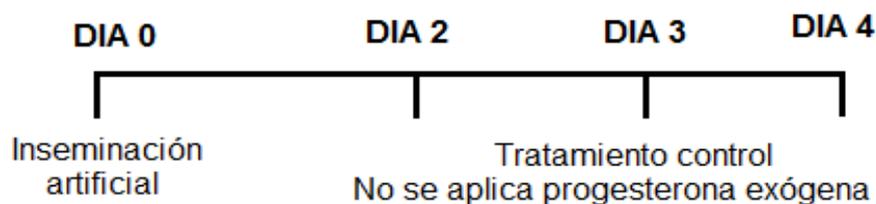


Figura 11. Tratamiento control

Fuente: Las autoras

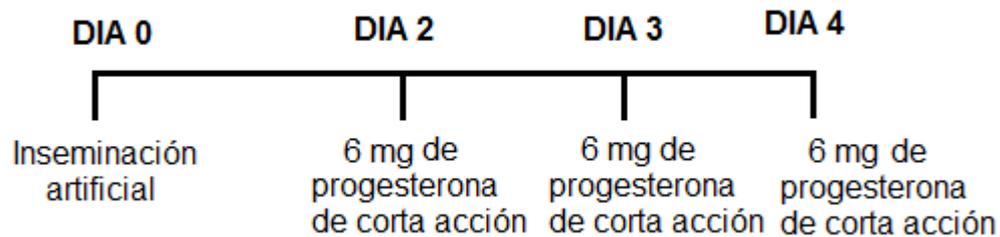


Figura 12. Tratamiento N° 2: aplicación de P₄ corta acción en el día 2, 3 y 4 post inseminación

Fuente: Las autoras

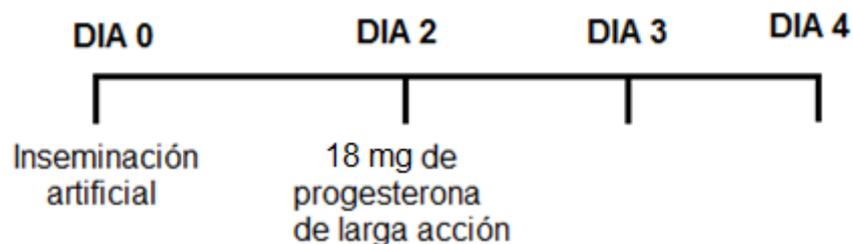


Figura 13. Tratamiento N° 3: aplicación de P₄ MAD – 4 de larga acción en el día 2 post inseminación

Fuente: Las autoras

3.3.8. Recolección de muestras de heces

Para la colecta de heces se procedió de la siguiente manera:

- 1- Aquellas muestras en las que se analizaron los niveles de cortisol, fueron tomadas a las 8 horas después de la aplicación de progesterona exógena ya que la aparición de este metabolito se excreta en ese tiempo en materia fecal. (Möstl *et al.*, 2002)
- 2- Las destinadas a determinar progesterona, se tomaron por la mañana a partir de las 24 horas de la aplicación de la progesterona inyectable. (Brousset *et al.*, 2006)



Se colectaron 10 gramos de heces por animal en bolsas plásticas debidamente etiquetadas, que posteriormente fueron congeladas durante un mes a una temperatura de -20°C hasta su análisis en el laboratorio.

3.3.9. Medición de Cuerpo Lúteo y Colecta de embriones

La medición de CL y colección de embriones se llevó a cabo en dos etapas: la primera se realizó en día 7 post inseminación a un grupo de 10 hembras ovinas en el cual estaban representados los tres tratamientos y la segunda, se llevó a cabo en el día 13 post inseminación con el grupo de 11 ovejas restantes en el cual constaban también los tres tratamientos.

Para realizar las mediciones de los CLs y embriones se llevó a cabo una cirugía por laparotomía medial, con la ayuda de una camilla que posicionó a la oveja en decúbito supino. Una vez que la hembra se encontraba lista y con las extremidades sujetas en la camilla, se procedió a incidir y exponer los cuernos y ovarios, y se analizó la respuesta que tuvieron al tratamiento aplicado, midiendo en milímetros el diámetro mayor de los cuerpos lúteos observados, mediante un calibrador o vernier.

Los animales tuvieron un periodo de ayuno de 12 horas previo a la cirugía. Una vez llegado el momento de la misma, las ovejas fueron tranquilizadas con acepromacina (Acedan[®]) en dosis de 0,3mg por oveja, y así poder continuar con la tricotomía y embrocado. Ingresaron al quirófano instalado en la granja Irquis considerando las normas generales de asepsia, y una vez en la camilla, se aplicó 10 ml de lidocaína (lidocaína 2%) en la zona donde se iba a realizar la incisión. Antes de la cirugía se inyectó oxitetraciclina y flunixin (Oxiter[®]) en dosis de 20mg/Kg de peso vivo.

La colecta de embriones se realizó mediante lavados sucesivos de los cuernos uterinos con el uso de fosfato buffer salino (1000ml de NaCl con 10ml de albúmina sérica bovina BSA) introducido en la región de unión útero tubárica y recogido en el extremo opuesto del cuerno mediante una sonda tipo Foley N°10 colocada en la zona de la división cornual. El líquido obtenido (alrededor de unos 40 ml por cuerno) fue



colocado en una placa para realizar la búsqueda de embriones bajo lupa estereoscópica. Durante este proceso, se aplicó una solución de NaCl con 300uL de heparina para evitar coágulos y adherencias a nivel visceral. A las soluciones usadas en este proceso se las mantuvo a una temperatura de 37°C con la ayuda de un baño María. Al día 13 se tomó una muestra de sangre a cada oveja utilizada en el experimento con la finalidad de medir la funcionalidad del cuerpo lúteo.

3.3.10. Deshidratación de las muestras de heces

Para este proceso se seleccionaron 3 ovejas por cada tratamiento (3 muestras para cortisol y 3 muestras para progesterona por cada tratamiento), representando un total de 72 muestras. Estas muestras congeladas fueron deshidratadas en horno microondas durante 5 minutos, y el polvo obtenido fue conservado en tubos Falcon de 15ml hasta proseguir con la etapa de extracción de lípidos. (Palme et al. 1996; Palme, 2005).

Una vez finalizados los 5 min de desecado, se pesó el polvo restante y se repitió durante dos minutos más el secado y su pesaje respectivamente. Si no hubo diferencias entre ambos pesajes, las muestras fueron colocadas en los tubos. (Palme et al. 1996; Palme, 2005).

3.3.11. Extracción de Lípidos

Para este proceso se utilizó una balanza electrónica, se pesó 200mg de muestra, que a continuación fue colocado en tubos falcon graduados de 15 ml, luego a cada tubo se añadió 5ml de metanol al 80%, para posteriormente ser agitados en un vórtex durante 3 minutos, logrando así una mezcla homogénea, a la cual se la colocó en la centrífuga durante 15 minutos a una velocidad de 4000 revoluciones por minuto. (Palme *et al.*, 2013)



Finalizada la centrifugación, se procedió a extraer la parte líquida y se trasvasó a un segundo tubo falcon graduado, al que nuevamente se lo centrifugó durante otros 5 minutos con el fin de que no existan sólidos presentes en la muestra (Palme *et al.*, 2013).

Empleando una pipeta de 200 y 50 microlitros, se tomó 500ul del sobrenadante y se colocó en un tubo eppendorf de 1,5 ml, el cual fue correctamente identificado para el metabolito a ser analizado (cortisol – progesterona), dejándolo evaporar a temperatura ambiente durante tres días. (Palme *et al.*, 2013). Se repitió el mismo procedimiento para cada muestra. Consecutivamente, las muestras fueron analizadas mediante un kit específico para medir metabolitos de cortisol (36) y progesterona (36). Este dosaje se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Rupert Palme (Department of Biomedical Sciences/Biochemistry, University of Veterinary Medicine Vienna, Austria).

3.3.12. Variables en estudio

1. **Independientes:** T1 (control), T2 (P4 aplicada día 2, 3,4), T3 (P4 larga acción aplicada en día 2).
2. **Dependientes:** niveles de cortisol y progesterona en heces (ng/g), niveles de progesterona en sangre al día 13 (ng/ml), cantidad y tamaño de cuerpos lúteos (mm), y tamaño y cantidad de embriones (mm).

3.3.13. Operacionalización de las variables

	VARIABLES	DIMENSIÓN	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN
INDEPENDIENTE	X1 Tratamientos	Diferentes dosis de P ₄ utilizadas en grupos de ovejas.	T1: Sin P ₄	Control: 0 mg de P ₄
			T2: P ₄ día 2,3 y 4.	6 mg diarios
			T3: P ₄ LA en día 2	18 mg una sola dosis
DEPENDIENTES	Y1 = Nivel de cortisol y P ₄	Concentraciones de cortisol y P ₄ en heces por cada tratamiento.	Heces	Cantidad de cortisol en ng/g
	Y2 = Nivel de P ₄	Concentración de P ₄ plasmática, en cada tratamiento	Sangre	Cantidad d P ₄ plasmático en ng/ml
	Y3 = Cantidad y tamaño Cuerpo lúteo	Tamaño y número de cuerpos lúteos en cada tratamiento	Diámetro CL	Tamaño en mm
	Y4 = Cantidad y tamaño del Embrión	Tamaño, número y calidad embrionaria por cada tratamiento.	Diámetro del Embrión	Tamaño en mm

3.3.14. Diseño experimental y pruebas estadísticas

Se usó un diseño de bloques al azar (DBA), con tres tratamientos y 7 bloques; cada bloque tenía tres ovejas de cada tratamiento, conteniendo un total de 21 animales en estudio.

Los resultados obtenidos fueron sistematizados en Excel y analizados en el software estadístico SPSS versión 22.0. Al tratarse de variables paramétricas tipo continuas se aplicaron los Test estadísticos de Shapiro Wilk para normalidad y de Levene para homogeneidad de las varianzas. Posteriormente se aplicó un análisis de varianza ANOVA y Kruscall Wallis para comprobar significancia y una prueba de Bonferroni 5% para comparar eficacia entre tratamientos.



CAPITULO IV: RESULTADOS

4.1. Progesterona día 13

Se realizó la prueba de Shapiro Wilk (Anexo 8) y Levene (Anexo 9), los valores obtenidos para T1 y T2 cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad respectivamente, mientras que el T3 no cumplió; por tal motivo fue necesario realizar pruebas adicionales de ANOVA (Anexo 10) y Kruscal Wallis (Anexo 11). En la Tabla 2 y Figura 15 se muestran los valores promedios y el error estándar de la concentración de P4 plasmática (ng/ml) al día 13 luego de la IA en los tres tratamientos. Puede observarse que aunque los promedios fueron estadísticamente similares ($P>0,05$), la concentración de P4 fue 6,8 y 5,9 ng superior en el grupo control que en los grupos 2 y 3 respectivamente.

Para esta variable se consideraron las 21 ovejas del experimento.

Tabla 2. Valores promedio y error estándar de la progesterona plasmática en el día 13 post-inseminación.

Variable	$\bar{X} \pm EE$ (ng/ml)
P4 en el día 13 luego de la IA	T1 17,3 \pm 6,45 ^a
	T2 10,5 \pm 4,86 ^a
	T3 11,4 \pm 5,60 ^a

\bar{X} = Media; EE= Error estándar; T1=grupo control; T2= 6 mg de P4 en el día 2,3 y 4 post-IA; T3= 18 mg de P4 en el día 2 post-IA. Letras distintas en cada columna muestran diferencias significativas, según ANOVA ($P>0,05$).

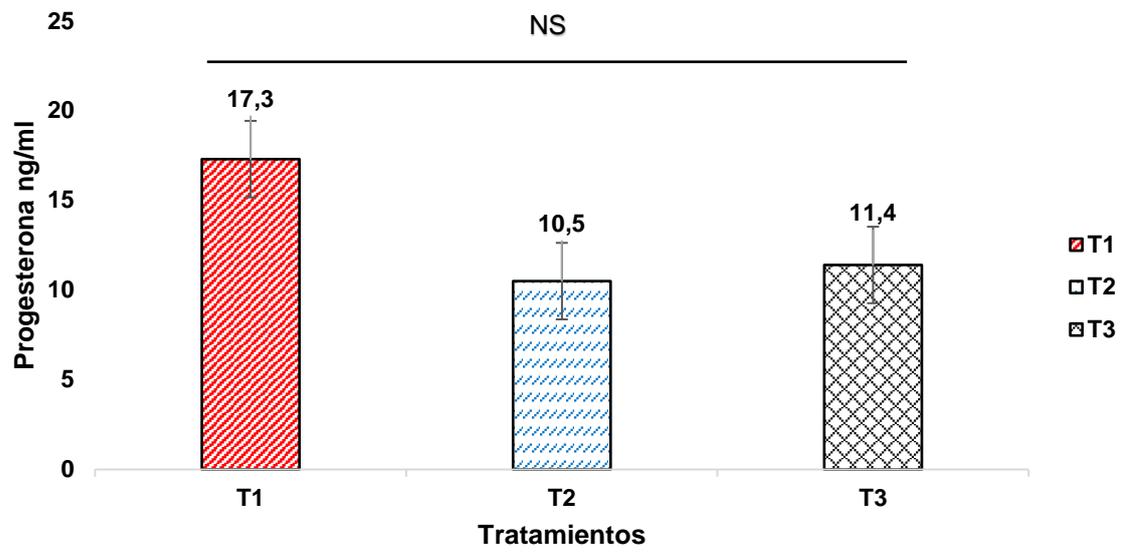


Figura 14. Valores promedios del nivel de progesterona sérica en ng/ml del día 13 por tratamientos (T1: control, T2: P4 aplicada día 2,3, y 4 post-IA, T3: P4 larga acción aplicada en día 2 post-IA).



4.2. Número y tamaño de cuerpos lúteos

Los resultados obtenidos para número y tamaño de cuerpo lúteo en el día 7, demostraron normalidad y homogeneidad respectivamente. (Anexo 12) (Anexo 13) Consecutivamente se aplicó un ANOVA (Anexo 14), las cuales demostraron que no existieron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre grupos. La tabla 3 indica los valores promedios y error estándar ($\bar{X} \pm EE$) del tamaño y número de cuerpos lúteos al día 7 por tratamiento. El análisis estadístico no detectó diferencias estadísticas ($P > 0,05$) entre grupos.

Para el análisis de esta variable se excluyeron aquellas ovejas que no respondieron al tratamiento superovulatorio. Llama la atención la gran variabilidad que muestra el error estándar detectados en los tratamientos.

Tabla 3. Valores promedios y error estándar del número y tamaños de los CL al día 7.

Estadísticos descriptivos al día 7 CL				
Tratamientos		N	Media	Error estándar
Número de CL	T1	3	8,3	1,45
	T2	2	7,5	4,50
	T3	2	22,0	18,00
Tamaño de CL	T1	3	9,2	0,92
	T2	2	7,7	1,71
	T3	2	6,9	1,69

EE: Error estándar; T1: grupo control; T2: 6 mg de P4 en el día 2,3 y 4 post-IA; T3: 18 mg de P4 en el día 2 post-IA. No existieron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos para ninguna de las variables ($P > 0,05$)

En la Figura 15, se observa el número promedio de cuerpos lúteos encontrados en cada tratamiento al día 7, como se indicó anteriormente (Tabla 3) no se encontraron diferencias estadísticas entre tratamientos.

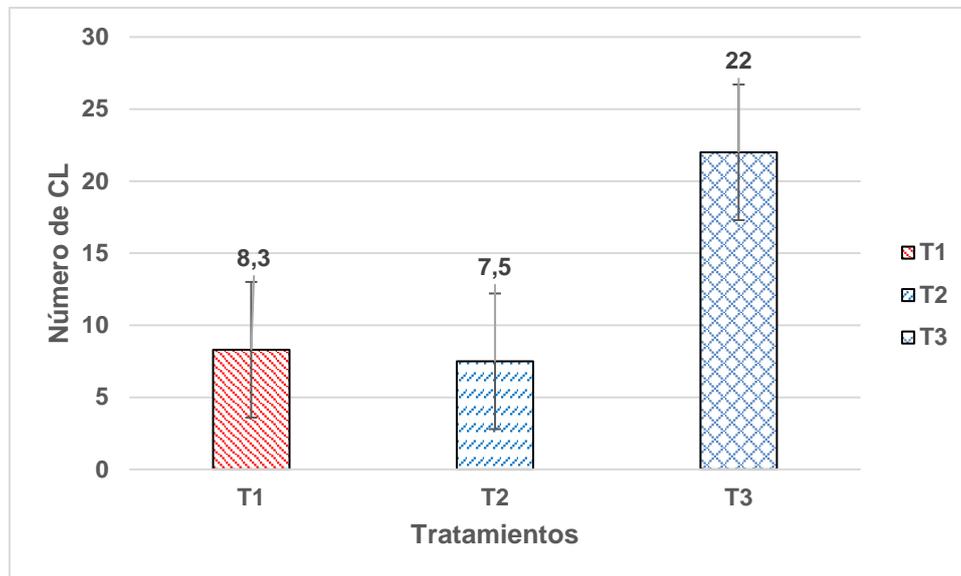


Figura 15. Valores promedios del número de CL por tratamientos al día 7 (T1: control, T2: P4 aplicada día 2, 3, 4 post-IA, T3: P4 de larga acción aplicada en día 2 post-IA)

En la Figura 16, se observa el tamaño (mm) promedio de cuerpos lúteos de cada tratamiento al día 7, comprobando que no existen diferencias significativas entre tratamientos.

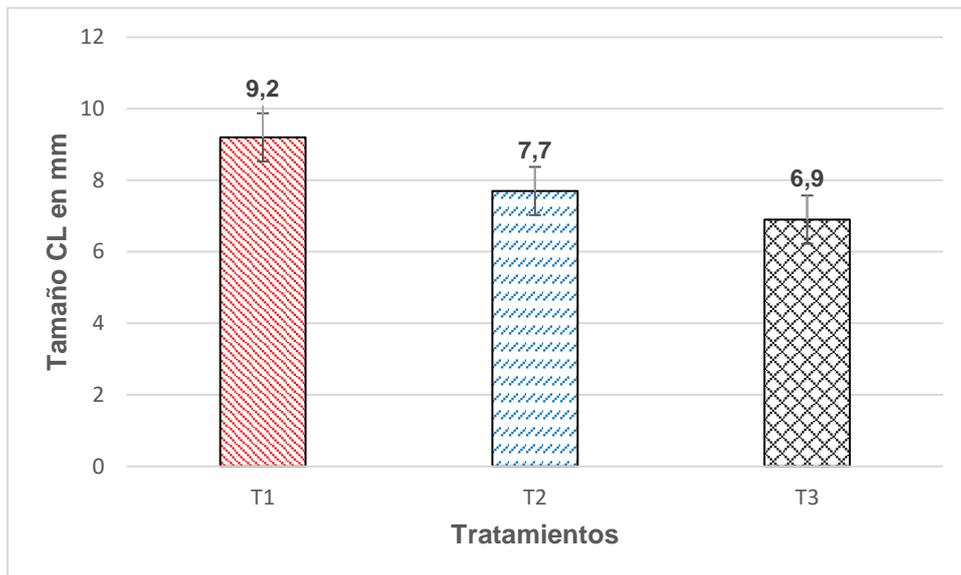


Figura 16. Valores promedios del tamaño en mm de CL por tratamientos al día 7 (T1: control, T2: P4 aplicada día 2, 3, 4 post-IA, T3: P4 de larga acción aplicada en día 2 post-IA)



Los resultados obtenidos para número y tamaño de cuerpo lúteo en el día 13, demostraron normalidad y homogeneidad respectivamente. (Anexo 16) (Anexo 17) Consecutivamente se aplicó un ANOVA (Anexo 18), las cuales demostraron que no existieron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre grupos. La tabla 4 indica los valores promedios y error estándar ($\bar{X} \pm EE$) del tamaño y número de cuerpos lúteos al día 13 por tratamiento. El análisis estadístico no detectó diferencias estadísticas ($P > 0,05$) entre grupos.

Para el análisis de esta variable se excluyeron aquellas ovejas que no respondieron al tratamiento superovulatorio. Se observa que existe gran variabilidad en el error estándar obtenido en cada tratamiento.

Tabla 4. Valores promedios y error estándar del número y tamaños de los CL al día 13.

Estadísticos descriptivos para CL día 13				
		N	Media	Error estándar
Número CL	T1	3	7,0	2,52
	T2	2	3,0	0,00
	T3	2	3,0	1,00
Tamaño CL	T1	3	6	1,2
	T2	2	8	0,8
	T3	2	8	1,8

EE: Error estándar; T1: grupo control; T2: 6 mg de P4 en el día 2,3 y 4 post-IA; T3: 18 mg de P4 en el día 2 post-IA. No existieron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos para ninguna de las variables ($P > 0,05$)

En la Figura 17, se observa el número promedio de cuerpos lúteos encontrados en cada tratamiento al día 13, y se comprobó que no existieron diferencias estadísticas entre tratamientos.

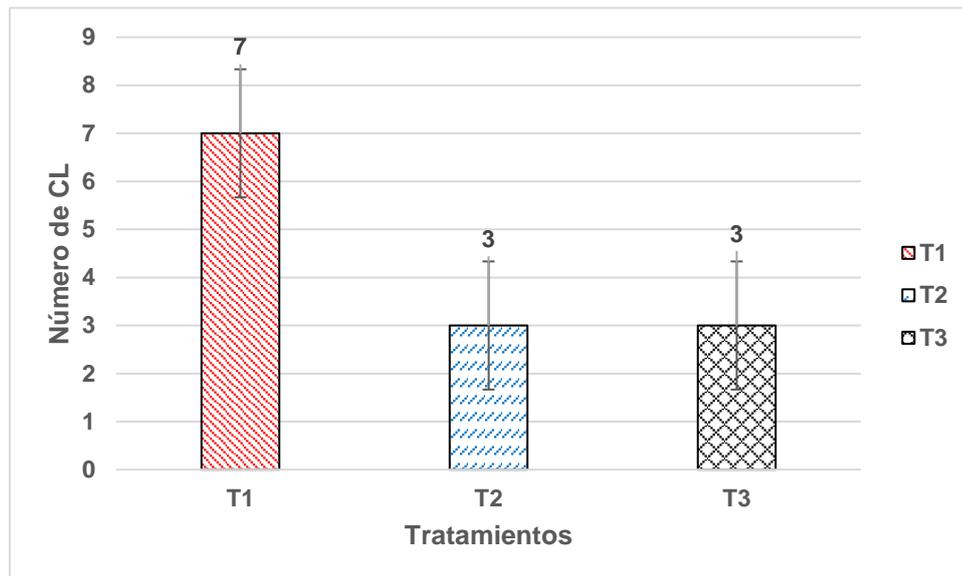


Figura 17. Valores promedio del número de CL por tratamientos al día 13
(T1: control, T2: P4 aplicada día 2, 3, 4 post-IA, T3: P4 de larga acción aplicada en día 2 post-IA)

En la Figura 18, se observa el tamaño (mm) promedio de cuerpos lúteos de cada tratamiento al día 13, comprobando que no existen diferencias significativas entre tratamientos.

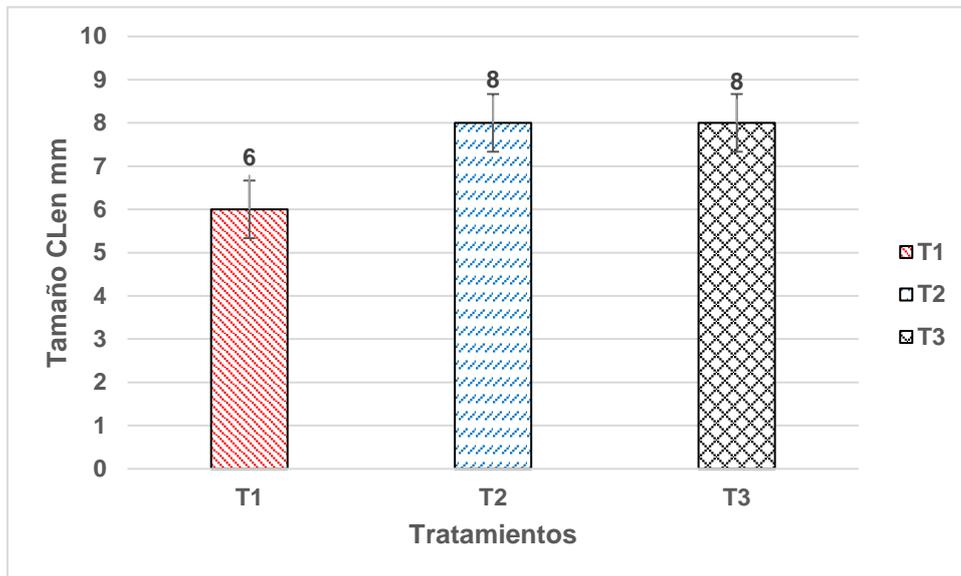


Figura 18. Valores promedios del tamaño en mm de CL por tratamientos al día 13 (T1: control, T2: P4 aplicada día 2, 3, 4 post-IA, T3: P4 de larga acción aplicada en día 2 post-IA)



4.3. Cortisol en heces

Los resultados obtenidos en la medición de los niveles de cortisol en heces en los días 2, 3, 4 y 5 cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad según las pruebas estadísticas de Shapiro Wilk (Anexo 20) y Levene (Anexo 21).

Para establecer significancia, se aplicó ANOVA (Anexo 22). En la Tabla 5 se muestran los valores promedio y error estándar ($\bar{X} \pm EE$) de los niveles de cortisol en heces por cada tratamiento y de cada día de medición. Aunque la diferencia en los niveles de cortisol entre tratamiento no fue significativo ($P > 0,05$), llama la atención que el grupo control tuvo una concentración promedio durante el período de muestreo de 30 y 28.3 ng/g de heces superior a la de los grupos 2 y 3 respectivamente.

En esta variable se excluyeron aquellas ovejas que no permitieron obtener muestras diarias.

**Tabla 5. Valores promedio y error estándar de la cortisol en heces (ng/g de heces)**

Días de medición cortisol Luego de la IA	Tratamientos	N	$\bar{X} \pm EE$
Día 2	T1	2	97,0 ± 3,40
	T2	4	93,5 ± 16,17
	T3	3	69,3 ± 29,17
Día 3	T1	2	163,5 ± 1,50
	T2	4	131,5 ± 32,70
	T3	3	70,3 ± 25,62
Día 4	T1	2	124,5 ± 55,50
	T2	4	51,5 ± 12,76
	T3	3	103,0 ± 28,58
Día 5	T1	2	89,5 ± 28,50
	T2	4	77,8 ± 4,91
	T3	3	118,7 ± 40,76
Promedio total	T1	8	118,6 ± 17,34
	T2	16	88,6 ± 11,48
	T3	12	90,3 ± 14,91

\bar{X} = Media; EE= Error estándar; T1=grupo control; T2= 6 mg de P4 en el día 2,3 y 4 post-IA; T3=18 mg de P4 en el día 2 post-IA. No existieron diferencias estadísticas significativas, según ANOVA ($P > 0,05$)

En la Figura 19, se observa la concentración de cortisol (ng/g de heces) de cada tratamiento durante los 4 días de muestreo. Como se aprecia en la Figura 20, la concentración de cortisol durante los tres primeros días fue superior en el grupo control que en los tratados con P4.

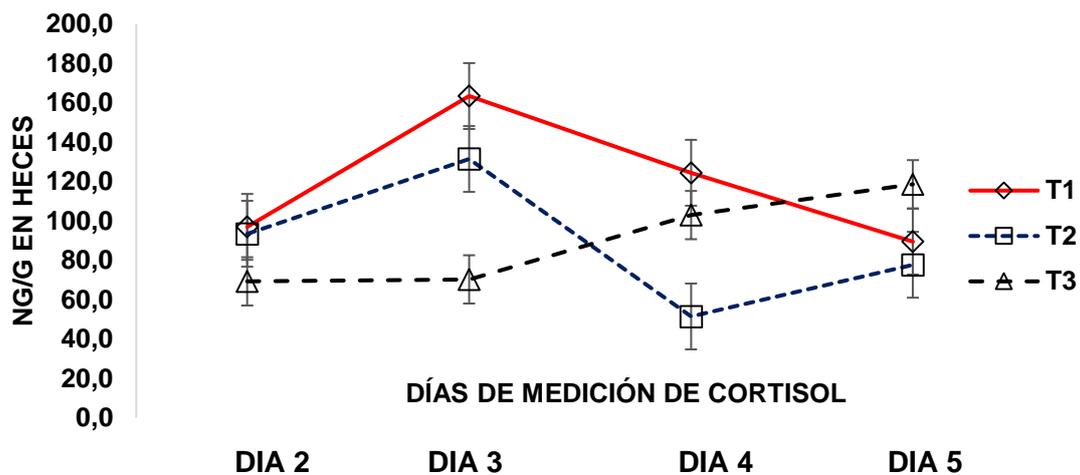


Figura 19. Valores de cortisol en diferentes días de medición por tratamiento (T1: control, T2: P4 aplicada día 2, 3, y 4 post-IA, T3: P4 de larga acción aplicada en día 2 post-IA)



4.4. Progesterona en heces

Los resultados obtenidos en la medición de los niveles de P₄ en heces en los días 2, 3, 4 y 5 cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad según las pruebas estadísticas de Shapiro Wilk (Anexo 24) y Levene (Anexo 25).

Para establecer significancia, se aplicó ANOVA (Anexo 26). En la Tabla 6 se indican los promedios y el error estándar ($\bar{X} \pm EE$) de los niveles de progesterona en heces de los tres tratamientos en cada día de muestreo. El análisis de varianza demostró que no existió diferencia significativa ($P > 0,05$), en la concentración de P₄ entre tratamientos en ninguno de los días de muestreo ni en el valor promedio. Se aprecia una gran variabilidad en la concentración de P₄ en heces, particularmente en los grupos de ovejas tratados con P₄ durante el metaestro temprano.

En esta variable se excluyeron aquellas ovejas que no permitieron obtener muestras diarias.



Tabla 6. Valores promedio y error estándar de la concentración de progesterona en heces durante el período experimental.

Días de medición de P4 luego De la IA	Tratamientos	N	$\bar{X} \pm EE$ (ng/g)
Día 2	T1	2	202 ± 55,00
	T2	4	884,5 ± 538,96
	T3	3	715,3 ± 207,39
Día 3	T1	2	556,0 ± 24,00
	T2	4	1707,5 ± 623,04
	T3	3	1308,3 ± 336,40
Día 4	T1	2	1059,5 ± 304,50
	T2	4	2441,3 ± 1357,98
	T3	3	2318,7 ± 818,94
Día 5	T1	2	1191,5 ± 187,50
	T2	4	2798,3 ± 1400,09
	T3	3	4297,0 ± 1660,80
Promedio días de aplicación	T1	8	639,8 ± 178,08
	T2	16	1957,9 ± 509,96
	T3	12	2159,8 ± 575,53

\bar{X} = Media; EE= Error estándar; T1=grupo control; T2= 6 mg de P4 en el día 2,3 y 4 post-IA; T3= 18 mg de P4 en día 2 post-IA. No existieron diferencias estadísticas significativas, según ANOVA ($P > 0,05$), en ninguno de los días de muestreo.

En la Figura 20, se muestra la concentración de progesterona en heces (ng/g de heces) para cada tratamiento. Como puede observarse, si bien la concentración fecal de P4 no varió estadísticamente entre tratamiento (Tabla 5) fue numéricamente mayor en los grupos 2 y 3 comparado con el control durante todos los días de muestreo.

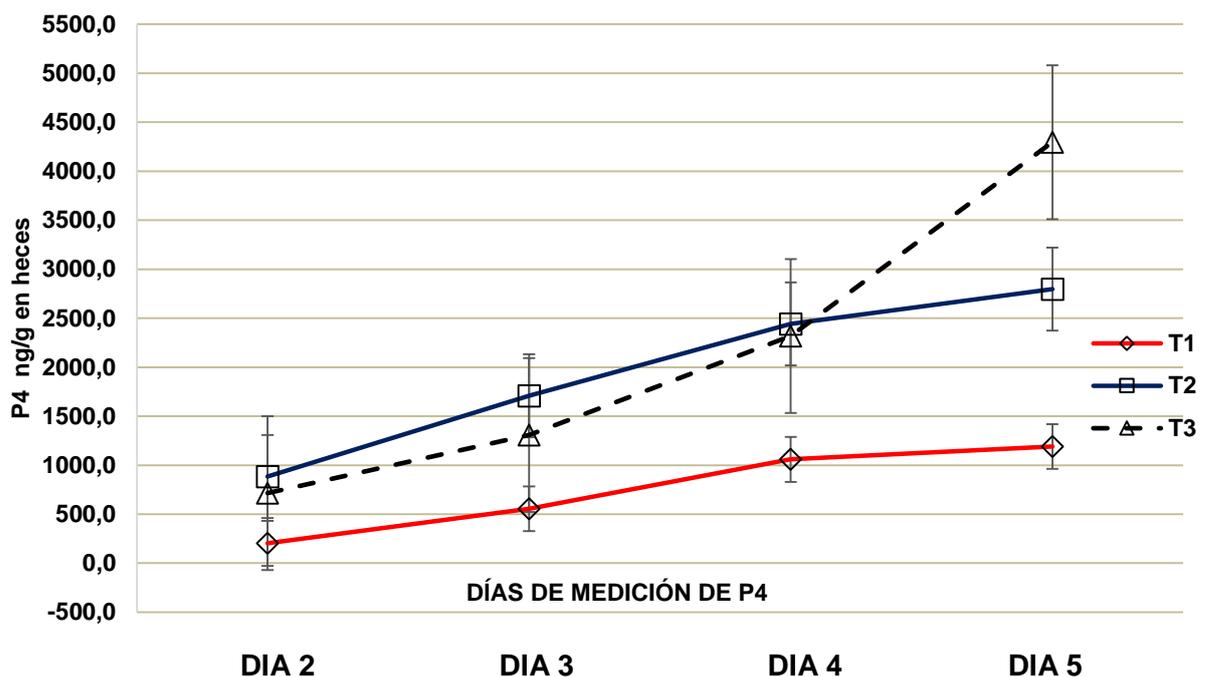


Figura 20. Valores de progesterona por tratamiento en los días de medición por tratamiento (T1: control, T2: P4 aplicada día 2, 3, 4 post-IA, T3: P4 de larga acción aplicada en día 2 post-IA)

4.5. Número y tamaño de embriones

En ésta variable no fue posible realizar el análisis estadístico, descriptivo y de correlación, debido a que no fueron recuperados embriones en ninguno de los tres tratamientos por motivos que serán argumentados en la discusión.



CAPITULO V: DISCUSIÓN

En los ovinos la fertilidad se encuentra afectada por factores inherentes al animal y por aquellos de origen ambiental. Se considera como los más importantes a la estacionalidad reproductiva, el estrés producido durante el manejo y la interacción social en el rebaño (Buratovich, 2010). Estas situaciones de estrés en las hembras con gestaciones tempranas causan infertilidad en gran medida debido a la mortalidad embrionaria que se produce antes de su implante, conociéndose que entre un 25 y 40% de los embriones muere en las tres primeras semanas de vida (González, 1991). En este estudio, se planificó administrar progesterona exógena de acción prolongada durante el metaestro temprano esperando reforzar la función lútea e incrementar los niveles de P₄, de manera de mejorar la sobrevivencia embrionaria. No obstante, los resultados indicaron que la suplementación exógena de P₄ no representó una ventaja sobre el tratamiento control.

Concentración de progesterona en el día 13 post-inseminación

Los niveles de progesterona en sangre en el día 13 se evaluaron para conocer si la aplicación de P₄ exógena de corta (administración diaria por tres días consecutivos) y larga (una sola aplicación) acción en el metaestro temprano producía algún efecto en la función del CL. Se demostró que ambos grupos experimentales se comportaron igual al grupo control dado que las diferencias entre tratamientos fueron no significativas.

Estos hallazgos son similares a los señalados en una investigación previa realizada por Peñaloza y Romero (2016), en la cual tampoco encontraron diferencias significativas ($T_2 = 20.7 \pm 9.4$ y $T_3 = 17.0 \pm 5.6$) en los niveles de P₄ en el día 13 post IA entre las ovejas tratadas con P₄ (inyectadas en días similares a los de este estudio) y las del grupo control. Es probable que en este estudio la variación de los animales que respondieron el tratamiento superovulatorio puede haber influido en la variada respuesta que tuvieron luego de la administración de la P₄ exógena.



Asimismo, Pope et al. (1995), en un estudio en ovejas en donde se administraron dosis crecientes de P4 en los días 2, 3, y 4 luego del celo espontáneo, indicaron que las concentraciones de P4 en el día 10 del ciclo no variaron entre el grupo tratado y el grupo control.

Número y tamaño de cuerpos lúteos.

El análisis del número y el tamaño de cuerpos lúteos en respuesta a la progesterona exógena, indicaron similitud estadística con el grupo control ($P > 0.05$). Estos resultados son opuestos a lo planteado en la hipótesis, pero al mismo tiempo son promisorios ya que muestran que la P4 inyectada en el metaestro no afectó el número ni el desarrollo de los CL resultantes del tratamiento superovulatorio.

En ovinos según (Pope et al., 1995) al igual que en bovinos (O'Hara *et al.*, 2014), la adición temprana de P4 parece tener un efecto paradójico, ya que aunque estimuló un desarrollo embrionario acelerado, lo que aseguraría la supervivencia de los embriones producidos, a la vez disminuyó la funcionalidad del CL (O'Hara *et al.*, 2014) y se acortó la duración de la fase lútea y del ciclo estral tanto en ovejas (Pope et al., 1995) como en vacas de carne (Pugliesi et al., 2014), lo cual podría pensarse que comprometería la viabilidad futura de los embriones.

Los resultados de este estudio también coincidieron con los obtenidos por Barros (2016) en vacas del altiplano Ecuatoriano, quien luego de administrar 75 o 100 mg de P4 en el día post inseminación no encontró efecto sobre la morfología del CL ni sobre la concentración de P4 en los días correspondientes a la mitad de diestro. Sin embargo, los resultados mostraron un desarrollo proporcional y progresivo del crecimiento del CL desde el día 2 al 16 similar al del grupo control.

En el estudio realizado por Pugliesi et al., (2014) en vacas de carne, el área del CL y el flujo sanguíneo durante los días 2 al 8,5 no difiere significativamente ($P > 0.05$) ($T_2 = 4.30 \pm 0.22$, $T_3 = 4.12 \pm 0.31$) entre vacas que recibieron 150 o 300 mg de P4 los días 2 o 3 post-ovulación y el grupo control (sin P4), lo que sugirió que el tratamiento con P4 no tuvo efecto sobre el cuerpo lúteo. Los autores concluyeron que la suplementación de P4 de acción prolongada en el día 2 o 3 después de la ovulación



no tuvo efecto sobre el desarrollo del cuerpo lúteo, lo cual coincide con los obtenidos en este estudio.

Asimismo, los resultados que se obtuvieron en esta investigación, corroboran los señalados en estudio de Peñaloza y Romero (2016) en el cual la administración de P₄ exógena durante el metaestro temprano en ovinos, no afectó el tamaño de los cuerpos lúteos. Similarmente, Woody & Ginther, (1968) en vacunos encontraron que el peso del CL a los 15 días no se vio afectado significativamente por el tratamiento con P₄ administrado durante la primera mitad del ciclo estral en vacas (100mg/día en los días 1a10).

Cortisol

Los niveles de cortisol fueron evaluados para determinar si al aplicar una sola inyección de P₄ (P₄ de larga acción) en el metaestro en lugar de tres días seguidos (P₄ de corta acción), se reducía el estrés causado por manejo repetido de los animales, que eventualmente podía afectar el desarrollo de los CL y comprometer la viabilidad de los embriones.

Los resultados que se obtuvieron para esta variable no mostraron diferencias estadísticas entre los tratamientos. Sorprendió que los niveles más altos de cortisol, correspondieran a las ovejas que no recibieron ningún tratamiento. Las causas de esto podrían ser el método indirecto para medir esta hormona (a partir de heces), como también el momento de la toma de muestra y la influencia de su estado reproductivo (Palme, 2012).

Por otra parte, se debe señalar que los animales de todos los grupos fueron manejados en conjunto cada vez que hubo necesidad de movilizarlos para administrar la P₄ o para coleccionar las muestras de heces. Esto nos indica que en el ovino, su simple manejo y transporte para llevarlos a un corral pudo producir un nivel de estrés mayor que supere al de la aplicación de inyecciones. Meza et al., (2002) indicaron que las concentraciones altas de cortisol tienen consecuencias perjudiciales en la reproducción, mientras que Córdova et al., (2008) señalaron que el estrés modifica al SNC y a su vez afectan la secreción de GnRH y la pulsatilidad y amplitud de la LH.



Estas situaciones de estrés producidas por factores ambientales y de manejo que son los que más afectan la producción y reproducción animal.

En la investigación realizada en toros por Reinoso & Brito (2016), los niveles de cortisol medidos en heces mostraron diferencias significativas ($T1 = 74.3 \pm 8.68$ y $T2 = 31.4 \pm 9.81$) al comparar dos tratamientos ($T1 =$ Sin tranquilizante, $T2 =$ con tranquilizante), al extraer semen mediante el uso de electroeyaculador, lo que no coincide con los resultados obtenidos en este estudio.

Progesterona en heces en el metaestro

En este estudio se comparó la administración de progesterona de corta acción (6 mg durante los días 2 a 4, post IA) frente a una dosis única de progesterona de larga acción (18mg en el día 2 post IA). Los resultados obtenidos indicaron que no existieron diferencias significativas, demostrándose que los tratamientos se comportan de la misma manera. Probablemente, el no haber encontrado diferencias significativas entre los tres tratamientos pudiera explicarse por el método inespecífico que se empleó para valorar su concentración, la variabilidad entre individuos, la velocidad del tránsito del contenido intestinal, así como también el bajo número de animales por grupo.

En este aspecto, los resultados de estudio no concuerdan con los señalados en el trabajo de Peñaloza y Romero (2016), quienes luego de aplicar 6 mg diarios de P4 durante los días 2 a 4 después de la IA en ovejas, obtuvieron concentraciones de P4 en sangre superiores a las del grupo control. De igual manera, tampoco coinciden con lo indicado por Garret *et al.*, (1988) quienes en bovinos encontraron diferencias significativas al aplicar progesterona exógena los días 1 al 4 de gestación, logrando niveles superiores de P4 en plasma en los días 2 al 5 de preñez con relación al control.

Asimismo, Barros (2016) en vacas tratadas con P4 de larga acción, comprobó que existieron diferencias estadísticas ($2,24 \pm 0,340$) en los niveles plasmáticos de P4 durante los primeros días del metaestro, entre las vacas que recibieron 100 mg de



P4 y las del grupo control, aunque las diferencias entre estas últimas y las hembras tratadas con 75 mg de P4 fue estadísticamente similar.

Colección de embriones

En este estudio no fue posible obtener embriones en ninguno de los grupos experimentales estudiados. Es necesario decir que en los procedimientos habituales de colecta de embriones producto de una superovulación, estos son obtenidos en el día 6 o 7 después de la fecundación. La colecta en el día 7 introduce un factor poco estudiado como es la resistencia de los embriones al proceso de colecta que se realiza clásicamente. Los embriones de 13 días de vida, ya están elongados y en ausencia de la zona pelúcida, y por lo tanto presentan mayor fragilidad que los obtenidos en día 7, por lo que probablemente el día de colecta no fue el más indicado, presumiendo que produjo deterioro y disgregación de los mismos, motivo por el cual no pudo ser detectada ninguna estructura embrionaria (Gibbons, 2011).

Aunque el estudio se realizó un ambiente tropical en el que las horas luz del día no varían mayormente durante el año, estas ovejas son de razas originarias de ambientes del extremo sur del continente, por lo cual la ciclicidad reproductiva puede variar durante el año. Por lo tanto, debe considerarse que luego del apareamiento de las hembras la fecundación y/o el desarrollo embrionario temprano puede verse afectado por la época reproductiva.

Asimismo el uso de dispositivos intravaginales para la sincronización de celo puede haber tenido un efecto negativo sobre la viabilidad y funcionalidad de los espermatozoides. Según Manes & Ungerfeld, (2015) los implantes producen incremento de leucocitos en el epitelio vaginal que afectan la viabilidad del espermatozoide perturbando la fertilidad. Los proceso inflamatorios liberan radicales libres, que ejercen efectos tóxicos sobre los espermatozoides ya que ocasiona la peroxidación de los lípidos de la membrana espermática, alternado su integridad, morfología y viabilidad. Salomon & Maxwell, (2000).



Los hallazgos de esta investigación en este aspecto concuerdan con los indicados por Peñaloza & Romero, (2016), quienes en un experimento previo con objetivos similares al del presente estudio, tampoco encontraron estructuras embrionarias en el día 13 luego de la administración de P4 exógena.

Pope et al. (1993) utilizaron el mismo sistema de colecta y obtuvieron embriones en las ovejas inseminadas, aunque en ese caso las ovejas no fueron superovuladas, como sí ocurrió en este estudio. Aparentemente, la superovulación genera condiciones ambientales en el útero y de competencia en el útero que pueden haber generado la destrucción de los embriones más allá del día 8 post inseminación (Pope et al., 2005).

Asimismo, Menchaca, (2009) menciona que la eCG posee vida media prolongada, y que su efecto sobre la primera onda folicular después de la ovulación podría generar la presencia de grandes folículos anovulatorios y mayores concentraciones de estradiol en sangre las que podría afectar el desarrollo embrionario temprano



CAPITULO VI: CONCLUSIONES

- Se rechaza la hipótesis planteada en esta investigación debido a que la administración de progesterona en el metaestro temprano no afectó la concentración de progesterona ni el tamaño de cuerpos lúteos.
- El estrés producido por la aplicación de P₄ exógena fue inferior al estrés provocado durante el manejo de los animales.
- Las concentraciones de cortisol no variaron entre tratamientos, sin embargo, inesperadamente, las ovejas no tratadas (grupo control) tuvieron una concentración de cortisol fecal superior a la de los grupos que recibieron 1 (grupo 3) o múltiples (grupo 2) inyecciones de progesterona.

RECOMENDACIONES

- Para una futura investigación se sugiere realizar la colecta de embriones en el día 7 debido a que conservan su estructura.
- En caso de realizarse un estudio similar, sería de gran valor registrar la duración del ciclo interestrual con la finalidad de observar si el tratamiento de P₄ afecta la duración de la fase lútea.



REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

Acurero, M. D. (2000). Estrategias de suplementación en ovejas. Fonaiap Divulga (Venezuela). (Abr-Jun 2000), (66), 13-15.

Agazzi, A. C., & De Larrobla Fernández, A. (2005) Modulación de la secreción de cortisol por los esteroides sexuales en ovinos. Tesis de graduación. Montevideo - Uruguay

Alberio, R. H., & Butler, H. (2001). Sincronización de los celos en hembras receptoras. Biotecnología de la Reproducción INTA (Balcarce), 61 – 77.

Álvarez, L. (2007) Efectos negativos del estrés sobre la reproducción en animales domésticos. CEPIPSA (México), (57), (41 -48)

Arias, N., & Velapatiño, B. (2015). Cortisol como Indicador Fiable del Estrés en Alpacas y Llamas. Revista de Investigaciones Veterinarias (Perú), 26(1), 1-8.

Arroyo, J. (2011). Estacionalidad reproductiva de la oveja en México. Tropical and subtropical agroecosystems, 14(3), 829-845.

Atuesta, J. E., Gonella, A., M. (2011). Control hormonal del ciclo estral de bovinos y ovinos. Universidad cooperativa de Colombia. (11), 3 – 8.

Banchero, G., & Quintans, G. (2008). “Flushing corto” una herramienta para aumentar el porcentaje de mellizos en ovejas de baja a moderada prolificidad. Revista INIA, 14, 8-12.

Barros Angulo, S. J. (2016). Efecto del tratamiento con dosis reducida de progesterona después de la inseminación artificial sobre el funcionamiento del cuerpo lúteo y el porcentaje de concepción, en vaconas en el altiplano ecuatoriano 2500 msnm. Universidad de Cuenca. (85), 43-52.



Bertulat, S., Fischer-Tenhagen, C., Suthar, V., Möstl, E., Isaka, N., & Heuwieser, W. (2013). Measurement of fecal glucocorticoid metabolites and evaluation of udder characteristics to estimate stress after sudden dry-off in dairy cows with different milk yields. *Journal of Dairy Science*, 96(6), 3774–87.

Brito Tene, D. M., & Reinoso Chacón, N. Y. (2016). Evaluación cuali-cuantitativa de semen colectado con electroeyaculador (EE) de toros tratados con y sin tranquilizante. *Universidad de Cuenca*, (83) 65 – 75.

Botana, L., Landoni, F., & Jiménez, T. (2002). *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*. 1ª Edición, Editorial McGraw-Hill.

Brousset D., F. Galindo, R. Valdez, M. Romano & A. Schuneman. (2005). Cortisol in saliva, urine and feces: non – invasive assessment of wild animals. *Universidad Autónoma de México*. Pp. 335:337

Buratovich, O. F. (2013) Eficiencia reproductiva en ovinos: factores que la afectan. Parte I: La alimentación. Estación Experimental Agroforestal INTA Esquel, Chubut. *Ficha ganadería 34*: 153-158

Calva, J. C., & Cantos Torres, E. P. (2014). Determinación del porcentaje de preñez con protocolos IATF en vacas lecheras utilizando benzoato y cipionato de estradiol. *Tesis Universidad de Cuenca*. (75), 24 – 35.

Chalán Quishpe, Lourdes. (2007). Caracterización fenotípica de ovinos en cuatro comunidades del cantón Saraguro, provincia de Loja. *Escuela Superior Politécnica de Chimborazo*. (115), 13 – 16.

Camacho Ronquillo, J. C., Rodríguez Castillo, J. D. C., Hernández, J. E., Pro Martinez, A., Becerril Perez, C. M., & Gallegos Sanchez, J. (2010). Características reproductivas de ovejas Pelibuey sincronizadas e inducidas a la pubertad. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 16(1), 1 – 7.



Carabajo, Buestán, Damián, P. (2011). Fisiología del estrés y sus efectos sobre la reproducción de la hembra bovina. Tesis Universidad de Cuenca. (77), 42 – 62.

Castañeda Martínez, L. (2011). Fisiología de la reproducción desde la fecundación hasta la implantación embrionaria. (Bogotá), (90), 30 – 42.

Chemineau, P. (2004). Medio ambiente y reproducción animal. World Animal Review, 77(1), 2-14

Chesne, P., Baril, g., & Brebion, P. (1995) Manual de formación práctica para el trasplante de embriones en ovejas y cabras. Estudio FAO: Producción y Sanidad Animal, (115), 15 – 23.

Clemente, M., De la Fuente, J., Al Naif, A., Gutier, A., Roche, J., Rizos, D., & Lonergan, P. (2009). Departamento de Reproducción Animal. Progesterona y elongación del conceptus en ganado: efecto directo en el embrión o indirecto sobre el endometrio. Madrid, España: INIA.

Cobos Villavicencio, O. X. (2011). La leptina y su relación en los procesos neuroendocrinológicos reproductivos de la hembra bovina.

Conde Hinojosa, M. P. (2015). Respuesta ovárica y embrionaria en ovejas Pelibuey y superovuladas con FSH y FSH: LH durante la época reproductiva.

Córdova Salinas, A. B. (2011). Protocolos de sincronización y superovulación para transferencia de embriones bovinos.

Córdova–Izquierdo, A., Córdova–Jiménez, C. A., Córdova–Jiménez, M. S., Saltijeral–Oaxaca, J. A., Ruiz–Lang, C. G., Xolalpa–Campos, V. M., & Guerra–Liera, J. E. (2008). Efecto de la mastitis y el estrés sobre la reproducción de la vaca. Revista Veterinaria, 19(2).



Cullinan-Bove, K., & Koos, R. D. (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(2), 829-837.

Cunningham, J. G., & Bradley K, B. G. (2009). *Fisiología veterinaria* (No. 636.0892 C855I 2003.). McGraw-Hill Interamericana.

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.

Depaz, B., Álvarez, Y., & Mellisho, E. (2011) Efecto del tratamiento corto de progesterona en la fertilidad de ovinos Pelibuey inseminado vía laparoscopia con semen congelado. (Perú), 1 – 2.

Duran Ramirez, F. 2008. *Manual de explotación y reproducción de ovejas y borregos*. Ed. Grupo Latino Editores, Bogota.245-256pp.

Forcada Miranda, F., Abecia Martínez, A., Casao Gascón, A., & Vázquez, i. (2009) *Interacciones ambientales sobre la reproducción en ovino*. (España), 1- 12.

Franco, J., & Velásquez, L. F. U. (2012). Hormonas reproductivas de importancia veterinaria en hembras domésticas ruminantes. *Biosalud*, 11(1), 41-56.

Galarza, D. A., Serpa, V. G., Torres, C. S., Iñiguez, C. U., Tapia, D. A., González, M. G., & Quezada, S. M. (2015). Efecto de la jerarquía social sobre la calidad y la congelabilidad del semen de carnero. *Maskana*. (Cuenca). (2)

Galina, Carlos., & Valencia, Javier. (2009). *Reproducción de animales domésticos*. Tercera edición. LIMUSA. (México). (582), 143 – 154. ISBN: 978 -968 -18 -7132 -11.3



Galora, A. (2006). Sincronización del celo con método OVSYNCH (GnRH, PGF2a) e inseminación artificial con semen diluido en ovejas criollas en la Unidad Ovino Caprino de la FCP (Doctoral dissertation, Tesis de grado. Escuela de Ingeniería Zootecnia – Facultad de Ciencias Agropecuarias – Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba – Ecuador. p 45).

Garrett, J. E., Geisert, R. D., Zavy, M. T., Gries, L. K., Wettemann, R. P., & Buchanan, D. S. (1988). Effect of exogenous progesterone on prostaglandin F2 α release and the interestrus interval in the bovine. *Prostaglandins*, 36(1), 85-96.

Geisert, R.D., T.C. Fox, G.L. Morgan, M.E. Wells, R.P. Wettemann, and M.T. Zavy.

Gibbons, A., & Cueto, M. (2011). Manual de Inseminación Artificial en la Especie Ovina. INTA (Bariloche), (19), 6 – 11.

Gonella, Á., Grajales, H., & Hernández, A. (2010). Ambiente receptivo uterino: control materno, control embrionario, muerte embrionaria. *Revista MVZ Córdoba*, 15(1).

Góngora, A., Grajales, H., & Hernández, A. (2002). Aspectos morfo fisiológicos y endocrinos durante la implantación embrionaria en rumiantes-Revisión. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 49(1), 3-12.

González Stagnaro, C. (1991). Control y manejo de los factores que afectan al comportamiento reproductivo de los pequeños rumiantes en el medio tropical. *Isotope and related techniques in animal production and health*. IAEA-SM-318/41, 405-421.

Gordon, M. (2010). Evaluación de la inducción del celo post-parto en ovejas mediante la aplicación de hormonas para reducir el intervalo entre partos (Doctoral dissertation, Tesis de Licenciatura). Escuela Politécnica del Ejército, Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias, Salgolquí, Ecuador.



Guamán Espinoza, M. D. L. M. (2006). Síndrome de Repetición de Servicio y Alternativas de Solución en el Ganado Bovino. Tesis Universidad de Cuenca. (60).

Hernández, C. J., & Zarco, Q. L. A. (1998). Función del cuerpo lúteo y muerte embrionaria en rumiantes. *Ciencia veterinaria. Fac. de Med. Vet. y Zoot. UNAM. México, DF*, 8, 1-28.

Hill, R. W., Wyse, G. A., & Anderson, M. (2006). *Fisiología animal*. 655 págs. Editorial Médica Panamericana, Madrid.

INEC. (2011). *Reporte estadístico del sector agropecuario*.

Jiménez, C. (2009). Superovulación: estrategias, factores asociados y predicción de la respuesta superovulatoria en bovinos: [revisión]. *Rev. Med. vet. Zoot*, 56(3), 195-214.

Kayser, J. P. R., Kim, J. G., Cerny, R. L., & Vallet, J. L. (2006). Global characterization of porcine intrauterine proteins during early pregnancy. *Reproduction*, 131(2), 379-388.

Latorre, E., & Sales, F. (2000). INIA. Obtenido de Inseminación artificial ovina. Universidad de Magallanes. (Chile). (27), 13 – 18.

Ledezma, J. A., & Gallegos – Sánchez, J. (2006). Sistemas neurales de retroalimentación durante el ciclo reproductivo anual de la oveja. *Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de América*, 31 (1), 8 – 15.

López Sebastián, A., Santiago Moreno, J., De Bulnes, A. G., & García López, M. (1993). Aspectos característicos de la fisiología de la oveja. *Revista Científica*, 3(002).

López, R. S. (1996). El origen de la oveja merina. (121-134).



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.

Márquez, H. L. (2014). Reproducción ovina en Colombia. *Revista Ciencia Animal*, (8), 67-83.

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. *Theriogenology*. 72: 477- 483.

Meza-Herrera, C. A., Bocanegra-Viezca, J. A., Bañuelos-Valenzuela, R., Aréchiga-Flores, C. F., Rincón-Delgado, R. M., & Rodríguez-Martínez, R. (2002). Fluctuación de los niveles séricos de cortisol y glucosa como indicadores de estrés en seis genotipos caprinos durante cuatro épocas del año. *Chapingo*, 1, 47-52.

Möstl, E., Maggs, J. L., Schrötter, G., Besenfelder, U., & Palme, R. (2002). Measurement of cortisol metabolites in faeces of ruminants. *Veterinary research communications*, 26(2), 127-139.

Moyes, C. D. S., & Schulte P, M. (2007) *Principios de fisiología animal*/Cristopher d. mayes y patricia m. schulte; tr. María González moreno (no. qp34. m69).

O'Hara, L., Forde, N., Carter, F., Rizos, D., Maillou, V., Ealy, A. D. & Lonergan, P. (2014). Paradoxical effect of supplementary progesterone between Day 3 and Day 7 on corpus luteum function and conceptus development in cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, 26(2), 328-336

Orizaba, Chávez, B., Alba, Jasso, G. A., & Ocharán-Hernández, M. E. (2013). Farmacocinética de la progesterona. *Revista del Hospital Juárez de México*, 80(1), 59-66.



Padilla Jáuregui, F. D. M., Badeón, B., Jáuregui, L. F. D. M. P., & Badeón, L. B. (2006). Crianza de ovinos en costa y sierra (No. SF375. 5 P13).

Palma, G. A. (2001). Biotecnología de la reproducción. Primera Edición. Instituto nacional tecnología agropecuaria. (Machala), (650).

Palme R. A, Rettenbacher S, Touma B, El-Bahr, D and E. Möstl. 2005. Stress Hormones in Mammals and Birds Comparative Aspects Regarding Metabolism, Excretion, and Noninvasive Measurement in Fecal Samples. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1040: 162–171

Palme, R. *et al.* 1996. Excretion of infused ¹⁴C-steroid hormones via faeces and urine in domestic livestock. Anim. Reprod. Sci. **43**: 43–63.

Palme, R., Touma, C., Arias, N., Dominchin, M. F., & Lepschy, M. (2013). Steroid extraction: get the best out of faecal samples. Wien Tierarztl Monatsschr, 100(9-10), 238-46.

Palme, R. (2012). Monitoring stress hormone metabolites as a useful, non-invasive tool for welfare assessment in farm animals. Animal Welfare-The UFAW Journal, 21(3), 331.

Parraguez, V. H., Muñoz, C., & Latorre, E. (2002). Efecto del tiempo de inseminación artificial después de la detección de celo sobre la tasa de preñez en ovinos Corriedale. Agricultura técnica, 62(4), 512-516.

Pedersen, R.A. 1988. Early mammalian embryogenesis. Ed. Cambridge University Press, United States of America. 3-34 pp.



Peñaloza Zumba, P. P., & Romero Tacuri, J. L. (2016). Efecto de la progesterona aplicada en dos momentos del metaestro sobre el tamaño del embrión tamaño y función del cuerpo lúteo CL en ovejas (Bachelor's thesis). Universidad de Cuenca, (97) 65 – 75.

Pliego Palacios, G. (2015). Respuesta ovárica a un estímulo superovulatorio. (Veracruz), (53), 15 – 20.

Pope, W.F.; Cárdenas, H.; Wiley, T.M.; McClure, K.E. 1993. 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.

Pope, W. F., Cardenas, H., Wiley, T. M., & McClure, K. E. (1995). Dose-response relationships of exogenous progesterone shortly after ovulation on estrous cycle length, blastocyst development and fertility in sheep. *Animal Reproduction Science*, 38(1), 109-117.

Pope, W. F. & Cárdenas, H., (2005). Estrogen receptors in the uterus and ovarian follicles of gilts treated with dihydrotestosterone. *Domestic Animal Endocrinology*. 29(3), 523-533.

Porras, A. A., Zarco, Q. L. A., & Valencia, M. J. (2003). Estacionalidad reproductiva en ovejas. *Ciencia Veterinaria*, 9(4), 1-33.

Prieto Gómez, B., & Velázquez Paniagua, M. (2002). Fisiología de la reproducción: hormona liberadora de gonadotrofinas. *Rev Fac Med UNAM*, 45(6), 252-57.

Prieto, M. V. M., Martínez, A. G. G., Lateulade, A. I., & Villa, A. M. (2010). Sincronización de celos en ovinos con doble dosis de prostaglandina. *INTA*. 1 –4.

Ptaszynska, M. (2007). Fisiopatología y Terapéutica del Puerperio Bovino Criterios en la Elección del Tratamiento de Endometritis. *Compendio de Reproducción Animal*, 9.

Mariana González
Sofía Quezada



Pugliesi, G., Oliveria, M. L., Scolari, S. C., Lopes, E., Pinaffi, F. V., Miagawa, B. T., & Binelli, M. (2014). Corpus Luteum Development and Function after Supplementation of Long-Acting Progesterone during the Early Luteal Phase in Beef Cattle. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(1), 85-91.

Ramirez, F. J. P., Sánchez, G. E. M., & Krassel, F. J. (1988). Perfiles hormonales durante el ciclo estral de la oveja. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 26(1), 96-108.

Ramírez, L. Esther., Robalino, C. Gabriela. (2012). Crecimiento y desarrollo de ovinos corriedale estabulados utilizando tres mezclas forrajeras al corte, en el sector de Peguche del cantón Otavalo. *Universidad Técnica del Norte (Ibarra)*. (158), 5 – 6.

Rippe, C. A. (2009). El ciclo estral. In 2009 Dairy Cattle Reproduction Conference. Minneapolis, MN (pp. 111-117).

Robles López, Marco. (2002). El proceso de la reproducción animal. Tomo 1. Universidad de Cuenca (Ecuador). (371), 131 – 141.

Rodríguez, F. C. (2005). Bases de la producción animal (Vol. 61). Universidad de Sevilla.

Rodríguez, J. L. (2012). Evaluación del desarrollo embrionario in vitro en ovino utilizando medio de cultivo permanente secuencial. *Universidad Autónoma Metropolitana (México)*, (118), 18 – 24.

Romero, O., & Bravo, S. (2012). Alimentación y nutrición en los ovinos. *INIA (Temuco)*, (207), 68 – 74.

Sagbay, C. (2014). Efecto de la gonadotropina coriónica equina (ecg) aplicada al momento de retirar el dispositivo de progesterona (p4) sobre el porcentaje de preñez en vacas Holstein post-parto (Doctoral dissertation, Tesis de Grado]. Cuenca-Ecuador).

Mariana González
Sofía Quezada



Salomon, S.; Maxwell W. 2000. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci.* 62: 77-111.

Sánchez, J., Mejía, O., & Manzur, A. (2014). Manual de transferencia de embriones ovinos. *SIFUPRO (México)*, (41), 26 – 30.

Sepúlveda, N. (2012). AVPA. Inseminación artificial en ovinos. (Venezuela). (10), 3 – 5.

Simmons, P., & Ekarius, C. (2011) *Guía de la cría de ovejas: Reproducción, Cuidados, Instalaciones.* Editorial Omega. España.

Simonetti, L. (2008). Simplificación de los métodos de superovulación en ovejas de la raza Corriedale (Doctoral dissertation).

Tabarez-Rojas, A., Porras-Almeraya, A., Vaquera-Huerta, H., Hernández-Ignacio, J., Valencia, J., Rojas-Maya, S., & Hernández-Cerón, J. (2009). Desarrollo embrionario en ovejas Pelibuey y Suffolk en condiciones de estrés calórico. *Agrociencia*, 43(7), 671-680

Torres Lemus, F. M. (2013). Influencia del aporte de progesterona exógena (CIDR) post-inseminación sobre la fertilidad de ovinos de las razas cruce Suffolk-Dorset. (México).

Tovío, N., Duica, A., & Grajales, H. (2008). Desarrollo embrionario y estrategias antiluteolíticas hormonales en programas de trasplante de embriones bovinos. *Medicine Veterinary and Zootechnics*, 13, 1240-1251.

Uribe Velásquez, L. F., Correa Orozco, A., & Osorio, J. H. (2009). Características del crecimiento folicular ovárico durante el ciclo estral en ovejas. *Biosalud*, 8(1), 117-131.

Uribe-Velásquez, L. F., Oba, E., & Souza, M. I. L. (2008). Población folicular y concentraciones plasmáticas de progesterona (P4) en ovejas sometidas a diferentes protocolos de sincronización. *Archivos de medicina veterinaria*, 40(1), 83-88.

Mariana González
Sofía Quezada



Vélez Marín, M., & Uribe Velásquez, L.F. (2010). Como afecta el estrés calórico en la reproducción. *Biosalud*, 9(2), 83 – 95.

Viñoles, C., Paganoni, B., Milton, J. T. B., Driancourt, M. A., & Martin, G. B. (2011). Pregnancy rate and prolificacy after artificial insemination in ewes following synchronisation with prostaglandin, sponges, or sponges with bactericide. *Animal Production Science*, 51(6), 565-569.

Woody, C., First, N. L., & Pope, A. L. (1967). Effect of exogenous progesterone on estrous cycle length. *Journal of animal science*, 26(1), 139-141.

Woody, C.; Ginther O. (1968). Effect of Exogenous Progesterone on Corpora Lutea in Unilaterally Hysterectomized Heifers. *Journal of animal Science*. 5:1387 -1390.

Yasser, L., Ramón, N., Restrepo, J., Olivera, M., & Tarazona. A. (2010). Interferón TAU en la ventana de reconocimiento materno embrionario Bovino. (Colombia), (12), 3 – 8.



ANEXOS

Anexo 1. Registro de las ovejas

REGISTRO OVEJAS TESIS						
DESPARASITACIÓN						
#	ORIGEN	EDAD	SEXO	PESO	DESPARASITACIÓN	OBSERVACIÓN
206	NERO	32	H	33	ALB + IVER.	
227	NERO	20	H	58	ALB + IVER	
228	NERO		H	42	ALB + IVER	
229	NERO	13	H	37	ALB + IVER	
231	NERO	12	H	38	ALB + IVER	
12	IRQUIS	26	H	41	ALB + IVER	
25	IRQUIS	29	H	46	ALB + IVER	
104	IRQUIS	28	H	31	ALB + IVER	
103	IRQUIS	18	H	30	ALB + IVER	
500	COMPRA	38	H	49	ALB + IVER	
501	COMPRA	20	H	39	ALB + IVER	
502	COMPRA	12	H	40	ALB + IVER	
503	COMPRA	13	H		ALB + IVER	MUERTA
504	COMPRA	26	H		ALB + IVER	OVH
505	COMPRA	26	H	53	ALB + IVER	
506	COMPRA	16	H	36	ALB + IVER	
507	COMPRA	20	H	42	ALB + IVER	
508	COMPRA	26	H	34	ALB + IVER	
509	COMPRA	38	H	50	ALB + IVER	
510	COMPRA	12	H	33	ALB + IVER	
512	COMPRA	18	H	38	ALB + IVER	
513	COMPRA	28	H	31	ALB + IVER	OVH
515	COMPRA	26	H		ALBENDAZOL	PARIDA
516	COMPRA		H	23	ALB + IVER + LEV	9/11/15
517	COMPRA		H	34	ALB + IVER + LEV	9/11/15
518	COMPRA		H	32	ALB + IVER + LEV	9/11/15
0	IRQUIS		H	15	ALB + IVER	
4	NERO		M		ALB + IVER	
29	IRQUIS		M		ALB + IVER	
102	IRQUIS		M		ALB + IVER	
250	PRESTADO		M		ALB + IVER	



Anexo 2. Programa de sincronización de celo

REGISTRO OVEJAS TESIS							
SINCRONIZACIÓN DE CELO							
(Medroxiprogesterona 60 mg)							
#	ORIGEN	EDAD	SEXO	KG	ESPONJA P4	FECHA	OBSERVACIONES
206	NERO	32	H	33	X	12/11/2015	
227	NERO	20	H	58	X	12/11/2015	
228	NERO		H	42	X	12/11/2015	
229	NERO	13	H	37	X	12/11/2015	
231	NERO	12	H	38	X	12/11/2015	
12	IRQUIS	26	H	41	X	12/11/2015	
25	IRQUIS	29	H	46	X	12/11/2015	
104	IRQUIS	28	H	31	NO	12/11/2015	MAESTRÍA
103	IRQUIS	18	H	30	X	12/11/2015	
500	COMPRA	38	H	49	X	12/11/2015	
501	COMPRA	20	H	39	X	12/11/2015	
502	COMPRA	12	H	40	X	12/11/2015	
505	COMPRA	26	H	53	X	12/11/2015	
506	COMPRA	16	H	36	X	12/11/2015	
507	COMPRA	2º	H	42	X	12/11/2015	
508	COMPRA	26	H	34	X	12/11/2015	
509	COMPRA	38	H	50	X	12/11/2015	
510	COMPRA	12	H	33	X	12/11/2015	
512	COMPRA	18	H	38	X	12/11/2015	
513	COMPRA	28	H	31	X	12/11/2015	OVH
515	COMPRA	26	H		NO		PARIDA
516	NUEVA		H	23	X	12/11/2015	
517	NUEVA		H	34	X	12/11/2015	
518	NUEVA		H	32	X	12/11/2015	
0	IRQUIS		H	15	NO		



Anexo 3. Programa de Superovulación

DIA	FECHA	GRUPO 1		GRUPO 2	
		FSH	eCG	FSH	eCG
0	12/11/2015	Implante	Implante	Implante	Implante
10	22/11/2015	20 mg FSH 20 mg FSH	1000UI eCG		
11	23/11/2015	16 mg FSH 16 mg FSH		20 mg FSH 20 mg FSH	1000UI Ecg
12	24/11/2015	Ret. Implante 14 mg FSH + 500 UI eCG 14 mg FSH	Ret. Implante 500 UI eCG	16 mg FSH 16 mg FSH	
13	25/11/2015	Revisar celo con un macho. IA	Revisar celo con un macho. IA	Ret. Implante 14 mg FSH + 500UIeCG 14 mg FSH	Ret. Implante 500 UIeCG
14	26/11/2015	IA	IA	Revisar celo con un macho. IA	Revisar celo con un macho. IA



Anexo 4. Protocolo de aplicación de progesterona

INYECCIÓN DE PROGESTERONA

15	28/11/2015	501-510-505-516-508-509-25	
16	29/11/2015	501-510-505-516-508-509-25	512-502-517-506-12-227-228
17	30/11/2015	501-510-505-516-508-509-25	
	/12/2015	COLECTA	COLECTA
	/12/2015	COLECTA	COLECTA

REGISTRO OVEJAS TESIS								
PROGESTERONA								
#	TR	GR	HNA	FECHA				OBSERVACIONES
				28/11/2015	29/11/2015	30/11/2015	01/12/2015	
103	T1	1	ECG					
501	T2	1	ECG	6 mg	6 mg	6 mg		
510	T2	1	ECG	6 mg	6 mg	6 mg		
507	T1	1	ECG					
505	T2	1	ECG	6 mg	6 mg	6 mg		
516	T2	1	FSH	6 mg	6 mg	6 mg		
508	T2	1	FSH	6 mg	6 mg	6 mg		
231	T1	1	FSH					
509	T2	1	FSH	6 mg	6 mg	6 mg		
25	T2	1	FSH	6 mg	6 mg	6 mg		
512	T3	2	ECG		18 mg			LARGA ACCIÓN
229	T1	2	ECG					
502	T3	2	ECG		18 mg			LARGA ACCIÓN
517	T3	2	ECG		18 mg			LARGA ACCIÓN
500	T1	2	ECG					
518	T1	2	FSH					
506	T3	2	FSH		18 mg			LARGA ACCIÓN
12	T3	2	FSH		18 mg			LARGA ACCIÓN
206	T1	2	FSH					
227	T3	2	FSH		18 mg			LARGA ACCIÓN
228	T3	2	ECG		18 mg			LARGA ACCIÓN

Mariana González
Sofía Quezada



Anexo 5. Colecta de muestras de heces

REGISTRO OVEJAS TESIS													
MUESTRAS DE HECES													
#	TR	GR	HNA	FECHA									
				28/11/2015		29/11/2015		30/11/2015		01/12/2015		02/12/2015	
103	T1	1	ECG		X	X	X	X	X	X			
501	T2	1	ECG	X	X	X	X	X	X				
510	T2	1	ECG		X	X		X	X	X			
507	T1	1	ECG	X	X	X	X	X	X	X	-	-	-
505	T2	1	ECG	X	X	X	X	X	X	X	-	-	-
516	T2	1	FSH	X	X	X	X	X	X	X	-	-	-
508	T2	1	FSH	X	X	X	X	X	X	X	-	-	-
231	T1	1	FSH	X	X	X	X			X			
509	T2	1	FSH	X	X	X	X	X	X	X	-	-	-
25	T2	1	FSH	X	X	X	X	X	X				
512	T3	2	ECG			X	X	X	X	X	X	X	-
229	T1	2	ECG			X	X	X	X	X	X	X	-
502	T3	2	ECG			X	X	X	X	X	X	X	-
517	T3	2	ECG			X	X	X	X		X	X	
500	T1	2	ECG			X	X	X	X	X	X	X	-
518	T1	2	FSH					X	X	X			
506	T3	2	FSH			X	X	X	X	X	X	X	-
12	T3	2	FSH			X	X	X	X	X	X		
206	T1	2	FSH			X	X		X	X	X	X	
227	T3	2	FSH			X	X	X	X	X	X	X	-
228	T3	2	ECG			X	X		X	X	X	X	



Anexo 6. Hoja de campo para cirugía

1. DATOS GENERALES

NRO	ORIGEN	EDAD	KG	SO	FECHA IA	GRUPO	TRATAMIENTO

2. CUERPO LÚTEO Y FOLICULOS

OVARIOS	DERECHO	IZQUIERDO
#CL		
DIMENSIÓN		
FOLICULOS		

3. COLECTA DE ESTRUCTURAS

ESTRUCTURA	#
OVOCITOS	
EMBRIÓN	

4. EVALUACIÓN MORFOLÓGICA

#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Estructura																									
Estado																									
Calidad																									

Estado de Desarrollo	
Nº	Estado
1	No fecundado
2	2-a 12-celulas
3	Mórula Temprana
4	Mórula
5	Blastocisto Temprano
6	Blastocisto
7	Blastocisto Expandido
8	Blastocisto Eclosionado
9	Blastocisto Eclosionado Expandido

Calidad de Embriones	
Codigo 1	Excelente o Bueno
Codigo 2	Regular
Codigo 3	Malo
Codigo 4	Muerto/Degenerado

Anexo 7. Fotos de la investigación

Establo



Aretes de las ovejas



Identificación de los tratamientos



Administración del flushing



Sincronización de celo - Colocación de esponjas



Superovulación



Detección de celo



Extracción de semen



Inseminación artificial



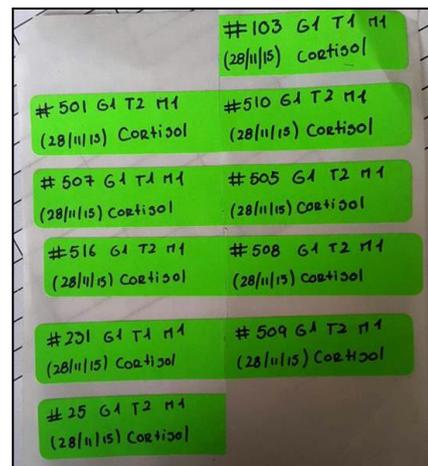
Cérvix



Recolección de heces



Identificación de muestras



P4 de corta acción



P4 de larga acción



Medición de CL



Lavado uterino para colecta de estructuras – 4 ovocitos y 1 embrión

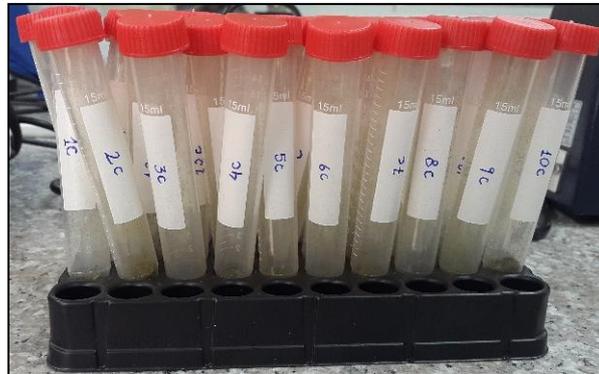


Muestras frescas

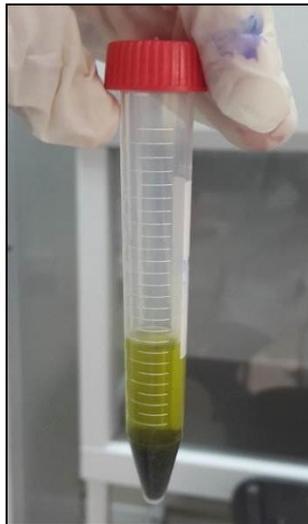
Muestras deshidratadas



Muestras para ser procesadas



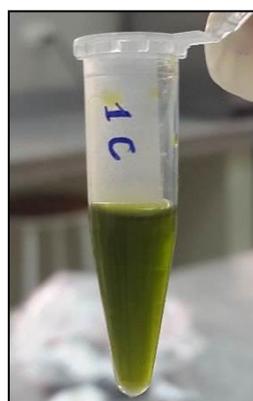
Muestra con metanol



Mezcla en vórtex



Muestra preparada



Muestra para envío





Anexo 8: Prueba de Shapiro Wilk para progesterona plasmática al día 13 post inseminación

Pruebas de normalidad				
TRATAMIENTO		Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
P4_DIA_13	T1	,868	7	0,180
	T2	,814	7	0,056
	T3	,796	7	0,038

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Anexo 9: Prueba de Levene para progesterona plasmática al día 13 post inseminación

Prueba de homogeneidad de varianzas				
	Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
P4_DIA_13	,160	2	18	0,853

Anexo 10: ANOVA para progesterona plasmática al día 13 post inseminación

P4_DIA_13					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	193,671	2	96,836	0,43	0,657
Intra-grupos	4055,18	18	225,288		
Total	4248,851	20			



Anexo 11: Prueba de Kruscal Wallis para progesterona plasmática al día 13 post inseminación

Rangos			
	P4_DIA_13	N	Rango promedio
TRATAMIENTO	1.00	2	1.75
	3.00	1	2.50
	Total	3	

Anexo 12: Pruebas de Normalidad para el número y tamaño de cuerpos lúteos al día 7

Pruebas de normalidad							
Tratamiento_CL_7		Kolmogorov-Smirnov^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Num_CL_7	T1	,260	2				
	T2	,349	3		,832	3	,194
	T3	,260	2				
Tam_CL_7	T1	,260	2				
	T2	,329	3		,869	3	,293
	T3	,260	2				

Anexo 13: Prueba de Levene para el número y tamaño de cuerpos lúteos al día 7

Prueba de homogeneidad de varianzas		
	Estadístico de Levene	Sig.
Num_CL_7	211,015	0
Tam_CL_7	1,391	0,348



Anexo 14: ANOVA para el número y tamaño de cuerpos lúteos al día 7

		ANOVA				
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Num_CL_7	Entre grupos	280,833	2	140,417	,801	,510
	Dentro de grupos	701,167	4	175,292		NS
	Total	982,000	6			
Tam_CL_7	Entre grupos	,067	2	,034	,808	,507
	Dentro de grupos	,166	4	,042		NS
	Total	,233	6			

Anexo 15: Prueba de Kruskal Wallis para el número y tamaño de cuerpos lúteos al día 7

Estadísticos de prueba^{a,b}		
	Num_CL_7	Tam_CL_7
Chi-cuadrado	0,214	1,464
GI	2	2
Sig. Asintótica	0,898	0,481

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación: Tratamiento_CL_7



Anexo 16: Pruebas de Normalidad para el número y tamaño de cuerpos lúteos al día 13

Tratamiento_CL_13		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	Gl	Sig.
Num_CL_13	T1	,343	3		,842	3	,220
	T3	,260	2				
Tam_CL_13	T1	,209	3		,991	3	,823
	T2	,260	2				
	T3	,260	2				

a. Corrección de significación de Lilliefors

b. Num_CL_13 es constante cuando Tratamiento_CL_13 = T2. Se ha omitido.

Anexo 17: Prueba de Levene para el número y tamaño de cuerpos lúteos al día 13

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Num_CL_13	6,327	2	4	,058
Tam_CL_13	,784	2	4	,516

Anexo 18: ANOVA para el número y tamaño de cuerpos lúteos al día 13

		ANOVA				
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Num_CL_13	Entre grupos	27,429	2	13,714	1,371	,352
	Dentro de grupos	40,000	4	10,000		NS
	Total	67,429	6			
Tam_CL_13	Entre grupos	,041	2	,020	,512	,634
	Dentro de grupos	,160	4	,040		NS
	Total	,201	6			



Anexo 19: Prueba de Kruskal Wallis para el número y tamaño de cuerpos lúteos al día 7

Estadísticos de prueba ^{a,b}			
	Num_CL_13	Tam_CL_13	
Chi-cuadrado	,824	1,179	
GI	2	2	
Sig. Asintótica	,662	,555	

a. Prueba de Kruskal Wallis
b. Variable de agrupación: Tratamiento_CL_13

Anexo 20: Prueba de Shapiro Wilk para cortisol en heces

Tratamiento días		Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
C_dia1	T1			
	T2	,961	4	,782
	T3	,960	3	,615
C_dia2	T1			
	T2	,989	4	,951
	T3	,939	3	,523
C_dia3	T1			
	T2	,880	4	,339
	T3	,940	3	,527
C_dia4	T1			
	T2	,961	4	,787
	T3	,997	3	,898

a. Corrección de significación de Lilliefors



Anexo 21: Prueba de Levene para cortisol en heces

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
C_dia1	,544	2	6	,607
C_dia2	3,156	2	6	,116
C_dia3	3,905	2	6	,082
C_dia4	3,018	2	6	,124



Anexo 22: ANOVA de cortisol en heces

Tratamientos		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Total	Inter-grupos	5364,521	2	2682,260	1,138	,333
	Intra-grupos	77792,479	33	2357,348		
	Total	83157,000	35			
C_dia1	Inter-grupos	1299,889	2	649,944	,370	,706
	Intra-grupos	10553,667	6	1758,944		
	Total	11853,556	8			
C_dia2	Inter-grupos	11685,389	2	5842,694	2,091	,205
	Intra-grupos	16764,167	6	2794,028		
	Total	28449,556	8			
C_dia3	Inter-grupos	8581,389	2	4290,694	1,978	,219
	Intra-grupos	13017,500	6	2169,583		
	Total	21598,889	8			
C_dia4	Inter-grupos	2922,083	2	1461,042	,738	,517
	Intra-grupos	11881,917	6	1980,319		
	Total	14804,000	8			



Anexo 23: Prueba de Kruscal Wallis para cortisol en heces

Rangos	Tratamiento Días	N	Rango promedio
C_dia1	T1	2	5.50
	T2	4	5.25
	T3	3	4.33
	Total	9	
C_dia2	T1	2	7.50
	T2	4	5.38
	T3	3	2.83
	Total	9	
C_dia3	T1	2	7.00
	T2	4	3.25
	T3	3	6.00
	Total	9	
C_dia4	T1	2	4.50
	T2	4	4.50
	T3	3	6.00
	Total	9	



Anexo 24: Prueba de Shapiro Wilk para progesterona en heces

Pruebas de normalidad				
Tratamiento		Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
Progesterona	T1	,875	8	,167
	T2	,735	16	,000
	T3	,773	12	,005
P4_dia1	T1			
	T2	,698	4	,011
	T3	,977	3	,707
P4_dia_2	T1			
	T2	,829	4	,165
	T3	,987	3	,786
P4_dia3	T1			
	T2	,704	4	,013
	T3	,870	3	,295
P4_dia4	T1			
	T2	,756	4	,044
	T3	,766	3	,036
a. Corrección de significación de Lilliefors				

Anexo 25: Prueba de Levene para progesterona en heces

Progesterona				
Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.	
2,238	2	33	,123	



Anexo 26: ANOVA para progesterona en heces

		ANOVA				
		Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
P4_dia1	Entre grupos	627880,556	2	313940,278	,502	,628
	Dentro de grupos	3749815,667	6	624969,278		
	Total	4377696,222	8			
P4_dia_2	Entre grupos	1768406,556	2	884203,278	,994	,424
	Dentro de grupos	5338227,667	6	889704,611		
	Total	7106634,222	8			
P4_dia3	Entre grupos	2774132,083	2	1387066,042	,316	,741
	Dentro de grupos	26338589,917	6	4389764,986		
	Total	29112722,000	8			
P4_dia4	Entre grupos	11719218,306	2	5859609,153	,876	,464
	Dentro de grupos	40142689,250	6	6690448,208		
	Total	51861907,556	8			



Anexo 27: Prueba de Kruscal Wallis para progesterona en heces

	Tratamiento_días	N	Rango promedio
P4_dia1	T1	2	2.00
	T2	4	5.25
	T3	3	6.67
	Total	9	
P4_dia_2	T1	2	1.50
	T2	4	6.25
	T3	3	5.67
	Total	9	
P4_dia3	T1	2	3.00
	T2	4	5.00
	T3	3	6.33
	Total	9	
P4_dia4	T1	2	2.50
	T2	4	4.50
	T3	3	7.33
	Total	9	
