



UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE CUENCA

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS

AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

**“RELACIÓN DE LA SOMATOTROPINA
RECOMBINANTE BOVINA CON LA TASA DE PREÑEZ
DE EMBRIONES OVINOS VITRIFICADOS PRODUCIDOS
IN VIVO”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE MEDICO VETERINARIO**

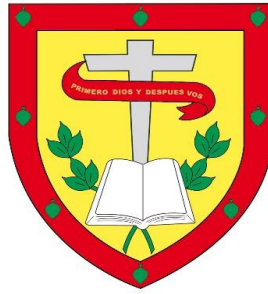
AUTOR: PATRICIO JAVIER ARCE PRIETO

DIRECTOR: ING. JUAN CARLOS ALVARADO ALVARADO

CUENCA - ECUADOR

2021

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA CIENCIAS

AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA.

**“RELACIÓN DE LA SOMATOTROPINA
RECOMBINANTE BOVINA CON LA TASA DE PREÑEZ
DE EMBRIONES OVINOS VITRIFICADOS PRODUCIDOS
IN VIVO”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO**

AUTOR: PATRICIO JAVIER ARCE PRIETO

DIRECTOR: Ing. JUAN CARLOS ALVARADO ALVARADO

CUENCA – ECUADOR

2021

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO

Declaratoria de autoría y responsabilidad

Patricio Javier Arce Prieto portador(a) de la cédula de ciudadanía N° **0302025168**. Declaro ser el autor de la obra: **“Relación De La Somatotropina Recombinante Bovina Con La Tasa De Preñez De Embriones Ovinos Vitrificados Producidos In Vivo”**, sobre la cual me hago responsable sobre las opiniones, versiones e ideas expresadas. Declaro que la misma ha sido elaborada respetando los derechos de propiedad intelectual de terceros y eximo a la Universidad Católica de Cuenca sobre cualquier reclamación que pudiera existir al respecto. Declaro finalmente que mi obra ha sido realizada cumpliendo con todos los requisitos legales, éticos y bioéticos de investigación, que la misma no incumple con la normativa nacional e internacional en el área específica de investigación, sobre la que también me responsabilizo y eximo a la Universidad Católica de Cuenca de toda reclamación al respecto.

Cuenca, 21 de Diciembre del 2021



F:

Patricio Javier Arce Prieto

C.I. 0302025168

II. CERTIFICACIÓN

De mis consideraciones:

El presente trabajo de titulación denominada “Relación de la somatotropina recombinante bovina con la tasa de preñez de embriones ovinos vitrificados producidos in vivo” fue desarrollado por Patricio Javier Arce Prieto, ha sido revisado y orientado durante su ejecución, por lo que certifico fue desarrollado siguiendo los parámetros de método científico, y se sujeta a las normas éticas de investigación, por lo que esta expedito para su presentación.



Ing. Juan Carlos Alvarado Alvarado
DIRECTOR

III. DEDICATORIA

A mi Padre por ser mi mejor amigo, consejero y ejemplo a seguir. Esta tesis y todo lo que logre hacer será gracias a su fortaleza, virtudes y valores inculcados en mí. Hoy que no estás sigues siendo mi pilar para continuar adelante. Con amor, tu hijo Patricio Javier Arce Prieto.

Patricio Javier Arce Prieto

IV. AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer a todas las personas que estuvieron conmigo en los momentos difíciles, alegres, y tristes. A mis padres por todo su amor, apoyo y comprensión, pero sobre todo gracias infinitas por la paciencia que me han tenido. No tengo palabras para agradecerles las incontables veces que me brindaron su apoyo en todas las decisiones que he tomado a lo largo de mi vida, unas buenas, otras malas. Gracias por darme la libertad de desenvolverme como ser humano.

A mis hijos Emilia y Matías que fueron el motor para no decaer y seguir adelante conjuntamente con mi esposa que me brindaron el apoyo necesario para culminar.

A mis hermanos Alex, Anabel por su apoyo incondicional en todo momento, llenarme de alegría día tras día.

A toda mi familia que siempre estuvieron pendientes y brindándome su apoyo en todo momento. Con todos los que compartí dentro y fuera de las aulas., gracias por todo su apoyo. No puedo dejar de agradecer especialmente al Dr. Genaro Calle Romero quien me brindó su apoyo incondicional brindándome su mano amiga, a Nelson Rodrigo Fernández Guillen por su apoyo incondicional, pese a las adversidades e inconvenientes que se presentaron.

A los que me guiaron paso a paso para poder culminar, por haber compartido sus conocimientos a lo largo de la preparación de nuestra profesión, hicieron que pueda crecer día a día como profesional, gracias a cada una de ustedes por su paciencia, dedicación, apoyo incondicional y amistad de manera especial, al Ing. Juan Carlos Alvarado Alvarado tutor de nuestro proyecto de investigación quien ha guiado con su paciencia, y su rectitud como docente, y como no al Dr. Daniel Ernesto Argudo Garzón por su valioso aporte para nuestra investigación.

Patricio Javier Arce Prieto

V. ÍNDICE GENERAL

I. DECLARATORIA DE AUTORÍA Y RESPONSABILIDAD	1 -
II. CERTIFICACIÓN	4 -
III. DEDICATORIA	5 -
IV. AGRADECIMIENTO	6 -
V. ÍNDICE GENERAL	7 -
VI. INDICE DE CUADROS	10 -
VII. INDICE DE FIGURAS	11 -
VIII. RESUMEN	12 -
IX. ABSTRACT	13 -
CAPITULO I	14 -
1.1. Introducción	14 -
1.2. Planteamiento del problema	15 -
1.3. Hipótesis	16 -
1.4. Antecedentes	17 -
1.4.1. Producción de los ovinos en el Ecuador	17 -
1.4.2. Somatotropina	18 -
1.5. Objetivos	19 -
1.5.1. Objetivo General	19 -
1.5.2. Objetivos Específicos	19 -
CAPITULO II	20 -
2. MARCO TEÓRICO	20 -
2.1. Anatomía y fisiología reproductiva de la oveja	20 -
2.1.1. Foliculogénesis y desarrollo folicular	21 -
2.1.2. Dinámica folicular en ovejas	23 -
2.1.3. Fase de dominancia luteal en la oveja	25 -
2.1.4. Estacionalidad reproductiva	26 -
2.2. Métodos de control reproductivo en ovejas	28 -
2.2.1. Sincronización e inducción del celo	29 -

2.2.2.	Superovulación.....	- 30 -
2.2.3.	Protocolos de superovulación.....	- 32 -
2.2.4.	Sincronización del celo en ovejas receptoras	- 35 -
2.2.5.	Manejo de la oveja receptora de embriones	- 36 -
2.3.	Somatotropina	- 36 -
2.3.1.	Efecto de la somatotropina sobre la reproducción.....	- 37 -
2.3.2.	Efecto de la somatotropina en el desarrollo embrionario ..	- 39 -
2.4.	Transferencia de embriones	- 41 -
2.4.1.	Implantación embrionaria en ovejas	- 41 -
2.4.2.	Reconocimiento materno de la gestación en ovejas	- 44 -
2.4.3.	Mortalidad embrionaria en ovejas	- 46 -
	CAPITULO III	- 48 -
3.	METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	- 48 -
3.1.	Ubicación del ensayo.....	- 48 -
3.2.	Materiales utilizados	- 49 -
3.2.1.	Biológicos	- 49 -
3.2.2.	Físicos	- 49 -
3.2.3.	Material de laboratorio	- 49 -
3.2.4.	Hormonas.....	- 49 -
3.3.	Animales y manejo	- 49 -
3.3.1.	Selección de donantes	- 50 -
3.3.2.	Grupos experimentales	- 50 -
3.3.3.	Tratamientos de sincronización	- 50 -
3.3.4.	Preparación de Soluciones de calentamiento y tiempos de incubación	- 51 -
3.3.5.	Implantación de embriones	- 52 -
3.3.6.	Variables de estudio y análisis	- 52 -
	CAPITULO IV.....	- 53 -
4.	RESULTADOS	- 53 -
4.1.	Descripción de los resultados.....	- 53 -
4.2.	Discusión	- 54 -
4.3.	Conclusiones	- 57 -

4.4. Recomendaciones	- 58 -
X. BIBLIOGRAFÍA	- 59 -
XI. ANEXOS Imágenes	- 68 -
XII. Autorización de Publicación en el repositorio Institucional	- 72 -

VI. INDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Características de la unidad de producción donde se realizó la presente investigación. - 48 -

Cuadro 2: Protocolo de sincronización de receptoras con rBST..... - 51 -

Cuadro 3: Protocolo de sincronización de receptoras sin rBST..... - 51 -

VII. INDICE DE FIGURAS

Figura 1: FOvarios en ovejas superovuladas de la raza Olkuska, de genotipo altamente prolífico, justo antes del lavado embrionario mediante laparoscopia (A y B), y en ovejas Rideau Arcott, variedad moderadamente prolífica, al momento de la laparotomía luego del tratamiento superovulatorio (C y D).	- 31 -
Figura 2: Protocolos simplificados de superovulación usados en ovejas.	- 33 -
Figura 3: Protocolo usado en ovejas en anestro que implicó la supresión y resincronización de una nueva onda folicular.	- 33 -
Figura 4: Protocolo superovulatorio del “día 0” puede aplicado en ovejas y cabras	- 34 -
Figura 5: Protocolo de superovulación con administración suplementaria de LH. -	35 -
Figura 6: Elongación del blastocisto en un concepto filamentosos. Los embriones de oveja ingresan al útero alrededor del día 3 o 4, se convierten en blastocistos esféricos y luego, después de la eclosión de la zona pelúcida, se transforman en embriones tubulares y filamentosas entre los días 12 y 15 de preñez.....	- 42 -
Figura 7: Cascada de adhesión del embrión al endometrio que conduce a la implantación Fuente: (Johnson et al., 2018).....	- 43 -
Figura 8: Ubicación de la unidad de producción en la provincia del Cañar	- 48 -
Figura 9: Porcentaje de sincronización del celo en ovejas receptoras de embriones producidos in vivo, vitrificados y calentado, producidos en ovejas Pelibuey tratadas o no con rbST.	- 53 -
Figura 10: Tasa de preñez en ovejas receptoras de embriones producidos in vivo, vitrificados y calentado, producidos en ovejas Pelibuey tratadas o no con rbST	- 53 -

VIII. RESUMEN

La multiovulación y transferencia de embriones consiste en biotecnologías reproductivas que tienen como propósito incrementar el número de crías que puede tener una hembra genéticamente superior durante su vida útil, y por lo tanto tiene un efecto beneficioso en la mejora de la productividad de los rebaños ovinos. La somatotropina es una hormona proteica producida por la hipófisis anterior que estimula el crecimiento corporal y tiene otras funciones, algunas regulatorias de la función reproductiva. Este estudio fue conducido para determinar la relación de la somatotropina recombinante bovina (rbST) con el porcentaje de preñez de embriones ovinos vitrificados producidos in vivo. El estudio se llevó a cabo en la parroquia Luis Cordero, Cantón Azogues de la Provincia del Cañar, Ecuador. Diez ovejas mestizas Merino fueron sincronizadas con esponjas de medroxiprogesterona (60 mg) por 14 días, e inyectadas con 400 UI de eCG el día de retiro de la esponja. El día 21 del protocolo (día 7 luego del celo) se transfirieron los embriones producidos in vivo de ovejas Pelibuey, tratadas o no con dos dosis de ST recombinante bovina (rbST), previamente vitrificados y calentados. Se depositó un embrión en el útero de cada hembra receptora y luego de 30 días se realizó el diagnóstico de gestación mediante ultrasonido. Los datos fueron analizados mediante la prueba de chi-cuadrado del SAS. Se determinó que las ovejas transferidas con embriones provenientes de donadoras tratadas con rbST tuvieron una tasa de preñez superior (50%), pero no significativa, que las que recibieron embriones de hembras no tratadas con la hormona (30%). En conclusión, aunque la diferencia fue no significativa, debido probablemente al reducido número de ovejas transferidas en cada grupo, las ovejas que recibieron embriones rbST lograron una tasa de preñez 20 puntos porcentuales superior a las que recibieron embriones control.

Palabras clave: multiovulación, somatotropina, transferencia de embriones, tasa de preñez, ovejas

IX. ABSTRACT

Multi-ovulation and embryo transfer are reproductive biotechnologies intended to increase the number of offspring that a genetically superior female can have during her lifetime, and therefore have a beneficial effect on improving the productivity of sheep flocks. Somatotropin is a protein hormone produced by the anterior pituitary gland that stimulates body growth and has other functions, some of which are regulatory of reproductive function. This study was conducted to determine the relationship of recombinant bovine somatotropin (rbST) to the pregnancy rate of vitrified bovine embryos produced in vivo. The study was carried out in the Luis Cordero parish, Azogues Canton, Cañar Province, Ecuador. Ten Merino crossbred ewes were synchronized with medroxyprogesterone sponges (60 mg) for 14 days and injected with 400 IU of ECG on the day of sponge removal. On day 21 of the protocol (day 7 after estrus) embryos produced in vivo from Pelibuey ewes, treated or not with two doses of bovine recombinant TS (rbST), previously vitrified and warmed, were transferred. One embryo was deposited in the uterus of each recipient female and after 30 days gestation was diagnosed by ultrasound. Data were analyzed using the SAS chi-square test. It was determined that ewes transferred with embryos from rbST-treated donors had a higher pregnancy rate (50%), but not significant, than those that received embryos from females not treated with the hormone (30%). In conclusion, although the difference was not significant, probably due to the small number of ewes transferred in each group, ewes receiving rbST embryos achieved a pregnancy rate 20 percentage points higher than those receiving control embryos.

Keywords: multi ovulation, somatotropin, embryo transfer, pregnancy rate, ewes

CAPITULO I

1.1. Introducción

La multiovulación y transferencia de embriones constituye un método de obtención de embriones in vivo de una hembra donante y su posterior transferencia al aparato reproductor de hembra receptora. En ocasiones cuando se producen más embriones de los necesarios para la transferencia inmediata, o el productor desea realizar la transferencia en otro momento, es posible criopreservar los embriones mediante la congelación lenta o la vitrificación. Esta última biotécnica puede entonces combinarse con la multiovulación y la transferencia de embriones para conservar material genético de hembras de alta calidad genética. Este procedimiento depende por completo de la disponibilidad de una fuente de embriones de transferencia (Ahmadi, Shirazi, Esfandabadi, & Nazari, 2019).

Las ganaderías ovinas se han ido incrementando exitosamente gracias a los procesos genéticos y técnicas reproductivas tales como: inseminación artificial (IA) y clonación, permitiendo mejorar la eficiencia reproductiva en los rebaños. Así mismo la Inseminación Artificial, ha servido, como una herramienta para aplicar otras biotecnologías como la súper ovulación y la transferencia de embriones.

La rbS puede mejorar la ovulación en ovejas incrementando la fertilidad en ovejas donantes de embriones debido al estímulo del factor de crecimiento de tipo insulínico 1 (IGF-1), la producción de progesterona y el factor de reconocimiento materno de la gestación. La rbST aumenta su concentración en plasma de la IGF-1 y así mejorar desarrollo folicular, la recuperación de embriones transferibles y la recuperación de embriones. Además, la rBST mejora considerablemente el desarrollo embrionario y a su vez disminuye el número de ovocitos sin fecundar. La acción de la STH durante la maduración ocurrió a través de los receptores de STH y no por mediación del IGF-1 producido localmente (Izadyar et al., 1997).

1.2. Planteamiento del problema

La transferencia de embriones hoy en día juega un papel fundamental en el mejoramiento genético, dicho de esta manera se ha demostrado que se puede obtener una ganancia genética en el menor tiempo, es así como entonces varios productores se ven beneficiados. (Colazo & Mapletoft, 2007) Sin embargo, en su mayoría los ganaderos que optan por este mejoramiento desconocen el costo real de esta inversión, que en muchos de los casos resulta muy alta, es por eso que se debería tener muy en cuenta el costo y beneficio que este trae consigo, lo cual en su totalidad no existe resultados ni una rentabilidad (Bolívar & Juan, 2008).

Pues el uso de semen congelado en ovejas dio inicio en los años 1972, en la cual por inicio de todo se obtuvo una fertilidad baja de un 5%, es desde ahí donde parten nuevas investigaciones con semen crio preservado con el fin de obtener niveles óptimos para un mejoramiento genético, sin embargo, en la actualidad, su porcentaje de preñez varía entre el 60%, resultando de esta manera un valor muy inferior en contraste con el uso de semen fresco. (Muñoz, Parraguez, & Latorre, 2002).

Por lo cual, para mejorar la eficiencia de biotecnologías reproductivas el hombre se basa en los métodos de control hormonal, por tal motivos se han desarrollado múltiples métodos de control biológico, tal es el caso de manejos de celo, control de la ovulación mediante el cual se busca encontrar una eficiencia al momento de la inseminación artificial, esto con el objetivo de llevar un manejo apropiado en la genética del hato. (Urviola, Leyva, Huamán, & García, 2005).

1.3. Hipótesis

La somatotropina recombinante Bovina (rBST) incrementa significativamente el porcentaje de preñez de embriones ovinos vitrificados producidos in vivo.

1.4. Antecedentes

1.4.1. Producción de los ovinos en el Ecuador

El ganado ovino siempre ha sido la parte fundamental para la humanidad desde tiempos pasados, uno de los animales más cotizados por la utilidad que presta como animales de doble propósito ya sea alimento cárnico sano y la lana para los tejidos; con el mejoramiento genético ha sido utilizado como animal de doble propósito para carne y leche. El estiércol es aprovechado para mejorar y enriquecer los suelos tomando preponderancia especial su explotación en algunos países (Cajilema, 2017)

La producción ovina en las provincias de Chimborazo, Tungurahua y Cotopaxi se encuentran principalmente entre las parroquias rurales y así mismo en las comunidades indígenas del Ecuador, en donde encontramos los tipos de manejo que se realiza, es extensivo y tradicional destacando el eco tipo criollo, el número de ovinos por producto puede variar, en un límite bajo encontramos de 1 a 10 animales por productor cuyo sistema de alimentación predomina el pastoreo así también suelen alimentar con productos o residuos de las post-cosecha de cereales, ya que son zonas altamente agrícolas. El principal propósito de la cría de ovinos en el Chimborazo es por su carne, y en Tungurahua aprovechan al máximo la parte de producción de abono para fertilizar sus cultivos (López, Bayardo, Rubio, & Priscila, 2012). En el Ecuador encontramos miles hectáreas de paramo y los sub paramos. Aquí es donde se desarrolla la mayoría de las explotaciones de ovejas en donde encontraremos animales de diferentes índoles, por otro lado, encontramos el ovino criollo en un 90% ya que es un animal que se ha adaptado a diferentes climas y a su manejo, además la oveja se encuentra donde existen la mayor población campesina que se encuentran en los páramos.

Por otra parte, muchas familias ecuatorianas subsisten de estos animales ya que entran una variedad de productos como carne, leche, y lana, en otros países es un buen negocio de la ovejería tal es el caso de Australia y Nueva Zelanda entre otros (Cajilema, 2017). La población ovina en el Ecuador está conformada por el 60% de ovejas criollas y en un 20% es genéticamente mejorada, de aquí la preocupación de muchos ganaderos quien en un esfuerzo por mejorar la

calidad de sus hatos realizan importaciones trayendo animales de diferentes países. Por lo que se ha tomado procesos de mejora genética, así como la selección y mejoramiento de sus rebaños, tenemos dos factores primordiales que afectan a los ovinos tanto en crecimiento, comportamiento y en manejo y estas son la genética y el ambiente. Para esto el ganadero ha tomado medidas en la parte del clima aplicando manejos adecuados en alimentación, sanidad entre otros y en cuanto a la genética se puede aplicar sistemas de selección genética en donde gracias a los registros podemos mejorar el hato (Ordoñez, Toledo, & Vela, 2009).

Pues bien, el uso de la somatotropina bovina recombinante (rBST) tiene varios usos en la ganadería como lo es en la producción y reproducción, de tal manera (Cerón & Gutierrez, 2013) , recapitulan el uso de la (rBST) en ovinos, de la misma forma destacan que el uso de dicha hormona, eleva las concentraciones de insulina y el factor de crecimiento semejante a la insulina tipo 1 (IGF-1), que favorecen al desarrollo embrionario, elevando así la tasa de fertilización, cabe recalcar no solo tiene usos en ovinos sino también en caprinos y bovinos. En base a todo lo anterior (Gozáles, Sánchez, Gonzáles, & Bernal, 2019) realizaron una investigación con el uso de la somatotropina bovina (rBST) en un total de 30 cabras, lo cual tenía como objetivo evaluar su función en la actividad ovárica y ver la calidad de embriones, en donde sus resultados reflejaron que el uso de (rBST), eleva los niveles de la actividad ovárica de la misma manera se incrementa la cantidad de embriones, dando así como resultado la capacidad para obtener embriones de buena calidad para ser transferidos a una receptora.

1.4.2. Somatotropina

Esta hormona se comenzó a utilizar en la década de los 80 en estados unidos. Su uso se aprobó en 1994 ya que ayuda a incrementar la producción de leche mediante un mecanismo homeorreico, el cual consiste en un conjunto de adaptaciones fisiológicas de largo plazo. La somatotropina estimula el hígado la síntesis del factor de crecimiento parecido a la insulina tipo I el cual actúa como mediador en bovinos, ovinos y caprinos (Joel & Gutierrez, 2012).

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo General

- Determinar la relación de la somatotropina recombinante bovina con el porcentaje de preñez de embriones ovinos vitrificados producidos in vivo.

1.5.2. Objetivos Específicos

- Establecer el porcentaje de ovejas que entran en estro luego de la aplicación de un protocolo de sincronización de celo con y sin la administración de Somatotropina recombinante bovina.
- Determinar el porcentaje de preñez en ovejas de raza mestiza.

CAPITULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Anatomía y fisiología reproductiva de la oveja

El sistema reproductivo de la oveja está constituido por varios órganos: vulva, vagina, útero, oviductos y ovarios. La vulva es la puerta de entrada al interior del tracto reproductivo de la hembra. La vagina es el órgano de deposición del semen durante la monta natural. El útero se divide en cuello, cuerpo y cuernos uterinos. El primero es una estructura tubular que consiste en pliegues y anillos, cuya abertura anterior se abre al cuerpo del útero y la abertura posterior a la vagina. El cuerpo del útero es un área común y corta del útero, del cual se origina los cuernos. Estas áreas constituyen el sitio donde el/los embriones(es) se implantan y se desarrolla la gestación de uno o varios corderos. Los oviductos son dos estructuras tubulares que comunican cada uno de los cuernos uterinos con el ovario ipsilateral (sin hacer contacto con él). En el oviducto ocurre la fecundación de los ovocitos por los espermatozoides. Los ovarios son los órganos reproductivos primarios que contienen los ovocitos, o gametos femeninos, y producen estrógenos y progesterona dependiendo que estructura funcional está presente y predomina en los ovarios (folículos y cuerpos lúteos) en un momento determinado del ciclo estral (Senger, 2012).

El ciclo estral es el periodo que comprende entre un celo y el siguiente. En la oveja el ciclo estral tiene una duración de 16 días (rango 15.5 a 17 días). Las ovejas son animales multiovulares y poliestruales estacionales. Esto significa que ellas se reproducen durante ciertos meses del año (Senger, 2012), tal como se indicará con detalle más adelante. No obstante, las razas ovinas originarias del trópico, o las hembras de razas nativas de climas templados que son criadas en regiones tropicales, se comportan como animales poliestruales continuos o experimentan una estacionalidad menos marcada (Rawlings y Bartlewski, 2007). De acuerdo a ciertas características fisiológicas y morfológicas determinadas por la predominancia de los esteroides gonadales, el ciclo estral se divide en cuatro fases: proestro, diestro, proestro y estro (Hafez and Hafez, 2000). Asimismo, el ciclo estral también puede dividirse en fase luteal y folicular. Durante la primera, hay uno o varios cuerpos lúteos (CL) activos en los ovarios que producen grandes cantidades de progesterona (P4), y aunque también hay presencia de

folículos antrales de diversos tamaños, estos no crecen hasta el estadio ovulatorio, debido a que la P4 bloquea o reduce la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) desde el hipotálamo, y como consecuencia de la hormona luteinizante (LH) desde la hipófisis (Senger, 2012). La segunda ocurre luego que se desencadena la luteólisis y la concentración de P4 disminuye a niveles basales, con lo cual el bloque del eje hipotálamo-hipófisis desaparece y la GnRH y LH cambian su patrón de secreción. Así, la LH estimula a los folículos dominantes presentes en los ovarios a producir altos niveles de estradiol (E2), que a su vez estimula la secreción de mas LH. De esta manera, la estimulación recíproca entre el E2 y la LH conlleva a la producción de concentraciones tales de E2 que estimulan la descarga masiva de LH/FSH que desencadena la ovulación. En la oveja el estro dura alrededor de 30 horas, y la ovulación espontanea ocurre alrededor de 30 horas de iniciado el estro (Bazer, 2020).

2.1.1. Foliculogénesis y desarrollo folicular

Durante el periodo embrionario se establece la población de folículos primordiales en el ovario primitivo de la oveja. Estas son estructuras constituidas por un ovocito primario, que se encuentra en arresto en diploteno de la profase I de la primera meiosis, rodeado por una capa de células foliculares planas. A partir de ese momento comienza el reclutamiento sucesivo de folículos primordiales que se desarrollan en folículos primarios, secundarios y terciarios (Hytell et al., 2010). Durante el periodo prenatal y prepuberal estos folículos no completan la fase de crecimiento y experimentan un proceso de regresión que se conoce como atresia folicular. Una vez que la oveja logra la pubertad e inicia la ciclicidad reproductiva, una proporción relativamente pequeñas de folículos primordiales que inician el crecimiento y progresan a través de los diferentes estadios foliculares mencionados anteriormente, alcanzan el estado ovulatorio y logran ovular (Hytell et al., 2010).

Los folículos primordiales se activan e inician su crecimiento cuando los factores que estimulan este mecanismo de activación prevalecen sobre aquellos que lo inhiben. Una vez que esto ocurre, las células foliculares que rodean al ovocito se hacen cuboideas y se forma un folículo primario. A partir de este momento las células foliculares que rodean al ovocito primario se consideran

células de la granulosa. Con este hecho se inicia un periodo de crecimiento del ovocito que en este momento mide menos de 30 μm , a un diámetro de más de 120 μm al final de la fase de crecimiento (Hytell et al., 2010).

Las células de la granulosa proliferan y cuando alcanzan dos o más capas alrededor del ovocito, el folículo se encuentra en estadio secundario. En este periodo se forma la zona pelúcida, estructura traslúcida formada por glucoproteínas que separan el ovocito de las células del cúmulo que lo rodean. Las células de la granulosa más cercanas al ovocito, emiten proyecciones de citoplasma que atraviesan la zona pelúcida y hacen contacto con la membrana plasmática del ovocito a través de uniones gap. Esta interacción es de suma importancia para proveer soporte y regular el crecimiento del ovocito, así como también el de las células de la granulosa (El-Hayek et al., 2016). Las células del estroma ovárico que rodea a las células de la granulosa se diferencian en las células de la teca interna. Ambas células, las de la granulosa y de la teca interna, jugarán un papel funcional preponderante en un estadio folicular posterior. Asimismo, también se forma una capa exterior alrededor de las células de la teca interna. Estas cumplen funciones de soporte estructural y se denominan células de la teca externa (Hytell et al., 2010).

Conforme prosigue el desarrollo folicular numerosas capas de células de la granulosa se suman a las ya existentes. Se forma una cavidad llena de líquido que se conoce como antro folicular, por lo cual estos folículos se conocen como folículos antrales. A partir de este momento se considera al folículo en estadio terciario. Al formarse el antro y aumentar de tamaño conforme va llenándose de fluido folicular, las células de la granulosa se diferencian espacialmente en dos categorías: las que están adheridas a la pared interna del folículo, o células murales de la granulosa, y las que rodean íntimamente al ovocito, o células del cúmulo oóforo. Estas últimas acompañan al ovocito luego de la ovulación (Hytell et al., 2010).

La transición del periodo preantral al antral marca dos etapas importantes en el crecimiento de los folículos. Estos progresan de un periodo de crecimiento folicular independiente de las gonadotropinas, a otro dependiente de ellas. Los receptores de LH y FSH se expresan diferencialmente en las células de la teca

interna y de la granulosa respectivamente. Esta transición también tiene marcadas implicaciones en la competencia ovocitaria, ya que durante el periodo folicular preantral el ovocito es incompetente para progresar más allá del estadio de la meiosis en que se encuentra (diploteno de la meiosis I); no obstante, una vez que el folículo progresa al estadio antral, el ovocito adquiere la capacidad de reiniciar la meiosis en cualquier momento si es removido del folículo (Eppig, 2001).

Entre otras sustancias, el antro folicular contiene abundante cantidad de E2. Esta hormona gonadal cumple funciones esenciales para estimular la ovulación, la tonicidad de los oviductos y el útero, y otras condiciones que favorecen el transporte de gametos a través del tracto reproductivo y promueven la fecundación. La producción de E2 en el folículo se realiza por la cooperación de las dos células funcionales foliculares, y es promovida por las gonadotropinas. La LH a través de sus receptores en las células de la teca interna estimula la producción de androstenediona y la FSH a través de sus receptores en las células de la granulosa estimula la aromatización de este esteroide gonadal en E2 (Rawlings y Bartlewski, 2007).

Una vez que se presentan las condiciones endocrinas apropiadas, luego de la luteólisis, el o los folículos dominantes producen cantidades crecientes de E2 estimuladas por el incremento en la frecuencia y la amplitud de los pulsos de LH. A su vez el E2 folicular estimula la descarga de mayor cantidad de LH que provoca mayor producción de E2. Este proceso de estimulación recíproca entre ambas hormonas conduce a la activación de los centros hipotalámicos que regulan la descarga ovulatoria de GnRH y, en consecuencia, de LH, que desencadenan la ovulación (Goodman e Inskeep, 2015). Inmediatamente, el ovocito completa la meiosis I e inicia la meiosis II, la cual se detiene en metafase II. Únicamente si ocurre la fecundación culmina la meiosis II produciendo un ovocito maduro, capaz de convertirse en un embrión si la fecundación toma lugar.

2.1.2. Dinámica folicular en ovejas

El estudio diario del patrón de crecimiento folicular en ovejas adultas cíclicas demostró que estos crecen en ondas. Durante el ciclo ocurren entre 2 a 4 ondas

de crecimiento folicular, aunque predomina un patrón de 2 o 3 ondas (Evans, 2003). El ciclo estral tuvo una duración de 15.6, 16.1 y 17 días para ciclos de 2, 3 y 4 ondas de crecimiento folicular respectivamente. Durante cada onda un grupo o pool de folículos son reclutados y comienzan a crecer. En ciclo de dos ondas, el número de folículos pequeños, medianos y grandes alcanzaron el máximo los días 4, 5 y 8 en la primera onda, y los días 10, 12 y 16 en la segunda (Evans et al., 2000). El folículo más grande de la cohorte de la primera onda emergió el día 2,1, alcanzó un diámetro de 5,7 mm el día 5,6 del ciclo, e inicio la atresia el día 8,2. El folículo ovulatorio emergió el día 9,5, dejó de crecer el día 14,3, alcanzando un diámetro máximo de 6,5 mm y ovuló el día 16,6 del ciclo con un diámetro de 6,2 mm (Evans et al., 2000).

En ciclo de 3 ondas, el folículo más grande de la primera onda emergió el día 2,1, alcanzó un diámetro máximo de 5,4 mm el día 5,4 del ciclo, e inicio la atresia el día 8,3. El folículo más grande de la segunda onda emergió el día 6,9, alcanzó un diámetro máximo de 5,1 mm el día 9,8, e inicio la atresia el día 11,8 del ciclo. El folículo ovulatorio emergió el día 11,7, alcanzó un diámetro máximo de 6,5 mm el día 15,3, y ovuló el día 17,2 con un diámetro de 6,4 mm (Evans et al., 2000).

La emergencia de cada onda de crecimiento folicular va precedida de un incremento transitorio de FSH (Evans, 2003; Bartlewski et al., 2011). Aparentemente, la FSH es necesaria para estimular el crecimiento inicial de los folículos que están metabólicamente preparados para responder al estímulo de esta gonadotropina, y la presencia de LH parece ser esencial para que ocurra el reclutamiento estimulado por la FSH (Goodman e Inskeep, 2015). Sin embargo, una vez que los folículos de cada onda inician su crecimiento, el progreso posterior ocurre independiente de la FSH (Bartlewski et al., 2011). Asimismo, como en las ovejas más de un folículo de la misma onda adquiere la capacidad de alcanzar la talla ovulatoria, y folículos de dos ondas consecutivas (penúltima y última) pueden alcanzar a ovular al mismo tiempo, la dominancia folicular, como ocurre en la vaca y en la yegua, es muy poco manifiesta o está ausente (Evans, 2003; Bartlewski et al., 2011).

Como ocurre en la oveja cíclica, las ovejas en anestro estacional exhiben un patrón de crecimiento folicular en ondas, que fue asociado a fluctuaciones en las concentraciones de FSH (Evans, 2003; Bartlewski et al., 2011). En la estación de anestro, sin embargo, se activa un mecanismo neuronal que inhibe el patrón de secreción de GnRH que permite la secreción adecuado de LH que estimula el crecimiento folicular y que estos alcancen el estadio ovulatorio (Goodman e Inskeep, 2015).

2.1.3. Fase de dominancia luteal en la oveja

El cuerpo lúteo (CL) es una es una estructura endocrina temporal que se origina a partir de los folículos ovulados, es decir, del tejido folicular remanente luego de la ovulación (Rawlings y Bartlewski, 2007). Su función principal es producir progesterona (P4) durante gran parte del ciclo estral (diestro), y si la hembra inicia una gestación luego de la IA o MN, su presencia se extiende durante todo el periodo de preñez (Senger, 2012).

En la oveja, la fase luteal comienza con la formación del cuerpo hemorrágico y se extiende durante el periodo de diestro. La formación del CL ocurre a partir de la luteinización del folículo colapsado. Durante este proceso, las células de la granulosa que quedan adheridas a la pared folicular se convierten en células luteales grandes y las de la teca interna en células luteales pequeñas (Rawlings y Bartlewski, 2007). Estas células proliferan y se diferencian en células luteales. El tejido luteal está también conformado por fibroblastos, pericitos, células endoteliales y del sistema inmune (Miyamoto et al., 2009).

La función luteal está regulada por sustancias luteotrópicas, como la LH (principal sustancia que soporta la función del CL) y la somatotropina, y sustancias luteolíticas, como la $PGF2\alpha$ y el estradiol (Goodman e Inskeep, 2015). Asimismo, tanto la LH como la $PGF2\alpha$ están reguladas por la P4. Las células luteales grandes producen la mayor parte de la P4 independientemente del estímulo de LH, eso explica porque en el diestro lo niveles de P4 son máximos y los de LH son mínimos. No obstante, las células luteales pequeñas producen concentraciones basales de P4 bajo estímulo de esta gonadotropina (Rawlings y Bartlewski, 2007). Las concentraciones basales de LH durante en el

diestro son suficientes para estimular la actividad secretora de las células luteales pequeñas.

Al final del diestro, días 11 a 14 del ciclo estral, comienza la secreción episódica de $\text{PGF2}\alpha$ que poco después inducirá la luteólisis. Se entiende por luteólisis el proceso de desaparición estructural del cuerpo lúteo. La luteólisis ocurre en dos etapas: 1) la luteólisis funcional que implica el cese de producción de P4 por el CL y sucede en las primeras horas de iniciada, y la luteólisis estructural, que se extiende por varios días e implica la desaparición de todos los elementos celulares que conforman la glándula (Goodman e Inskeep, 2015).

Luego de un periodo de exposición del útero a la P4 durante 10-12 días, la P4 sub-regula sus propios receptores permitiendo un incremento en la expresión de los receptores de E2 y oxitocina (OXT) en el endometrio uterino. Ambas hormonas, E2 y OXT, estimulan la síntesis de $\text{PGF2}\alpha$ y la secreción episódica de esta hormona luteolítica por el endometrio (Bazer, 2020). La luteólisis comienza cuando la concentración circulante de $\text{PGF2}\alpha$ endometrial es tal que la P4 no es capaz de proteger el tejido luteal. Una vez que la luteólisis es desencadenada por la $\text{PGF2}\alpha$ endometrial, comienza una reacción en cascada en la que participan numerosas sustancias: $\text{PGF2}\alpha$ luteal, oxitocina luteal, ácido nítrico, endotelina 1, angiotensina II, que actúan como elementos intermediarios en la cascada luteolítica (Goodman e Inskeep, 2015). La reducción del flujo sanguíneo al CL es un elemento determinante en el cese de la síntesis y secreción de P4. Este evento va precedido por la infiltración de macrófagos, eosinófilos y linfocitos T al tejido luteal, y la producción de varias citoquinas (interleucinas 1B y 8). Inmediatamente comienza un proceso de degradación de los componentes estructurales del tejido luteal y la apoptosis de los elementos celulares que lo conforman (Goodman e Inskeep, 2015).

2.1.4. Estacionalidad reproductiva

Como se indicó previamente, las ovejas son animales poliestruales estacionales, por lo cual se reproducen durante ciertos meses del año. Estos meses corresponden al periodo del año de días cortos, es decir, al periodo en que las horas nocturnas son más largas que las diurnas (Bazer, 2020). Esta constituye una estrategia reproductiva desarrollada por numerosas especies de

animales para garantizar que sus crías nazcan en los periodos del año con mayor probabilidad de supervivencia (Karsch et al., 1984), en términos de abundancia de alimentos, temperatura ambiental, pluviosidad, etc.

Este comportamiento está fundamentado en el ritmo biológico circanual, que determina, en caso de la reproducción estacional, mecanismos fisiológicos capaces de transformar los estímulos luminosos en señales cerebrales que modulan la actividad reproductiva de las ovejas y de otros mamíferos estacionales. A través de este mecanismo las ovejas exhiben dos patrones distintos de actividad reproductiva, uno caracterizado por la quiescencia ovárica y la anovulación denominado anestro estacional, y otro por ciclos reproductivos ovulatorios sucesivos, que constituye la estación reproductiva (Weems et al., 2015).

La ocurrencia de estos patrones reproductivos son resultado de mecanismos asentados en el cerebro, que determinan la modulación de la secreción de la GnRH por ciertas áreas del hipotálamo. En la oveja y otros mamíferos, una señal ambiental clave que le indica al cerebro el momento de transición de una estación reproductiva a otra es la duración de las horas de luz al día o fotoperiodo (Karsch et al., 1984). La luz es captada por la retina y a través del nervio óptico alcanza el núcleo supraquiasmático. Mediante un circuito multisináptico que incluye neuronas del núcleo paraventricular, médula espinal intermediolateral y el ganglio cervical superior, los estímulos llegan a la glándula pineal (Hazlerigg y Somonneaux, 2015).

La glándula pineal a través del sistema neuroendocrino sirve de nexo entre el fotoperiodo y la actividad reproductiva. Esta glándula sintetiza y secreta melatonina en respuesta a la luz del día. La melatonina, constituye la señal interna que sincroniza los periodos anovulatorios y ovulatorios en un patrón circanual (Goodman, 2015). Mientras que grandes cantidades de melatonina se liberan en la circulación durante las horas nocturnas, muy poca es secretada durante las horas diurnas. En las ovejas, las concentraciones elevadas de melatonina durante la noche sirven como mecanismo para modular la actividad reproductiva (Goodman, 2015). Así, los días del año con periodos más largos de concentraciones elevadas de melatonina determinan la temporada de días

cortos (otoño/invierno), cuando las ovejas están reproductivamente activas. Los días con periodos más cortos de concentraciones elevadas de melatonina determinan los días largos (primavera/verano) en los que las ovejas experimentan anestro estacional (Weems et al., 2015).

El mecanismo neuroendocrino que causa el anestro estacional en las ovejas se basa en el cambio de sensibilidad que experimentan las neuronas productoras de GnRH en el hipotálamo al E2 folicular. Durante la estación reproductiva el E2 estimula un incremento en la pulsatilidad de GnRH y LH, cuando el efecto inhibitorio de la P4 desaparece luego de la luteólisis como se indicó previamente, permitiendo el desarrollo y maduración folicular, y la ovulación (Goodman e Inskeep, 2015). Sin embargo, durante la transición de la estación reproductiva a la de anestro, la sensibilidad del hipotálamo al E2 se incrementa enormemente, y cambia de estimulador a inhibitorio. De esta manera, las bajas concentraciones de E2 folicular durante el anestro suprimen la secreción de GnRH y por lo tanto de LH (Goodman e Inskeep, 2015). Al no ocurrir un patrón de secreción de LH adecuado que estimule el crecimiento y maduración final de los folículos, la ovulación no ocurre y la ciclicidad reproductiva se interrumpe.

En el trópico, sin embargo, la duración de las horas luz fluctúa considerablemente menos en comparación con las regiones templadas al norte y sur del Ecuador. Las ovejas nativas de regiones tropicales exhiben ciclicidad reproductiva durante todo el año o muestran una estacionalidad reproductiva poco manifiesta dependiendo de si están en un área tropical o subtropical (Porras et al., 2003). Las ovejas originarias de climas templados nacidas o transportadas a regiones tropicales o subtropicales muestran reproducción estacional más o menos manifiesta dependiendo de la raza y región donde se encuentra (Porras et al., 2003).

2.2. Métodos de control reproductivo en ovejas

Estos métodos se basan principalmente en el uso de hormonas para adelantar el celo, sincronizar la ovulación, estimular el crecimiento y ovulación de múltiples folículos simultáneamente, causar aborto o inducir el parto, etc. Su aplicación tiene como propósito, solucionar un problema clínico, mejorar la eficiencia reproductiva y/o incrementar la calidad genética del rebaño (Ramos y

Silva, 2018). Por ejemplo, la administración de $\text{PGF2}\alpha$ o un análogo durante el diestro puede adelantar la aparición del celo varios días (Fierro et al., 2010), dependiendo del momento del ciclo en que se aplique. La inserción de un dispositivo intravaginal con progestágenos durante varios días, combinado con otras hormonas como E2 , $\text{PGF2}\alpha$, GnRH, eCG permite la sincronización del celo y la ovulación (González-Bulnes et al., 2020). La aplicación de dosis repetidas de FSH pueden causar superovulación de numerosos folículos en ambos ovarios (Menchaca et al., 2010). El celo también puede ser estimulado mediante el efecto macho, incluso en la estación de anestro (Gelez and Fabre-Nys, 2004).

2.2.1. Sincronización e inducción del celo

Como se indicó anteriormente la $\text{PGF2}\alpha$ es una hormona producida por el endometrio uterino de la oveja y otras especies de mamíferos que es responsable de inducir la luteólisis (Goodman e Inskeep, 2015). Esta hormona, o un análogo sintético, puede ser administrada intramuscularmente, causar la regresión luteal, y anticipar el celo. Esto ocurre siempre y cuando haya un CL activo en los ovarios, es decir durante el diestro. No obstante, cuando el CL se encuentra en crecimiento (metaestro) o luego de iniciada la luteólisis (proestro y estro) la administración de esta hormona es inefectiva (Habeeb y Kutzler, 2021). Debido a la ausencia de un CL, esta hormona no puede usarse durante el anestro estacional.

Por varias décadas se ha investigado y usado la progesterona para control del estro y la ovulación (González-Bulnes et al., 2020). Según estos autores este esfuerzo comenzó en 1948, con la publicación de Dutt y Casida (1948) en la que describen el uso de inyecciones de P4 cristalina disuelta en aceite de maíz por 14 días consecutivos. De las 30 ovejas sometidas a dos concentraciones de P4 (5 y 10 mg/día), ninguna mostró signos de celo durante el tratamiento, y cuando observaron los ovarios por laparotomía encontraron que tres de las 30 habían ovulado sin mostrar signos de celo (Dutt y Casida, 1948).

A partir de entonces, se han desarrollado varios métodos para administrar P4 durante numerosos días. Asimismo, se han desarrollado análogos de P4 como el acetato de fluorogestona y el acetato de medroxiprogesterona que impregnados en esponjas intravaginales se liberan durante un periodo largo de

tiempo (González-Bulnes et al., 2020). Estas hormonas son absorbidas por la mucosa vaginal y entran en circulación cumpliendo su función en los órganos blanco. Posteriormente, se desarrollaron dispositivos intravaginales (DIV) de liberación lenta de P4, como el CIDR o el DICO, fabricados con silicona (González-Bulnes et al., 2020).

Durante muchos años los protocolos de sincronización del celo y de la ovulación en ovejas se han basado en la inserción de dispositivos intravaginales impregnados con P4, o análogos de la hormona, por 12 a 14 días seguido de la inyección de una dosis de eCG al momento de retirarse el dispositivo. No obstante, también se han probado con éxito protocolos más cortos. Este protocolo no requiere la administración de $PGF2\alpha$ debido a lo prolongado del tratamiento, que permite que las estructuras luteales que pudieran estar presente en los ovarios al inicio del tratamiento hayan experimentado luteólisis al finalizar el mismo. En la mayoría de los casos las ovejas retornan el estro dos días después de extraído el DIV (Habeeb y Kutzler, 2021). La incorporación de la eCG a los protocolos de sincronización del celo con DIVs ha permitido aplicar la inseminación a tiempo fijo debido al estrecho intervalo entre la ovulación y la inseminación artificial (IA) (González-Bulnes et al., 2020).

El propósito práctico de los tratamientos de sincronización del celo y la ovulación radica en la sincronización de partos, incrementar la fecundidad y fertilidad, la inducción del celo en ovejas fuera de la temporada reproductiva, y adelantar la pubertad (González-Bulnes et al., 2020).

2.2.2. Superovulación

Los programas de ovulación múltiple y transferencia de embriones (MOET), tienen como propósito maximizar el número de crías que una oveja puede obtener al año, o durante su vida productiva. Este protocolo implica un tratamiento de sincronización del celo y otro de estimulación ovárica, con el propósito de inducir la ovulación de múltiples folículos al mismo tiempo, que, seguido de la IA, permite obtener numerosos embriones que luego son transferidos a hembras receptoras (Ramos y Silva, 2018). La Figura 1 muestra ovarios estimulados de ovejas con múltiples cuerpos lúteos en su superficie.

Cada cuerpo lúteo representa un folículo ovulado, como se indicó en el apartado 1.3.

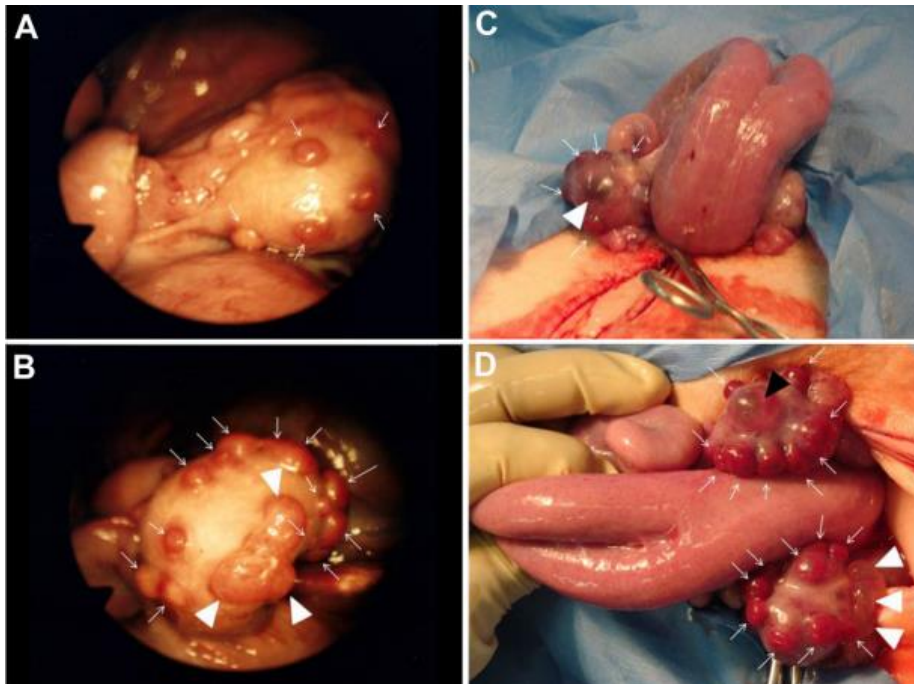


Figura 1: FOvarios en ovejas superovuladas de la raza Olkuska, de genotipo altamente prolífico, justo antes del lavado embrionario mediante laparoscopia (A y B), y en ovejas Rideau Arcott, variedad moderadamente prolífica, al momento de la laparotomía luego del tratamiento superovulatorio (C y D).

Fuente: *Bartlewski et al. (2016).*

Entre otras aplicaciones, la obtención de crías de alto valor genético producto de los programas MOET facilita los procedimientos para importar y exportar material genético bajo condiciones sanitarias que garantizan la salud. También contribuye a la preservación de especies en peligro de extinción (Ramos y Silva, 2018).

Como en otras especies, la superovulación (SOV) se basa en la administración de gonadotropinas para estimular el crecimiento de numerosos folículos. Primeramente, se usó la eCG en los tratamientos SOV, que debido a su prolongada actividad biológica causaba sobreestimulación ovárica, elevada producción de estradiol y bajas tasas de recuperación de embriones (Bartlewski et al. 2016). Posteriormente comenzó a usarse la FSH, que debido a su corto tiempo de actividad biológica hace necesario aplicar varias inyecciones de la misma. Actualmente es la gonadotropina de elección en los tratamientos SOV en ovejas (Bartlewski et al. 2016).

Unos de los inconvenientes reiterado por muchos investigadores es la gran variabilidad de la respuesta SOV. Estos tratamientos son influenciados por numerosos factores propios del animal y por medio ambiente; entre ellos se encuentran la estación del año, la raza, edad del animal, el estado nutricional, manejo, hormonas usadas y el régimen de aplicación de FSH. Aunque muchos de estos factores pueden ser controlados, la respuesta puede todavía fluctuar debido a la variación en la respuesta folicular, a la regresión anticipada del CL y a fallas de la fecundación (Menchaca et al., 2010). Aparentemente, la ausencia de un folículo dominante al inicio del tratamiento incrementa el reclutamiento folicular, la tasa de ovulación y la producción de embriones; por el contrario, la presencia de un folículo dominante deprime la respuesta ovulatoria (Menchaca et al., 2010).

2.2.3. Protocolos de superovulación

Como se indicó anteriormente, en la actualidad los programas de superovulación combinan un protocolo de sincronización del celo y/o ovulación a base de progesterona o progestágenos y uno de superovulación. Este último implica la administración de gonadotropinas que estimulan el crecimiento sincrónico de numerosos folículos antrales, seguido de IA o monta natural, y posterior colección de embriones por método quirúrgico (Bartlewski et al. 2016). Estos protocolos SOV pueden ser cortos (5 a 7 días), o largos (12 a 14 días) (Oliveira et al, 2014).

Tres protocolos simplificados de SOV usados por Simonetti et al. (2008), consistieron en la inserción de un DIV por 14 días, y 1) la administración de cuatro dosis de FSH disueltas en solución salina cada 12 horas, desde 24 horas antes hasta 12 horas posteriores al retiro del DIV (día 14 AM), o 2) una única dosis de FSH disuelta en polivinilpirrolidona el día 13 AM, o 3) una dosis única de FSH disuelta en solución salina + 500 UI de eCG a las 48 horas previas al retiro del DIV (Figura 2).

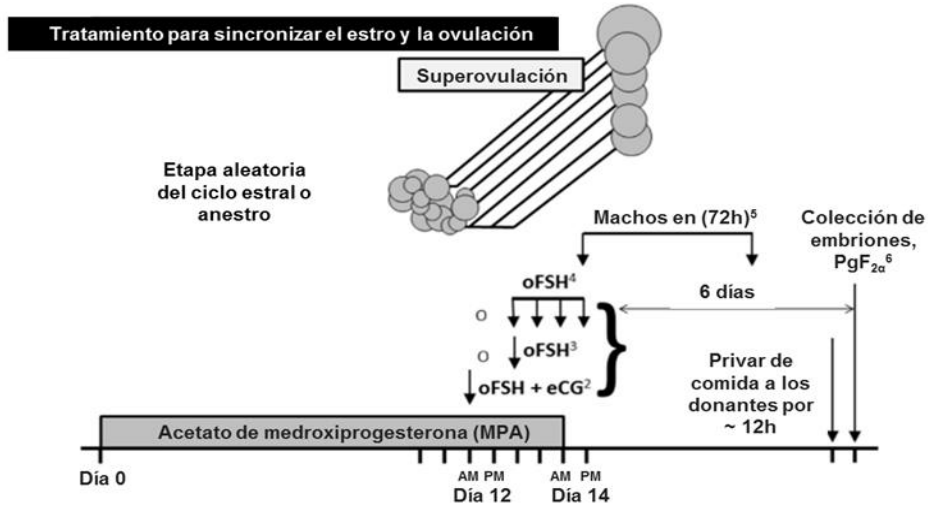


Figura 2: Protocolos simplificados de superovulación usados en ovejas.
 Fuente: Modificado de Bartlewski et al. (2016)

Otro protocolo usado en ovejas en anestro implicó la supresión y resincronización de una nueva onda folicular. Se insertó esponja intravaginal de medroxiprogesterona (día 0) por 14 días y 350 µg de 17β-E2 el día 6. El día 12 se inyectó una dosis de 500 UI de eCG + 2.5 ml de Folltropin-V, seguido de 5 dosis de 1.25 ml de Folltropin-V cada 12 horas. Se aplicó una dosis de GnRH el día 15 en la noche, momento en que las ovejas se pusieron junto a los machos por 36 horas. El día 22 se efectuó la colecta de embriones, y se administró una dosis de un análogo de la PGF_{2α} en los animales en que la diferencia entre los CL cuantificados y los embriones colectados fue mayor a tres (Figura 3) (Bartlewski et al., 2009).

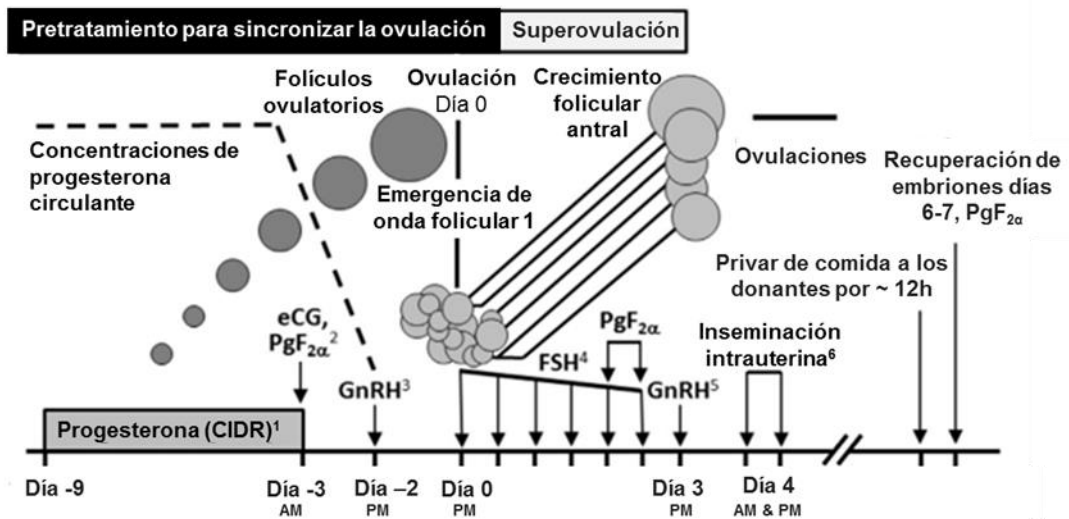


Figura 3: Protocolo usado en ovejas en anestro que implicó la supresión y resincronización de una nueva onda folicular.
 Fuente: Modificado de Bartlewski et al. (2016)

El protocolo superovulatorio del “día 0” puede ser aplicado a ovejas y cabras, y consiste en iniciar el tratamiento gonadotrópico al momento de la emergencia de la onda folicular, luego de la ovulación inducida. Para ello, el DIV es retirado en el día 6 (días -9 a -3), seguido por la administración de una dosis de GnRH y PGF_{2α} 24 horas más tarde (día -2). Dos días después (día 0), cuando se espera la emergencia de la primera onda folicular luego de la ovulación, se inicia el tratamiento superovulatorio con 6 dosis decrecientes de pFSH cada 12 horas. En la tarde del día 2 y mañana del día 3 se aplicó una dosis PGF_{2α}, y 12 horas más tarde, una de GnRH. En esta experiencia se realizaron dos IA intrauterinas con 12 horas de intervalo. Los días 6-7 se colectaron los embriones (Figura 4) (Candappa et al., 2011).

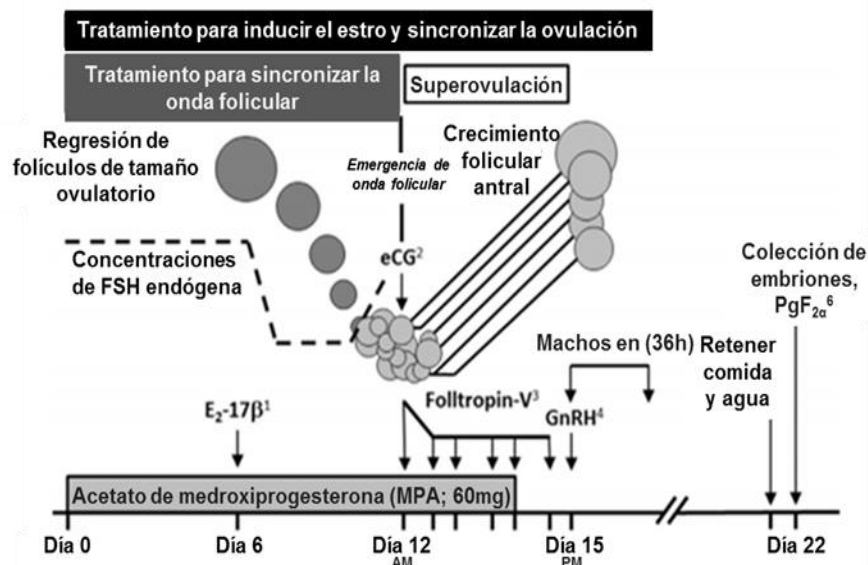


Figura 4: Protocolo superovulatorio del “día 0” puede aplicado en ovejas y cabras
 Fuente: Modificado de Bartlewski et al. (2016)

Un protocolo usado ovejas consistió en la aplicación de dos DIV (CIDR) seguidos, con permanencia de 7 días cada uno (días 0 a 14) y la aplicación de 126 mg de pFSH desde el día 12 al 14, en 6 dosis decrecientes. En el día de retiro del DIV se administraron 200 UI de eCG y 37.5 µg de D-cloprostenol, seguido de una dosis de 7.5 md de pLH. Se aplicaron dos IA transcervicales a las 42 y 48 horas luego del retiro del DIV. Las estructuras se colectaron quirúrgicamente a los 7 días de las IA (Figura 5) (Oliveira et al., 2012).

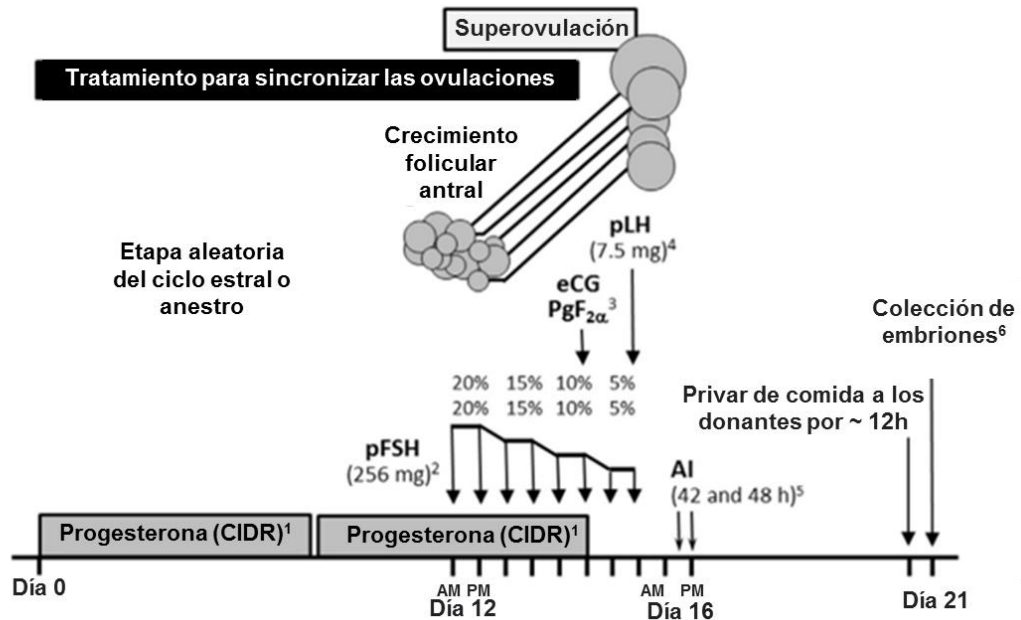


Figura 5: Protocolo de superovulación con administración suplementaria de LH.

Fuente: Modificado de Bartlewski et al. (2016)

2.2.4. Sincronización del celo en ovejas receptoras

La sincronización del celo en ovejas receptoras de embriones *in vivo* (o *in vitro*) es de suma importancia para garantizar la viabilidad de la gestación. Una vez que la transferencia es efectuada, debe haber una sincronía fisiológica entre la edad del embrión y el ambiente uterino. Esto significa que las ovejas receptoras deben iniciar el tratamiento de sincronización para que el día de la colecta de embriones estén en el día 6 o 7 del ciclo estral, coincidiendo con la edad del embrión (Gibbons y Cueto, 2013).

Estos protocolos pueden ser de 6-7 o 12-14 días de suplementación de P4 (Bartlewski et al., 2016), y lo importante de usar uno u otro es que resulten en la formación de cuerpos lúteos funcionales. Estos CL deben producir cantidades suficientemente de P4 que provean un ambiente uterino adecuado para el desarrollo embrionario temprano y la subsecuente implantación y soporte de la gestación (Daly et al., 2020). La P4 está involucrada en el mecanismo de reconocimiento materno de la gestación, y soporte endocrino posterior de la misma. Su deficiencia durante este periodo es causal de pérdidas embrionarias (De Brun et al., 2016).

2.2.5. Manejo de la oveja receptora de embriones

Como en las vacas, las ovejas receptoras de embriones deben estar sanas, sin alteraciones reproductivas y tener buena fertilidad. La actividad reproductiva es una función no esencial para la vida, y muy influenciada por diversos factores ambientales (Perea y González, 2005). Es por eso que el manejo de la hembra receptora de embriones es de suma importancia para garantizar el éxito de los programas MOET (Daly et al., 2020).

Entre los factores que más influyen la reproducción de las ovejas, además de la época del año la nutrición es preponderante (Daly et al., 2020). Las ovejas usadas como receptoras de embriones deben recibir una excelente alimentación y, por lo tanto, tener una adecuada condición corporal. La restricción nutricional redujo significativamente la tasa de ovulación y retrasó el desarrollo embrionario en el día 8 (Abecia et al., 1997). Una dieta con menor contenido de energía redujo la tasa de preñez y el número de embriones en el día 15 (Abecia et al., 1999). Asimismo, la restricción nutricional redujo la expresión de los receptores de P4 (RP4) en el útero durante el ciclo estral (Grazul-Bilska et al., 2018), y en las carúnculas y cotiledones placentarios en ovejas en gestación temprana, intermedia y tardía (Bunma et al., 2020). Todo lo anterior enfatiza la importancia de la nutrición en la tasa de concepción de ovejas receptoras de embriones.

2.3. Somatotropina

La somatotropina (STH) u hormona del crecimiento (GH) es una hormona proteica sintetizada y secretada por la glándula hipófisis, que está constituida por 191 aminoácidos. Fue primeramente identificada en extractos de glándula hipófisis como un factor estimulante del crecimiento (Asdell, 1932). Sin embargo, posteriormente, su actividad biológica fue asociada con el aumento de la producción de leche en ratas y cabras, y con la disminución del contenido graso de la carcasa en ratas en crecimiento. Desde entonces, se han encontrado efectos de esta hormona en numerosos tejidos y sustancias en circulación (Revisado por Etherton y Bauman, 1998). Muchas de estas funciones son mediadas por el factor de crecimiento tipo insulínico I (IGF-1) y tienen como resultado la proliferación celular (Prosser y Davis, 1990). El desarrollo de la tecnología del ADN recombinante a principios de 1980 posibilitó la producción

de grandes cantidades de STH recombinante bovina (rbSTH) y (rpSTH) porcina (Etherton y Bauman, 1998).

La STH opera a través del eje somatotrópico, el cual se encuentra constituido por la STH, los factores de crecimiento tipo insulínico I y II (IGF-1; IGF-2), proteínas ligadoras de GH (GHBP), proteínas ligadoras de IGF 1 a 6 (IGFBP 1 a 6) y los receptores de la GH (GHR) e IGFs (IGFRs) (Lucy, 2012). La STH es sintetizada por las células somatotropas de la glándula hipófisis, y su secreción episódica está bajo control de la hormona liberadora de la GH, de la somatomedina y de la grelina. La STH actúa principalmente en el hígado estimulando la producción y liberación de IGF-1 al torrente circulatorio donde ejerce numerosas funciones relacionadas con el metabolismo de proteínas, lípidos y carbohidratos y regula la función de muchos tejidos (Etherton y Bauman, 1998; Lucy, 2012).

La STH ha tenido amplio uso en producción animal en diversas especies de animales domésticos, y su efecto sobre el crecimiento, lactación y reproducción han sido descritos (Etherton y Bauman, 1998; Hernández-Cerón y Gutiérrez Aguilar, 2013).

2.3.1. Efecto de la somatotropina sobre la reproducción

El efecto de la STH sobre la reproducción ocurre a través de su acción directa sobre los tejidos reproductivos (por ejemplo, CL, células de la granulosa) o a través de la mediación de IGF-1 producida localmente o en el hígado (Lucy, 2001). Los ARNm para el receptor de STH, IGF-1 y IGFBP2 fueron identificados en el útero, folículo dominante y cuerpo lúteo de la vaca (Lucy, 2012). Se ha asociado la actividad biológica de la STH e IGF-1 con la regulación del desarrollo folicular, maduración del ovocito, función luteal, tasa de fertilización, desarrollo embrionario temprano y con el reconocimiento materno de la gestación (Hernández-Cerón y Gutiérrez Aguilar, 2013).

Se ha propuesto una teoría para explicar la acción de la STH sobre las principales células funcionales del ovario (células de la granulosa, de la teca interna y luteales). Según este modelo, algunas de las acciones de la STH en el ovario la ejerce esta hormona directamente a través de sus receptores en estos tejidos (GHR tipo 1b y 1c), o mediante la síntesis local de IGF-1 (Lucy et al.,

1999). La STH también puede regular ciertas funciones ováricas mediante la unión a su receptor en el hígado (GHR tipo 1a). Esto trae como consecuencia la secreción hepática de IGF-1 que a través de la circulación sanguínea llega a los ovarios afectando las funciones ováricas. Según evidencias, la IGF-1 puede actuar sinérgicamente con las gonadotropinas, dado que la IGF-1 estimula el incremento de las gonadotropinas, y estas últimas aumentan los niveles de IGF-1. Esta acción conjunta y sinérgica resulta en el aumento de la esteroidogénesis en los ovarios (estradiol, progesterona). A su vez, el E2 folicular puede actuar a nivel hipotalámico e hipofisiario a través de un mecanismo de retroalimentación positiva estimulando la secreción de STH desde las células somatotropas. En respuesta al incremento de la STH circulante se estimula la secreción de IGF-1 desde el hígado, la cual alcanza el ovario influenciando ciertas funciones ováricas (Lucy, 2012). La IGF-1, a través de un mecanismo de feedback negativo, suprime la secreción hipofisiaria de STH (Lucy et al., 1999).

Según Lucy et al. (1999), la acción de la STH no es imprescindible para la reproducción. Esta aseveración se basa en el hecho de la inactivación o expresión anormal del receptor de STH (en humanos, vacas y ratones) no impidió que estos mamíferos se reprodujeran, aunque la eficiencia reproductiva fue baja comparado a los que expresan adecuadamente el receptor. De acuerdo a ello, se deduce que existe un papel facilitador, pero no obligatorio, de la GH en los procesos reproductivos (Lucy et al., 1999).

Las acciones de la STH se han evaluado en vivo mediante la administración de bSTH. La administración de vaquillas lecheras con bSTH incrementó el número de folículos de 3-5 mm y de 6-9 mm comparado con las vaquillas no tratadas (Kirby et al., 1997). Un efecto similar de la STH en el crecimiento de folículos de talla media fue también observado en ovejas (Gong et al., 1996; Joyce et al., 1998; González et al., 2006; Camacho et al., 2012). En base a estos hallazgos en bovinos, se probó si con la administración de STH se podía aprovechar el aumento en el número de folículos medianos para mejorar la respuesta superovulatoria. Sin embargo, la aplicación exógena de STH no incrementó el número de ovulaciones ni el número de embriones transferibles, así como tampoco mejoró la tasa de preñez de las vaquillas receptoras cuando se aplicó al momento de la transferencia de embriones (Lucy, 2012).

No obstante, otros estudios en bovinos han obtenido efectos favorables de la STH en la respuesta SOV (Kuehner et al., 1993; Herrler et al., 1994). La aplicación de una dosis de rbSTH (500 mg) 7 días antes de iniciarse el tratamiento SOV con FSH (día 4 del ciclo estral), o coincidiendo con la primera dosis de FSH (día 11), o al momento de la IA, dio como resultado que las vaquillas tratadas el día 11 tuvieron un número significativamente mayor de CL que las no tratadas. En las vaquillas tratadas el día 4, el número de cuerpo lúteo tendió a ser mayor, y se produjeron proporcionalmente más embriones en el grupo tratado con rbSTH que en las vaquillas control (74.6 vs 58.6% respectivamente) (Kuehner et al., 1993). Asimismo, el tratamiento SOV con eCG (2500 UI) y una dosis de rbSTH el día 4 del ciclo estral resultó en la recuperación de un número mayor de embriones transferibles que los animales no tratados con rbSTH (4.2 ± 1.0 vs 2.5 ± 0.7 respectivamente) Herrler et al., 1994).

En pequeños rumiantes el uso de STH en tratamientos SOV ha dado resultados contradictorios. Mientras que mejoró la respuesta biológica en unos estudios (Folch et al., 2001; Navarrete-Sierra et al., 2008; Mejía et al., 2012; Rocha do Nascimento et al., 2013; Carrera-Chávez et al., 2014; González-Gómez et al., 2019), no influenció la respuesta en otros (Eckery et al., 1994; Joyce et al., 1998), o tuvo un efecto adverso (D'Alessandro et al., 1996). En ovejas sujetas a tratamiento SOV, la administración de pSTH incrementó el porcentaje de embriones transferibles (Folch et al., 2001), mientras que la aplicación de esta hormona al momento del celo en ovejas fértiles produjo embriones en estados más avanzados de desarrollo (Mejía et al., 2012) o aumentó la prolificidad de ovejas Pelibuey (Carillo et al., 2007). En otro estudio, sin embargo, la administración de STH antes de la monta en ovejas sincronizadas redujo la tasa de preñez (Camacho et al., 2012).

2.3.2. Efecto de la somatotropina en el desarrollo embrionario

La STH juega un rol en la capacidad de los ovocitos bovinos para madurar dado que tanto las células de la granulosa (murales y del cúmulo) como el ovocito tienen receptores para la STH (Izadyar et al., 1997; Izadyar et al., 1999). La incubación de complejos células del cumulo-ovocitos bovinos, obtenidos de folículos de 2 a 8 mm, en presencia de 100 ng/ml aceleró la maduración ovocitaria ya que un porcentaje significativamente mayor de ovocitos alcanzaron

la metafase II (MII) a las 16 y 22 horas de incubación (Izadyar et al., 1999). Según evidencias, el rol regulador de la maduración ovocitaria por la STH ocurre a través de las células del cúmulo, ya que los ovocitos desnudos, o desprovisto de células del cúmulo, tuvieron una tasa de maduración similar en los tratados y no tratados con STH (Izadyar et al., 1997). La acción de la STH durante la maduración ocurrió a través de los receptores de STH y no por mediación del IGF-1 producido localmente (Izadyar et al., 1997). Asimismo, la presencia de receptores de STH fueron detectados en embriones preimplantación (Izadyar et al., 2000), específicamente en la masa celular interna de blastocistos de 8 días (Kolle et al., 2001). La adición de STH en el medio de cultivo (fluido oviductal sintético) incrementó la tasa de clivaje, la proporción de embriones de 8 células, de blastocistos y de blastocistos que eclosionaron (Izadyar et al., 2000). Aparentemente, la acción de la STH en la maduración ovocitaria ocurre mediante mecanismos paracrinós y/o autocrinós (Beverly y Izadyar, 2002).

El receptor de STH también fue detectado en el ovocito y en embriones preimplantación (Du et al., 2010). La adición de 300 ng/ml de STH en el medio de cultivo incremento la tasa de maduración de ovocitos ovinos colectados de folículos de 2-6 mm de ovejas en la estación no reproductiva, incremento el porcentaje de ovocitos que alcanzaron la MII, a las 16 como a las 24 horas de incubación, con respecto al control (Shirazi et al., 2010). La STH estimuló un incremento en la tasa de clivaje solo cuando el medio de cultivo contenía suero fetal bovino. En presencia de suero en el medio de cultivo la STH incrementó el porcentaje de blastocistos y de blastocistos eclosionados. En ausencia de suero, la STH no mejoró el porcentaje de blastocistos y de blastocistos eclosionados con respecto al control (Shirazi et al., 2010).

El tratamiento con bSTH en vaquillas de carne con dos niveles nutricionales resultó en un incremento del número de folículos cuantificados por ultrasonido, pero no influenció el número y calidad de ovocitos recuperados mediante aspiración folicular guiada por ultrasonido (OPU), así como tampoco la producción de blastocistos (Tripp et al., 2000). De igual modo, Bols et al. (1998) tampoco encontraron un efecto de la administración semanal de STH (640 mg) sobre la proporción de ovocitos que alcanzaron el estadio de blastocistos.

2.4. Transferencia de embriones

Una vez que se colectan los embriones de las ovejas superovuladas, y que las hembras receptoras están preparadas, se lleva a cabo la transferencia de los embriones. Esta es una etapa muy importante del programa de SOV, ya que de no tenerse éxito en esta fase se pierde una gran inversión, en términos de gastos de hormonas, DIV, pajuelas de IA, horas hombre y tiempo (Gibbons y Cueto, 2013). Es también una etapa crítica porque los embriones producidos por la donadora son depositados en el útero de la oveja receptora. Esta debe proveerle un ambiente uterino adecuado para que el embrión logre implantarse (Wilmot y Sales, 1981, Lonergan y Forde, 2015), se complete la fase embrionaria, este se desarrolle como un feto a lo largo de la gestación, y resulte en el nacimiento de una cría sana.

2.4.1. Implantación embrionaria en ovejas

Ya sea que haya ocurrido fecundación de ovocitos o se haya transferido uno o más embriones, la presencia de uno o varios embriones en el útero activa mecanismos para proteger el tejido luteal y darle continuidad a la gestación. Desde hace más de 70 años Casida y Warwick (1945) habían indicado la necesidad del cuerpo lúteo para mantener la gestación en las ovejas. En general, en los rumiantes es imprescindible la función luteal para que la gestación se desarrolle con normalidad (Haytell et al., 2010). La P4 producida por el(los) cuerpo(s) lúteo(s) es de importancia esencial para mantener las condiciones apropiadas del ambiente uterino durante el periodo de preimplantación, y para proveer nutrición histiotrófica al embrión (Haytell et al., 2010). Bindon (1981) demostró en ovejas ovariectomizadas inyectadas con dosis diarias de P4, que en la medida que la dosis diaria de P4 aumentó (1, 4 o 6 mg) la altura de epitelio y estrato glandular uterino aumentó, así como también se incrementó el número de embriones viables en el día 20 de gestación.

En la oveja y otras especies domésticas, el embrión entra en el útero (oveja día 3 o 4) antes de la blastulación. Al finalizar este proceso, pocos días después, el embrión, conocido en este estadio como blastocisto, tiene forma esférica y consiste del trofoectodermo que rodea o envuelve a la masa celular interna y a la cavidad del blastocisto o blastocele (Haytell et al., 2010). Durante la formación

de la placenta, el trofoectodermo se denomina trofoblasto y es esencial durante la gestación, pero es expulsado durante el parto como parte de la placenta (Haytell et al., 2010). Antes de que se inicie la implantación es necesario que el blastocisto, que se forma en el día 6 a 7, sea extruido de la zona pelúcida, lo cual ocurre entre los días 8 y 9 de gestación (Spencer et al., 2004).

La implantación en las ovejas comienza en los días 15 a 16 de preñez, y se extiende hasta los días 50 a 60. Este evento toma lugar por la unión superficial entre el trofoectodermo del embrión y el epitelio endometrial (Spencer et al., 2004). Una vez que el blastocisto se deshace de la zona pelúcida, rápidamente cambia de la forma esférica a la tubular y filamentosa entre los días 12 y 15 (Johnson et al., 2018; Figura 6). Este es un paso imprescindible para que se inicie la implantación, que implica la aposición y adhesión del trofoectodermo al epitelio superficial y glandular uterino. Durante esta etapa, ocurre una pérdida leve y transitoria de epitelio uterino que hace posible el contacto estrecho entre el trofoectodermo y la lámina basal adyacente a las células del estroma (Bazer et al., 2012).

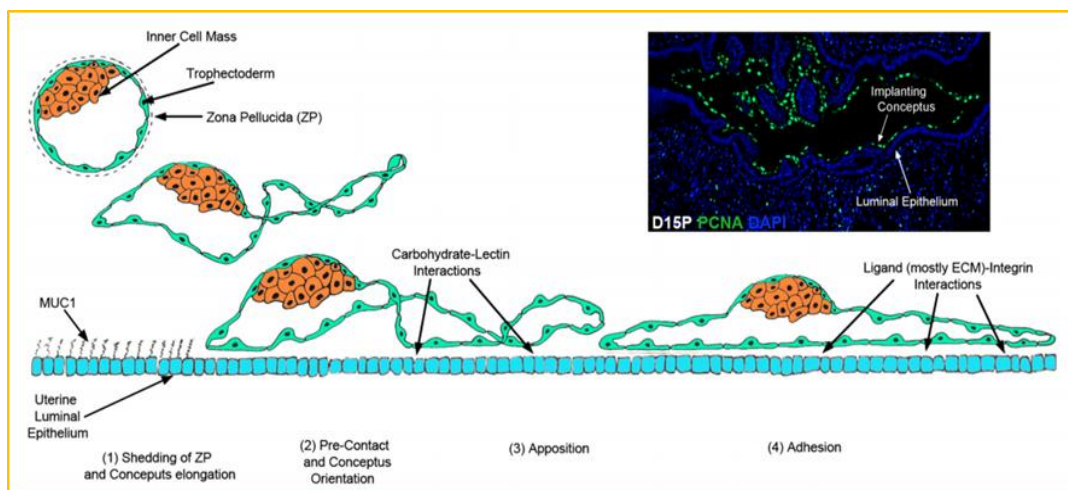


Figura 6: Elongación del blastocisto en un concepto filamentoso. Los embriones de oveja ingresan al útero alrededor del día 3 o 4, se convierten en blastocistos esféricos y luego, después de la eclosión de la zona pelúcida, se transforman en embriones tubulares y filamentosas entre los días 12 y 15 de preñez

Fuente: (Johnson et al., 2018)

Las glándulas uterinas juegan un papel funcional crucial en el proceso de implantación (Spence y Bazer, 2002). Su función es sintetizar y secretar, y transportar selectivamente sustancias desde el suero al interior del lumen uterino, una gran variedad de sustancias que en conjunto se denominan

histotrofo (Spencer et al., 2015). Este es considerado un fluido uterino complejo de importancia vital para la sobrevivencia embrionaria, el cual está constituido por una mezcla de iones, aminoácidos, proteínas, lípidos y otras sustancias, cuya composición está regulada por la P4 y por el concepto (embrión/feto y membranas extraembrionarias asociadas) a través de la expresión de numerosos genes en el epitelio y estrato glandular del útero (Spencer et al., 2015).

La implantación en la oveja ocurre en cuatro etapas: 1) desprendimiento de la zona pelúcida, 2) precontacto y orientación del blastocisto, 3) aposición, y 4) adhesión (Figura 7). En estas etapas intervienen numerosas sustancias que juegan roles fundamentales en el proceso. Entre estas se destacan la mucina glicoproteína 1 (MUC1), molécula de adhesión celular glicosilada (GlyCAM-1), galectina-15, integrinas, osteopontina, etc. (Spencer et al., 2015).

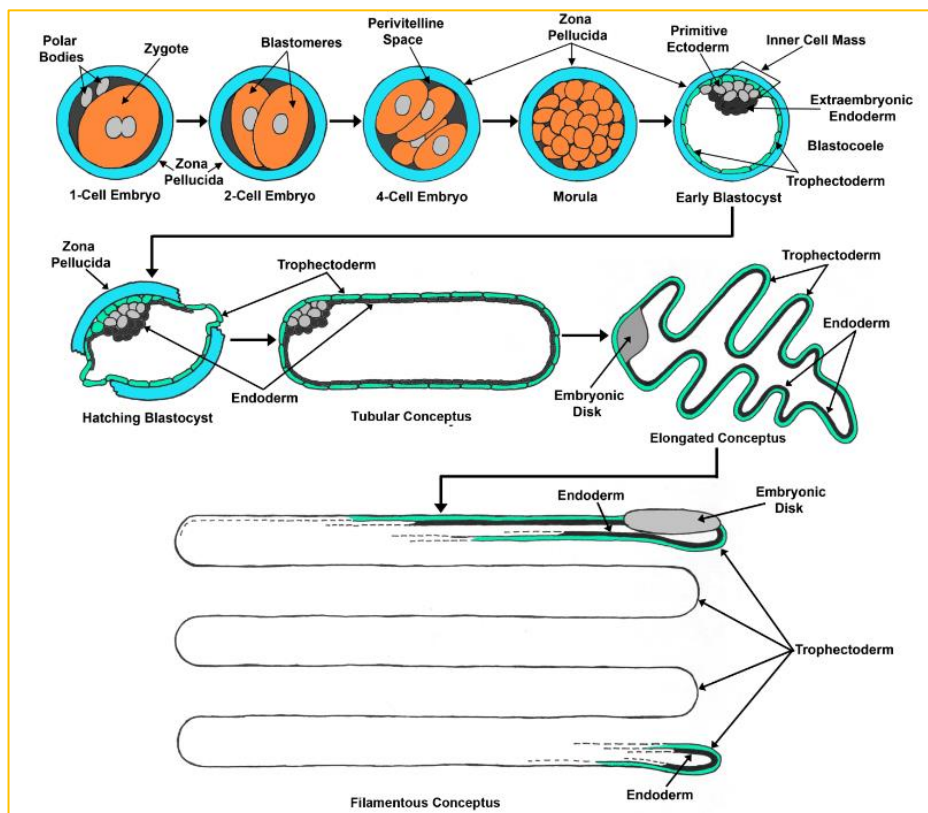


Figura 7: Cascada de adhesión del embrión al endometrio que conduce a la implantación
Fuente: (Johnson et al., 2018)

2.4.2. Reconocimiento materno de la gestación en ovejas

El reconocimiento materno de la gestación (RMG) es el proceso a través de cual el concepto activa mecanismos fisiológicos que prolongan la vida del tejido luteal (Bazer et al., 2017). En los rumiantes, este evento es imprescindible para que la gestación llegue a término (Casida y Warwick, 1945). Como se indicó anteriormente, la P4 regula la receptividad y la adecuación fisiología del ambiente uterino para que, si ocurre la fecundación, el(los) embrión(es) resultantes se desarrollen adecuadamente (Bazer et al., 2017).

Entre los días 10 y 12 luego de la monta o IA, tanto en las ovejas cíclicas como en las preñadas, la P4 induce la expresión de numerosos genes relacionados con la implantación, migración y la elongación del concepto (revisado por Brooks et al, 2014; Spencer et al., 2015). Este hecho es brevemente precedido por la subregulación de los RP4 por la P4, y ocurre en los días 10-12 en el epitelio superficial y 12-16 en el epitelio glandular del endometrio luego del inicio del estro (Spencer et al., 2015). Entre estos genes (por ejemplo: galetina-15 [LGALS15], IGFBP1, catepsina L1 [CTSL1], Cistatina C [CTS] 3 y 6, péptido liberador de gastrina [GRP], transportadores de glucosa [SLC2A 1, SLC2A 5, SLC5A 1], y otros) se encuentran la prostaglandina G/H sintasa y ciclooxigenasa 2 (PTGS2) y la hidroxisteroide (11-beta) deshidrogenasa 1 (HSD11B1), las cuales están involucradas en la síntesis de prostaglandinas (PGF) y cortisol, respectivamente (Brooks et al, 2014).

Si la monta o IA es exitosa y los embriones entran al útero de la oveja, pocos días después el trofoectodermo de estos secretan PGFs, interferón tau (INFt) y cortisol, los cuales actúan en el endometrio uterino sobrerregulando la expresión de muchos de los genes que se expresaron por acción de la P4 en los días previos (Spencer et al., 2015). Esto causa cambios en algunos componentes del histotrofo que regulan el alargamiento del concepto a través de los efectos sobre la proliferación y migración del trofoectodermo (Lonergan y Forde, 2015).

En los rumiantes es bien conocido que el INFt es el elemento encargado de indicar al sistema materno la presencia de un embrión en el lumen uterino de la hembra gestante. El INFt es una proteína constituida por 172 aminoácidos y un peso molecular de 19 kDa, que se une a su receptor en el endometrio uterino

(Bazer et al., 1997). Fue inicialmente identificada en la oveja y denominada proteína trofoblástica ovina tipo 1, debido a que era la principal proteína secretada por el trofoectodermo del concepto durante el periodo de implantación (Bazer et al., 1997). Moor y Rowson (1966) determinaron que la infusión dentro del útero de un homogenizado de conceptos en los días 12 a 14 extendía el intervalo interestrual de las ovejas. De este hallazgo se dedujo que el concepto producía una sustancia antiluteolítica dado que prolongaba la permanencia de(los) CL(s) en los ovarios (Bazer et al., 1999).

Luego de años de investigación se comprobó que el concepto a través del INFt activa un mecanismo que impide la regresión del cuerpo lúteo. Durante el ciclo estral, al final del diestro, la P4 subregula sus propios receptores en el endometrio uterino, tal como se indicó previamente. La disminución sustancial de los RP4 y de las acciones que estos desencadenan intercelularmente cuando la P4 se une a su receptor, permiten un aumento en la expresión de los receptores de E2(RE2) y de oxitocina. Estos dos receptores son importantes ya que, cuando se unen a sus ligandos, median la síntesis y secreción episódica de $\text{PGF2}\alpha$ desde el endometrio uterino (Bazer, 2020). Paralelamente, la P4 estimula el incremento de los depósitos intracelulares de fosfolípidos y de la enzima PGF sintasa en el epitelio uterino, lo cual se traduce en la síntesis y almacenamiento de PGFs en las células endometriales. Luego del aumento de los receptores de E2 y oxitocina, el E2 estimula la síntesis de $\text{PGF2}\alpha$ luteal y endometrial. La oxitocina liberada de forma pulsátil desde el CL y la hipófisis posterior, induce la secreción episódica de $\text{PGF2}\alpha$ que causa la regresión del CL en el día 16 del ciclo estral de la oveja (Bazer, 2020).

Durante el RMG el INFt se une a su receptor en el endometrio y, a través de la vía de señalización JAK-STAT, inhibe la transcripción de los receptores de E2 y oxitocina, lo cual evita la secreción pulsátil luteolítica de $\text{PGF2}\alpha$, asegurando la permanencia del tejido luteal y la producción de P4 y, por lo tanto, el desarrollo de una gestación normal (Books et al., 2014).

Otro hecho importante durante el RMG es la síntesis de PGE2 a expensas de una menor producción de $\text{PGF2}\alpha$ por el epitelio endometrial. La vía para la producción PGE2 implica la generación del endoperóxido cíclico inestable

PGH2, principalmente a través de COX-2, que luego es convertido en PGE2. La PGE2, producida en respuesta al INFT secretado por el trofoectodermo del concepto, actúa sistémicamente durante el RMG como un agente luteotrópico y antiluteolítico simultáneamente (Kumar et al., 2013).

2.4.3. Mortalidad embrionaria en ovejas

La muerte embrionaria (ME) es una problemática que afecta la eficiencia reproductiva, la producción y el rendimiento económico de los sistemas de producción de rumiantes (Diskin y Morris, 2008). Esta puede ocurrir muy temprano luego de estro, es decir antes del RMG, o luego de que este evento ocurre, lo cual tiene implicaciones clínicas evidentes. En el primer caso, la muerte del embrión evita que se active el mecanismo de RMG y, por lo tanto, la regresión de CL toma lugar y el ciclo estral tiene una duración normal. En esta situación la pérdida embrionaria pasa desapercibida. En el segundo caso, el embrión activa el mecanismo de RMG, el tejido luteal se mantiene y el ciclo estral de la oveja se extiende más allá de los 20 días post-celo (Edey, 1967). En este caso, el aumento del intervalo interestrua es indicativo de ME.

Considerando diferentes condiciones a las que las ovejas están expuestas y a las características propias de las numerosas razas ovinas, la prevalencia de ME estarían en un rango de 20 a 30% y ocurren principalmente en los primeros 30 días de gestación (Edey, 2013). Existe un porcentaje basal de pérdidas embrionarias que no pueden atribuirse a una causa particular, que ocurren normalmente y puede variar de una raza a otra. Esto significa que, si no hay una causa ambiental o genética aparente, la pérdida embrionaria puede atribuirse a fallas en el clivaje o en desarrollo embrionario, o alternativamente, a un ambiente oviductal y/o uterino inadecuado (Edey, 2013).

Por ejemplo, se ha demostrado que la probabilidad de sobrevivencia embrionaria disminuye conforme aumenta la tasa de ovulación (Hanrahan, 1994 citado por Diskin y Morris (2008). Dicho de otra manera, a mayor tasa de ovulación mayor porcentajes de muerte embrionaria. Las causas de ME son diversas (revisado por Diskin y Morris, 2008; Shah, 2019). Existen causas infecciosas que alteran el microambiente oviductal y/o uterino que causan la muerte del embrión. En algunos casos los procesos infecciosos, además de

producir sustancia embriotóxicas, pueden alterar el histotrofo, e incluso, inducir la liberación de $\text{PGF2}\alpha$ desde el endometrio, lo cual es causal de luteólisis y muerte embrionaria (Shah, 2019). En general, las enfermedades inflamatorias que afectan otros tejidos diferentes al reproductivo y producen muchos mediadores inflamatorios pueden causar ME.

Entra las causas no infecciosas se encuentran la causadas por alteraciones cromosómicas. Entre ellas se encuentran el mosaicismo diploide-multiploide. En ovejas se llevó a cabo un estudio para estudiar las anomalías cromosómicas en embriones producidos in vivo e in vitro. Se encontró que una mayor proporción de embriones producidos in vitro (65.3%) tenían células multiploides en comparación a las producidas in vivo (19.6%). La proporción de células poliploides por embrión mixoploide en los embriones producidos in vitro oscilaban entre el 1,4% y el 30,3%, en contraste con menos del 10% entre los embriones producidos in vivo (Coppola et al., 2007).

Otra de las causas no infecciosas de ME es la relacionada con el aspecto nutricional (de Brun et al., 2016; García-Pintos y Menchaca, 2017). En general, la desnutrición afecta el eje hipotálamo-hipófisis-ovarios lo cual afecta la eficiencia reproductiva. En estos casos las pérdidas embrionarias están asociadas a CL subfuncionales que producen concentraciones de P4 menores a las normales y necesarias para para el establecimiento y mantenimiento de la preñez (de Brun et al., 2016; García-Pintos y Menchaca, 2017; Fernández et al., 2019).

CAPITULO III

3. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Ubicación del ensayo

El presente trabajo investigativo se lo realizo en la comunidad María Auxiliadora, en la provincia del Cañar, cantón Azogues, parroquia Luis Cordero (Figura 1), ubicada a 2810 msnm en las coordenadas 2.7332719 – 78.814118. En el cuadro 1 se muestra información adicional que caracterizan la unidad de producción donde se realizó la investigación.

Cuadro 1: Características de la unidad de producción donde se realizó la presente investigación.

Propietario	Justo Prieto
Ubicación	Provincia del Cañar -Cantón Azogues-Parroquia Luis Cordero comunidad María Auxiliadora
Acceso	Vías de segundo orden
Extensión	3706 m ²
Sistema	Pastoreo
Animales a utilizar	20
Raza	Merino
Altitud	2810 msm
Velocidad del viento	5 km/h
Temperatura	14 °C
Latitud y Longitud	2.7332719 – 78.814118

Fuente: Propia del autor



Figura 8: Ubicación de la unidad de producción en la provincia del Cañar

Fuente: (Google maps, 2020)

3.2. Materiales utilizados

3.2.1. Biológicos

- 20 ovejas receptoras.

3.2.2. Físicos

- Ecógrafo 1
- Computadora
- Ropa de trabajo
- Materiales de campo (pipetas, jeringas, agujas, campos, cámaras fotográficas, sogas, etc.)

3.2.3. Material de laboratorio

- Equipo de laboratorio (estereoscopio, vernier, placas)
- Instrumental quirúrgico,
- Camilla para cirugía
- Bisturí
- Pizas hemostáticas
- Pinzas porta agujas

3.2.4. Hormonas

- Progestágenos sintéticos (Acetato de medroxiprogesterona)/dispositivos intravaginales (esponjas)
- Gonadotropina corionica equina (Novormon)
- Somatotropina Recombinante Bovina. (rBST)
- D- Cloprosteno - Vitaminas (AD3E., complejo B)
- Antiparasitarios (Doramectina, Ektomex)

3.3. Animales y manejo

Se usaron 20 animales mestizos con una condición corporal de 3 a 3.5 en la escala del 1 al 5, con abundante lana, y la mayoría con al menos un parto. Las ovejas fueron desparasitadas, se les administró vitaminas, y se esquilieron. Estas a su vez recibieron un flushing alimenticio, que consistió en un alimento balanceado a base de maíz, soja, afrecho, melaza, prebióticos y sales minerales, con un estimado de proteína del 16%.

La cantidad de alimento suministrada durante la etapa de flushing fue de un balaceado de la marca comercial Pronaca con la siguiente formulación, Proteína cruda (mín.) 16.0%, Grasa cruda (mín.) 2.5%, Fibra cruda (máx.) 15.0%, Ceniza (máx.) 8.0%, Humedad (máx.) 13.0%. De forma creciente, iniciando con 50 gr/día/oveja en los primeros 5 días, llegando a un pico de 500 gr/ día/oveja en los 5 días posteriores, para finalizar disminuyendo la cantidad de alimento hasta 50 gr/día/oveja en los últimos 5 días previo a iniciarse la sincronización del celo. Adicionalmente, los animales pastorearon en potreros de ray grass, trébol y llantén forrajero.

3.3.1. Selección de donantes

Se seleccionaron ovejas que tuvieran por lo menos un parto, para poder comprobar la fertilidad. Mediante ecografía se verificó que los animales estuvieran en óptimas condiciones reproductivas, y mediante evaluación clínica general que no presentaran lesiones pódalas y tuvieran buena salud.

3.3.2. Grupos experimentales

Las ovejas fueron asignadas aleatoriamente a dos grupos experimentales: "A" (n=10), que fueron transferidas con embriones provenientes de donadoras tratadas con dos dosis de rbST (al inicio y en el día 14 del protocolo de superovulación), y "B" (n=10), recibieron embriones de donadoras no tratadas con rbST.

3.3.3. Tratamientos de sincronización

El chequeo ginecológico, determino cual del grupo de receptoras estaba apta a inducir o sincronizar el celo; tomando muy en cuenta que todos los animales no responden homogéneamente a los tratamientos, se procedió a sincronizar un grupo de 10 receptoras para elegir a los animales que mejor respondieron a la sincronización mediante el tamaño y la consistencia del cuerpo lúteo.

Una vez sincronizadas las receptoras, según se indica en el Cuadro 2 y 3 se esperó que entraran en celo, y se contaron 7 días para que los animales estuvieran aptos para recibir el embrión.

Cuadro 2: Protocolo de sincronización de receptoras con rBST

DIA	HORA	ACTIVIDAD	CANTIDAD	OBSERVACION
0	7am	Colocar esponjas	1 Unidad	100mg rBST
14	7 am	Retiro de esponjas		
14	7 am	eCG	400 UI	
14	7am			100mg rBST
15	7am	Detección de celos		
20	7am	Retiro de agua y comida		
21	10am	Transferencia de embriones		

Cuadro 3: Protocolo de sincronización de receptoras sin rBST

DIA	HORA	ACTIVIDAD	CANTIDAD	OBSERVACION
0	7am	Colocar esponjas	1 Unidad	
14	7 am	Retiro de esponjas		
14	7 am	eCG	400 UI	
15	7am	Detección de celos		
20	7am	Retiro de agua y comida		
21	10am	Transferencia de embriones		

3.3.4. Preparación de Soluciones de calentamiento y tiempos de incubación

- Solución de Mantenimiento (SM) (10 ml): 8ml de PBS (buffer fosfato salino) + 2ml de SFB (suero fetal bovino).
- Solución 0.5 M de Sucrosa (S0.5M) (5ml): 5 ml de SM + 855 mg de Sucrosa
- Procedimiento: Se realizó en una placa con pocillos sobre una platina térmica a 39°C.

Se atemperaron los medios de calentamiento a 39°C. En una caja de pocillos, en el pocillo 1 se colocó 1 ml de S0.5M; en el pocillo 2: 800 µl de S0.5M; en el pocillo 3: 400 µl de S0.5M + 400 µl de SM; y en el pocillo 4: 800 µl de SM. Inmediatamente, se retiraron los embriones del NL2 y se colocaron en el pocillo 1 hasta recuperar la estructura. Luego se transfirieron con la menor cantidad posible de volumen al pocillo 2 y se mantuvieron en este medio durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se llevaron con volumen mínimo al pocillo 3 y mantuvieron por 5 minutos. Por último, se efectuó un lavado durante 5 minutos en el pocillo 4 con SM, para luego ser colocado en medio para empajuelarlos y proceder a transferirlos.

3.3.5. Implantación de embriones

3.3.5.1. Transferencia de embriones por laparoscopia latero-ventral

Los embriones fueron transferidos por una técnica quirúrgica mediante laparoscopia ventral, lo cual implicó uso de analgesia y sedación de los animales.

Se realizó una tricotomía (corte de pelo en el área, lavado y desinfección). Por otra parte, se procedió a inyectar anestesia local (lidocaína al 2%) por infiltración, y (xilacina al 2 %) vía intramuscular a continuación, se efectuó una laparotomía de 5 a 7 cm de la línea alba hacia lateral y 3 cm por delante de la ubre, se procedió a incidir con una abertura no mayor a 2 cm.

Se realizaron dos punciones (con trocares) en la cavidad abdominal. La primera punción permitió introducir el laparoscopio, más una válvula para el insuflador; la segunda, una pinza no traumática. Esto permitió la manipulación adecuada del tracto reproductivo, con el fin de fijar la unión útero tubárica. Una vez fijada se exteriorizó, teniendo en cuenta realizar la transferencia en la parte más próxima posible a la unión útero-tubárica. Para realizar esta técnica el tiempo de descongelación y colocación del embrión en el cuerno uterino ipsilateral al cuerpo lúteo fue de 10 a 15 minutos.

3.3.6. Variables de estudio y análisis

3.3.6.1. Criterios de inclusión y agrupamiento

- Ovejas de 1 o 2 partos, sin alteraciones reproductivas y sanas

3.3.6.2. Variable independiente

- Tratamiento o grupo experimental (ovejas transferidas con embriones provenientes de ovejas donadoras tratadas o no con rbST)

3.3.6.3. Variable dependiente

- Porcentaje de preñez en ovejas de raza Mestiza.

Los datos se analizaron mediante la prueba de Chi-cuadrado del programa estadístico SAS (Statistical Analysis System). Se estableció como significativo al valor $P < 0.05$.

CAPITULO IV

4. RESULTADOS

4.1. Descripción de los resultados

De las 20 ovejas transferidas, una de cada grupo experimental no respondió al tratamiento de sincronización (Figura 9). A pesar de ello, cada una fue transferida con un embrión. En el grupo de ovejas que recibieron embriones rbST, 5 de 10 ovejas fueron detectadas gestantes a los 30 días de la transferencia. En el grupo que recibió embriones producidos sin rbST 3 de las 10 ovejas estaban preñadas (Figura 10).

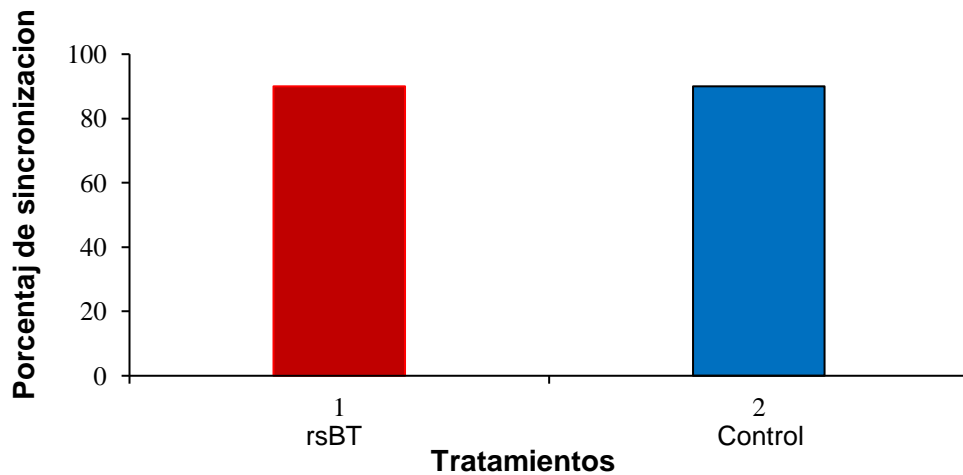


Figura 9: Porcentaje de sincronización del celo en ovejas receptoras de embriones producidos in vivo, vitrificados y calentado, producidos en ovejas Pelibuey tratadas o no con rbST.

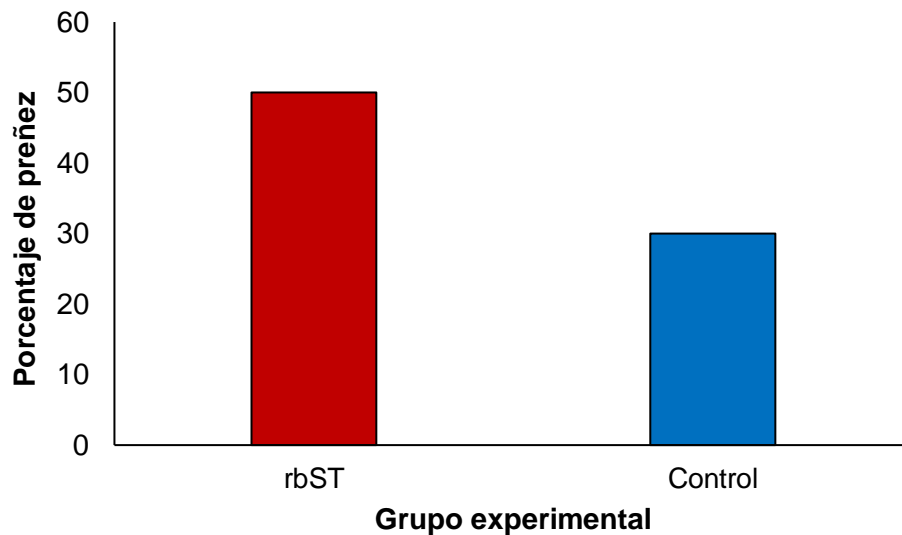


Figura 10: Tasa de preñez en ovejas receptoras de embriones producidos in vivo, vitrificados y calentado, producidos en ovejas Pelibuey tratadas o no con rbST

4.2. Discusión

En este estudio el 90% de ovejas de cada grupo experimental respondieron al tratamiento de sincronización del celo. Estos valores son buenos y coinciden con los obtenidos por Gardón et al. (2015), quienes detectaron un 92% de celos luego de un tratamiento con esponjas intravaginales por 12 días. En el estudio citado, sin embargo, la detección del estro se llevó a cabo durante varios días, mientras que, en el estudio presente, el 90% de las ovejas se fueron identificadas en celo dentro de las 24 horas de retirada la esponja intravaginal.

En otro experimento, en que se probaron tres protocolos de sincronización del estro (9 días de permanencia del DIV) en ovejas Pelibuey, en uno de ellos se aplicó una dosis de 250 mg de rbST dos días antes del retiro del DIV (Sosa-Pérez et al., 2014). Estos autores encontraron que en el grupo tratado con rbST, el 98,3% de las ovejas fueron detectadas en celo, comparado con las no tratadas con rbST (96,6%) o con un DIV y eCG (96,7%). Este porcentaje es 8 puntos porcentuales superior al de nuestra investigación, pero los autores indicaron que el intervalo entre el retiro del DIV y el inicio del estro fue de 31,9 horas, mientras que en nuestro estudio a las 12 horas ya se habían detectado en estro varias ovejas. Una excelente respuesta de celo en un periodo corto de tiempo es de gran importancia para garantizar la efectividad de un tratamiento de sincronización, ya sea para la inseminación artificial o transferencia de embriones frescos o criopreservados.

La presente investigación demostró que las ovejas transferidas con embriones provenientes de donantes Pelibuey tratadas con 200 mg de rbST, 100 mg aplicados en el día de inicio y 100 mg en el día 14 del protocolo de sincronización /superovulación, tuvieron una tasa de preñez 20 puntos porcentuales superior (50%) que las no tratadas con la hormona (30%).

Los valores de preñez alcanzados en este experimento son inferiores a los logrados en ovejas transferidas con embriones provenientes de donadoras tratadas con rbST (Correa-Chávez et al., 2014). En ese estudio las ovejas donadoras fueron tratadas con dos dosis de 0, 50, y 100 mg de rbST al inicio del protocolo de sincronización y al momento de la monta natural controlada. La tasa de preñez no vario estadísticamente entre tratamientos y alcanzó 55.5, 70.0 y

62.5% respectivamente (Correa-Chávez et al., 2014). Sin embargo, hay que tener en cuenta que en el estudio mencionado se transfirieron dos embriones frescos (transferencia directa) por hembra receptora. Por el contrario, en nuestro estudio se transfirió un embrión a cada receptora y cada uno de ellos fue vitrificado/calentado previo a la transferencia.

En otro estudio en que las ovejas fueron tratadas con una dosis de rbST (250 mg por animal) en día de retiro del DIV las tasas de preñez fueron de 89 y 71% para el grupo control y tratado, respectivamente, y no varió entre tratamiento (Camacho et al., 2012). Otro dato importante del estudio citado es que el porcentaje de ovejas que parieron una cría fue 20 puntos porcentuales mayor en el grupo control que en el tratado (61 versus 41% respectivamente), mientras que las que parieron dos corderos fue 20 puntos porcentuales mayor en el grupo tratado con rbST que en el control (59 versus 39% respectivamente); en ambos casos las diferencias no fueron significativas (Camacho et al., 2012). En este caso hay que destacar que las ovejas no fueron superovuladas y las tasas de preñez corresponden a los embriones que se desarrollaron en las hembras luego de la monta (Camacho et al., 2012). En otro estudio similar al citado previamente (ovejas sincronizadas no superovuladas) el tratamiento con 125 mg de rbST cinco días antes de finalizar el protocolo de sincronización no tuvo efecto en la tasa de parición y, al igual que en el estudio anterior, las ovejas control tuvieron mayor proporción de partos simple que las tratadas con rbST (74.3 versus 43.5% respectivamente), mientras que las tratadas con la hormona tuvieron un número significativamente mayor de patos múltiples en comparación al control (56.4 versus 25.7% respectivamente) (Carrillo et al., 2007).

En este estudio los embriones producidos luego del tratamiento SOV fueron vitrificados y conservados en nitrógeno líquido por al menos 6 meses, para luego ser transferidos. La vitrificación es un método de criopreservación ultrarrápido en el cual las células o tejidos (por ejemplo, ovocitos y embriones) son expuestos a elevadas concentraciones de crioprotectores, que al enfriarse pasan del estado líquido al sólido sin formación de cristales de hielo (Celestinos y Gatica, 2002). Aunque la vitrificación puede reducir los efectos detrimentales de la formación extracelular e intracelular de cristales de hielo en la membrana plasmática y organelas celulares, los efectos físicos de esta técnica de criopreservación

afecta la capacidad de los embriones ovinos de sobrevivir luego que son calentados (Papadopoulos et al., 2002). La tasa de preñez se redujo significativamente cuando se transfirieron embriones vitrificados con respecto a los transferidos in vivo (50 versus 90% respectivamente) (Papadopoulos et al., 2002). El efecto de la vitrificación fue aún más evidente con embriones producidos in vitro, obteniéndose una tasa de preñez de 54.3 versus 5.0% en ovejas receptoras transferidas con embriones in vitro frescos y vitrificados respectivamente (Papadopoulos et al., 2002).

Aunque en este estudio y en los citados previamente las diferencias de las tasas de preñez entre las receptoras que recibieron embriones derivados de donadoras tratadas y no tratadas con rbST pueden haber sido no significativas, las diferencias numéricas fueron considerables y tienen importancia práctica y económica. El mecanismo a través del cual la rbST puede conferirle al embrión producido en una hembra tratada con la hormona mayor capacidad de sobrevivir en el ambiente uterino de una oveja receptora (no tratada con rbST) no se conoce con exactitud. Lo que es evidente es que las hembras sincronizadas o sincronizadas/superovuladas tratadas con rbST tuvieron mayor concentración de P4 y/o IGF-1, insulina y glucosa (Mejias et al., 2012; Camacho et al., 2012; Carrera-Chávez et al., 2014; Carrera-Chávez et al., 2016) y mayor expresión de INFt en los blastocistos mayores que las no tratadas (Mejias et al., 2012). Estas condiciones endocrinas y una mayor capacidad del embrión para producir INFt pudiera representar ventajas biológicas que les brindaron mayor viabilidad y, por lo tanto, mayor capacidad para señalar su presencia en el útero de la receptora. Esto se puede reflejar en mayor concentración circulante de P4, que está asociada a mayores tasas de preñez (Lonergan y Forde, 2015).

4.3. Conclusiones

- Las ovejas transferidas con embriones derivados de donadoras tratadas con rbST tuvieron una tasa de preñez de 50%, mientras que las receptoras que recibieron embriones producidos en hembras no tratadas con la hormona, la tasa de preñez fue de 30%.
- Aunque esta diferencia fue no significativa, numéricamente es relevante para una explotación ovina comercial. Obtener 2 crías más por cada 10 hembras transferidas podría tener importantes implicaciones productivas y económicas.

4.4. Recomendaciones

- Se recomienda repetir esta investigación con un número considerablemente mayor de transferencias. De repetirse los resultados de este estudio esto podría permitir un análisis estadístico más robusto.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Abecia, J.A., Lozano, J.M., Forcada, F., Zarazaga, L. (1997). Effect of level of dietary energy and protein on embryo survival and progesterone production on day eight of pregnancy in Rasa Aragonesa ewes. *Animal Reproduction Science*, 48(2-4), 209-218.
- Abecia, J.A., Forcada, F., Lozano, J.M. (1999). A preliminary report on the effect of dietary energy on prostaglandin F2 alpha production in vitro, interferon-tau synthesis by the conceptus, endometrial progesterone concentration on days 9 and 15 of pregnancy and associated rates of embryo wastage in ewes. *Theriogenology*, 52(7), 1203-1213.
- Asdell, S.A. (1932). The effect of the injection of hypophysial extract in advanced lactation. *American Journal of Physiology*, 100, 137-140.
- Bartlewski, P.M., Fuerst, K.J., Alexander, B.D., King, W.A. (2009). Systemic concentrations of endogenous and exogenous FSH in anoestrous ewes superstimulated with Folltropin-V. *Reproduction in Domestic Animals*, 44, 353-358.
- Bartlewski, P.M., Baby, T.E., Giffin, J.L. (2011). Reproductive cycles in sheep. *Animal Reproduction Science*, 124, 259-268.
- Bartlewski, P.M., Seaton, P., Franco Oliveira, M.E., Kridli, R.T., Murawski, M., Schwarz, T. (2016). Intrinsic determinants and predictors of superovulatory yields in sheep: Circulating concentrations of reproductive hormones, ovarian status, and antral follicular blood flow. *Theriogenology*, 86(1), 130-143.
- Bazer, F.W., Spencer, T.E., Ott, T.L. (1997). Interferon tau: A novel pregnancy recognition signal. *American Journal of Reproductive Immunology* 37, 412-420.
- Bazer, F.W., Thatcher, W.W., Hansen, P.J., Mirando, M.A., T.L., Ott, Plante, C. (1999). Physiological mechanisms of pregnancy recognition in ruminants. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 43, 39-47.
- Bazer FW, Song G, Kim J, Dunlap KA, Satterfield MC, Johnson GA, Burghardt RC, Wu G. (2012). Uterine biology in pigs and sheep. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 3(1), 23.
- Bazer, F.W., Wu, G., Johnson, G.A. (2017). Pregnancy recognition signals in mammals: the roles of interferons and estrogens. *Animal Reproduction*, 14(1), 7-29.
- Bazer, W.B. (2020). Reproductive physiology of sheep (*Ovis aries*) and goats (*Capra aegagrus hircus*). *Animal Agriculture*. Chapter 11, pp 199-209. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817052-6.00011-2>.

- Bevers, M.M., Izadyar, F. (2002). Role of growth hormone and growth hormone receptor in oocyte maturation. *Molecular Cellular Endocrinology*, 197(1-2), 173-178.
- Bindon, B.M. (1971). The role of progesterone in implantation in the sheep. *Australian Journal of Biological Science*, 24, 149-158.
- Bunma, T., Vonnahme, K.A., Vasquez-Hidalgo, M.A., Swanson, K.C., Dorsam, S.T., Ward, A.K., Navanukrav, C., Grazul-Bilska, A.T. (2020). Nuclear and membrane progesterone receptors expression in placenta from early to late pregnancy in sheep: Effects of restricted nutrition and realimentation. *Theriogenology*, 148, 95-102.
- Brooks K, Burns G, Spencer TE. 820149. Conceptus elongation in ruminants: roles of progesterone, prostaglandin, interferon tau and cortisol. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 5(1), 53.
- Camacho, L.E., Benavidez, J.M., Hallford, D.M. (2012). Serum hormone profiles, pregnancy rates, and offspring performance of Rambouillet ewes treated with recombinant bovine somatotropin before breeding. *Journal of Animal Science*, 90(8). 2826-2835
- Candappa, I.B.R., Bartlewski, P.M. (2011). A review of advances in artificial insemination (AI) and embryo transfer (ET) in sheep, with the special reference to hormonal induction of cervical dilation and its implications for controlled animal reproduction and surgical techniques. *Open Reproduction Science Journal*, 3,162-175.
- Camacho, L.E., Benavidez, J.M., Hallford, D.M. (2012). Serum hormone profiles, pregnancy rates, and offspring performance of Rambouillet ewes treated with recombinant bovine somatotropin before breeding. *Journal of Animal Science*, 90(8), 2826-2835.
- Carrera-Chávez, J.M., Hernández-Cerón, J., López-Carlos, M.A., Lozano-Domínguez, R.R., Molinar, F., Echavarría-Cháirez, F.G., Bañuelos-Valenzuela, R., Aréchiga-Flores, C.F. (2014). Superovulatory response and embryo development in ewes treated with two doses of bovine somatotropin. *Animal Reproduction Science*, 151(3-4), 105-111.
- Carrera-Chávez, J.M., Hernández-Cerón, J., Aréchiga-Flores, C.F. López-Carlos, M.A., Lozano-Domínguez, R.R., Quezada-Casasola, A., Echavarría-Cháirez, F.G. (2016). Lambing rate and prolificacy in inseminated hair sheep treated with bovine somatotropin. *Tropical Animal Health and Production*, 48, 699-703.
- Carrillo, F., Hernández-Cerón, J., Orozco, V., Hernández, J.A., Gutiérrez, C.G. (2007). A single dose of bovine somatotropin 5 days before the end of progestin-based estrous synchronization increases prolificacy in sheep. *Animal Reproduction Science*, 2007, 102(1-2):31-37.

- Casida, L.E., Warwick, E.J. (1945). The necessity of the corpus luteum for maintenance of pregnancy in the ewe. *Journal of Animal Science*, 4, 34-36.
- Celestinos, M., Gatica, M.V. (2002). Vitricación como técnica de crioconservación de embriones bovinos. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 34(2). <http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2002000200002>.
- Coppola G, Alexander B, Di Berardino D, St John E, Basrur PK, King WA. (2007). Use of cross-species in-situ hybridization (ZOO-FISH) to assess chromosome abnormalities in day-6 in-vivo- or in-vitro-produced sheep embryos. *Chromosome Research*, 15(3):399-408.
- Daly, J., Smith, H., McGrice, H.A., Kind, K.L., van Wettere, W.H.E.J. (2020). Towards improving the outcomes of assisted reproductive technologies of cattle and sheep, with particular focus on recipient management. *Animals (Basel)*, 10(2), 293.
- D'alessandro, A., Casamassima, D., Cafueri, C., Martemucci, G. (1996). Effect of association of recombinant bovine somatotrophin to superovulatory treatment with FSH-p on embryo production in ewes. *Italian Veterinary Archive*, 46(6), 251-259.
- De Brun, V., Meikle, A., Fernandez-Foren, A., Forcada, F., Palacin, I., Menchaca, A., Sosa, C., Abecia, J.A. (2016). Failure to establish and maintain a pregnancy in undernourished recipient ewes is associated with a poor endocrine milieu in the early luteal phase. *Animal Reproduction Science*, 173, 80-86.
- Diskin, M.G., Morris, D.G. (2008). Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reproduction in Domestic Animals*, 43(Suppl. 2), 260-267.
- Du, C., Li, H., Cao, G., Xilingaowa, Wang, C., Li, C. (2010). Expression of the Orexigenic Peptide Ghrelin and the Type 1a Growth hormone secretagogue receptor in sheep oocytes and pre-implantation embryos produced in vitro. *Reproduction in Domestic Animals*, 45, 92-98.
- Dutt, R.H., Casida, L.E. (1948). Alteration of the estrual cycle in sheep by use of progesterone and its effect upon subsequent ovulation and fertility. *Endocrinology*, 43, 208-217.
- Eckery, D.C., Moeller, C.L., Nett, T.M., Sawyels, H.R. (1994). Recombinant bovine somatotropin does not improve superovulatory response in sheep. *Journal of Animal Science*, 72, 2425-2430.
- Edey, T.N. (1967). Early embryonic death and subsequent cycle length in the ewe. *Journal of Reproduction and Fertility*, 13, 437-443.
- Edey, T.N. (2013). Embryo mortality. En: Tomes, G.L., Robertson, D.E., Lightfoot R.J. (Ed). *Sheep Breeding: Studies in the Agricultural and Food Sciences*. Butterworth-Heinemann Editions, 596 pp.

- El-Hayek, S., Clarke, H.J. (2016). Control of Oocyte Growth and Development by Intercellular Communication Within the Follicular Niche. *Results and Problems in Cell Differentiation*, 58, 191-224.
- Eppig, J.J. (2001). Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, 122(6), 829-838.
- Etherton, T.D., Bauman, D.E. (1998). Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. *Physiological Reviews*, 78, 745-761.
- Evans, A.C.O., Duffy, P., Hynes, N., Boland, M.P. 2000. Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. *Theriogenology*, 53, 699-715.
- Evans, A.C.O. (2003). Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. *Animal Reproduction Science*, 78, 289-306.
- Fernandez, J.; Bruno-Galarraga, M.M.; Soto, A.T.; de la Sota, R.L.; Cueto, M.I.; Lacau-Mengido, I.M.; Gibbons, A.E. (2019). Effect of GnRH or hCG administration on day 4 post insemination on reproductive performance in merino sheep of north Patagonia. *Theriogenology*, 126, 63-67.
- Fierro, S., Gil, J., Viñoles, C., Olivera-Muzante, J. (2013). The use of prostaglandins in controlling estrous cycle of the ewe: A review. *Theriogenology*, 79, 399-408.
- Folch, J., Ramón, J.P., Cocero, M.J., Alabart, J.L., Beckers, J.F. (2001). Exogenous growth hormone improves the number of transferable embryos in superovulated ewes. *Theriogenology*, 55, 1777-1785.
- García-Pintos, C.; Menchaca, A. (2017). Pregnancy establishment and maintenance after the administration of equine chorionic gonadotropin (eCG) associated or not with gonadotropin-releasing hormone (GnRH) after insemination in sheep. *Animal Production Science*, 58, 1802–1806.
- Gardón, J.C., Escribano, B., Astiz, S., Ruiz, S. 2015. Synchronization protocols in Spanish Merino sheep: reduction in time to estrus by the addition of eCG to a progesterone-based estrus synchronization protocol. *Annals of Animal Science*, 15 (2), 409–418
- Gelez, H., Fabre-Nys, C. (2004). The “male effect” in sheep and goats: a review of the respective roles of the two olfactory systems. *Hormones and Behavior*, 46, 257- 271.
- Gibbons, A.E., Cueto, M.I. 2013. Transferencia de embriones en ovinos y caprinos. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina. https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta-transferencia_de_embriones_en_ovinos_y_caprinos.pdf.

- Goodman, R.L. (2015). Neuroendocrine control of gonadotropin secretion: comparative aspects. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, Fourth Edition. Chapter 33, pp 1537-1574.
- González-Gómez, A., Sánchez-Dávila, F., Vásquez-Armijo, J.F., Bosque-González, A.S., Ledezma-Torres, R.A., Bernal-Barragán, H. (2019). Respuesta ovulatoria y embrionaria a la somatotropina bovina recombinante en cabras superovuladas con FSHp. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 6(16): 115-120.
- González-Bulnes, A., Menchaca, A., Martin, G.B., Martines-Rios, P. (2020). Seventy years of progestagen treatments for management of the sheep oestrous cycle: where we are and where we should go. *Reproduction, Fertility and Development*, 32, 441-452.
- Goodman, R.L., Inskeep, E.K. (2015). Control of the ovarian cycle of the sheep. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, Fourth Edition. Chapter 27, pp 1259-1305.
- Gong, J.G., Campbell, B.K., Bramley, T.A., Webb, R. (1996). Treatment with recombinant bovine somatotrophin enhances ovarian follicle development and increases the secretion of insulin-like growth factor-I by ovarian follicles in ewes. *Animal Reproduction Science*, 41, 13-26.
- Grazul-Bilska, A.T., Thammaviri, J., Kraisoorn, A., Reyaz, A., Bass, C.S., Kaminski, S.L., Navanukraw, C., Redmer, D.A. (2018). Expression of progesterone receptor protein in the ovine uterus during the estrous cycle: Effects of nutrition, arginine and FSH. *Theriogenology*, 108, 7-15.
- Habeeb, H.M.H., Kutzler, M.A. (2021). Estrus synchronization in the sheep and goat. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 37, 125-137.
- Hafez, E.S.E, Hafez, B. (2013). *Reproduction in Farm Animals*. Wiley-Blackwell; 7th ed. Baltimore Maryland, USA.
- Hyttel P, Sinowatz F, Vejlsted M. (2010). *Domestic Animal Embryology*. London: Elsevier; p. 68-78.
- Hazlerigg, D., Simonneaux, V. (2015). Seasonal regulation of reproduction in mammals. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, Fourth Edition. Chapter 34, pp 1575-1603.
- Herrler, A., R. Einspanier, D. Schams, Niemann, H. (1994). Effect of recombinant bovine somatotropin (rBST) on follicular IGF-I contents and the ovarian response following superovulatory treatment in dairy cows: a preliminary study. *Theriogenology* 41, 601-611.
- Hernandez-Ceron, J., Gutierrez-Aguilar, C.G. (2013). La somatotropina bovina recombinante y la reproducción en bovinos, ovinos y caprinos. *Agrociencia*, 47, 35-45.

- Hytell, P., Sonowatz, F., Vejlsted, M. (2012). *Essentials of Domestic Animal Embryology*. Elsevier.
- Izadyar, F., Colenbrander, B., Bevers, M.M. (1996). In vitro maturation of bovine oocytes in the presence of growth hormone accelerates nuclear maturation and promotes subsequent embryonic development. *Molecular Reproduction and Development*, 45, 372-377.
- Izadyar, F., Colenbrander, B., Bevers, M.M. (1997). Stimulatory effect of growth hormone on in vitro maturation of bovine oocytes is exerted through cumulus cells and not mediated by IGF-I. *Molecular Reproduction and Development*, 47, 175-180.
- Izadyar, F., Van Tol, H.T.A., Hage, W.G., Bevers, M.M. (1997). Preimplantation bovine embryos express mRNA of growth hormone receptor and respond to growth hormone addition during in vitro development. *Molecular Reproduction and Development*, 52, 247-255.
- Johnson, G.A., Bazer, F.W., Burghardt R.C., Wu, G., Seo, H., Kramer, A.C., McLendon, B.A. (2018). Cellular events during ovine implantation and impact for gestation. *Proceedings of the 10th International Ruminant Reproduction Symposium (IRRS 2018)*; Foz do Iguaçu, PR, Brazil, September 16th to 20th, 2018.
- Karsch, F.J., Bittman, E.L., Foster, D.L., Goodman, R.L., Legan, S.J., Robinson, J.E. (1984). Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. *Recent Progress in Hormone Research*, 40, 185-232.
- Kirby, C.J., Smith, M.F., Keisler, D.H., Lucy M.C. (1997). Follicular function in lactating dairy cows treated with sustained-release bovine somatotropin. *Journal of Dairy Science*, 80(2), 273-285.
- Kolle, S., Stojkovic, M., Prella, K., Waters, M., Wolf, E., Sinowatz, F. (2001). Growth hormone (GH)/GH receptor expression and GH mediated effects during early bovine embryogenesis. *Biology of Reproduction*, 64, 1826-1834.
- Kuehner, L. F., D. Rieger, J. S. Walton, X. Zhao, Johnson, W.H. (1993). The effect of a depot injection of recombinant bovine somatotropin on follicular development and embryo yield in superovulated Holstein heifers. *Theriogenology*, 40, 1003-1013.
- Kumar, R., Ramteke, P.W., Nath, A., Kumar Pramod, R., Satyendra, P.S., Sharma, S.K., Kumar, S. (2013). Role of candidate genes regulating uterine prostaglandins biosynthesis for maternal recognition of pregnancy in domestic animals. *ISRN Physiology*, Volume 2013, Article ID 854572.
- Lonergan, P., Forde, N. (2015). The Role of progesterone in maternal recognition of pregnancy in domestic ruminants. *2015;216:87-104. Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology*, 216, 57-104.

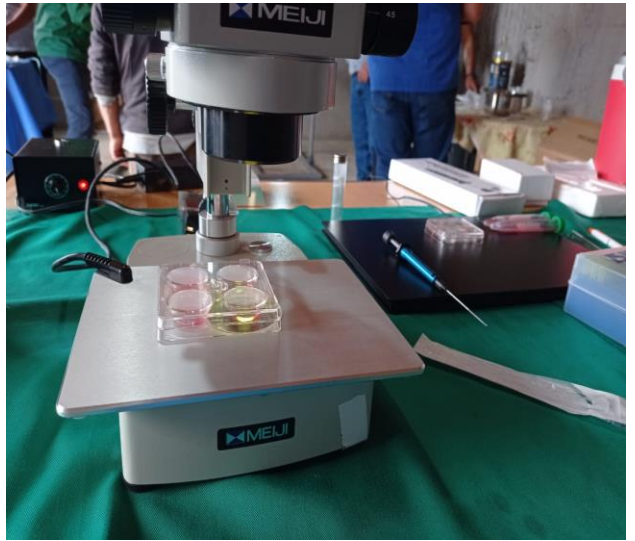
- Lucy, M.C., Bilby, C.R., Kirby, C.J. Yuan, W., Boyd, C.K. (1999). Role of growth hormone in development and maintenance of follicles and corpora lutea. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 54, 49-59.
- Lucy, MC. (2000). Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. *Journal of Dairy Science*, 83(7), 1635-1647.
- Lucy, M.C. (2012). Growth hormone regulation of follicular growth. *Reproduction, Fertility and Development* , 24, 19-28.
- Menchaca, A., Vilariño, M., Crispo, M., de Castro, T., Rubianes, E. (2010). New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*, 22, 113-118.
- Miyamoto, A., Shirasuna, K., Sasahara, K. (2009). Local regulation of corpus luteum development and regression in the cow: Impact of angiogenic and vasoactive factors. *Domestic Animal Endocrinology*, 37, 159-169.
- Moor, R.M., Rowson, L.E.A. (1966). The corpus luteum of the sheep: Effect of the removal of embryos on luteal function. *Journal of Endocrinology*, 34, 497-502.
- Navarrete-Sierra, L.F., Cruz-Tamayo, A.A., González-Parra, E.I., Piña-Aguilar, R.E., Sangines-García, J.R., Toledo-López, V., Ramón-Ugalde, J.P. (2008). Efecto de la aplicación de la hormona de crecimiento recombinante (rbST) sobre la respuesta superovulatoria y la viabilidad embrionaria en ovejas de pelo. *Revista Científica*, 18(2), 175-179.
- Oliveira, M.E.F., Cordeiro, M.F., Ferreira, R.M., Souza, S.F., Pieroni, J.S.P., De Souza Rodrigues, L.F., Fonseca, J.F., Vicente, W.R.R. (2012). Does supplemental LH changes rate and time to ovulation and embryo yield in Santa Ines ewes treated for superovulation with FSH plus eCG? *Ciencia Rural*, 42, 1077-1082.
- Papadopoulos S, Rizos D, Duffy P, Wade M, Quinn K, Boland MP, Lonergan P. (2002). Embryo survival and recipient pregnancy rates after transfer of fresh or vitrified, in vivo or in vitro produced ovine blastocysts. *Animal Reproduction Science*, 74(1-2), 35-44
- Porras, A., Quintero, L.A., Méndez, J. (2003). Estacionalidad reproductiva en ovejas. *Ciencia Veterinaria*, 9, 1-34.
- Prosser, C.G., Davis, S.R. (1992). Milking frequency alters the milk yield and mammary blood flow response to intra-mammary infusion of insulin-like growth factor-I in the goat. *Journal of Endocrinology*, 135, 311-316.
- Ramos, A.F., Silva, B.D.M. (2018). Hormonal protocols in small ruminants. In: *Reproduction Biotechnology in Farm Animals*. Bergstein-Galan, T.G. (Ed.). AvidScience, Chapter 5, pp 138-199.

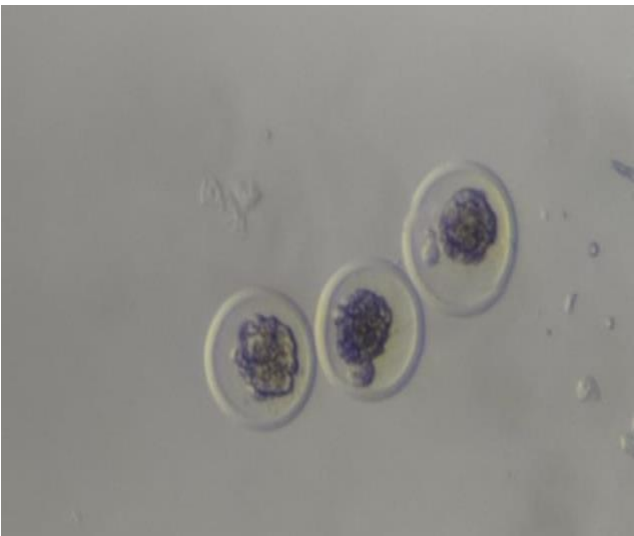
- Rawlings, N.C., Bartlewski, P.M. (2016). Clinical reproductive physiology of ewes. *Veterian Key*. Chapter 87. Pp 462-649. <https://veteriankey.com/clinical-reproductive-physiology-of-ewes/>
- Rocha Do Nascimento, I.M., Sousa Júnior, A., Castelo Branco, M.A., Carvalho, Y.N.T., Mota, L.H.C.M., Ferreira, S.B., Souza, I.O.T., Moraes Júnior, F.J., Leal, T.M., Souza, J.A.T. (2013). Calidad del cuerpo lúteo y embrión de ovejas Santa Inés superovuladas con FSH asociada a rbST. *Archivos Brasileños de Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 65(5), 1376-1382.
- Senger, P. (2012). Pathways to pregnancy and parturition. *Current Conceptions*, Inc. 3th ed. Redmond OR, USA.
- Shah, B.R. (2019). Factors leading to early embryonic death. *Nepalese Veterinary Journal*, 36: 118-125.
- Shirazi, A., Shams-Esfandabadi, N., Ahmadi, E., Heidari, B. (2010). Effects of growth hormone on nuclear maturation of ovine oocytes and subsequent embryo development. *Reproduction in Domestic Animals*, 45, 530-536.
- Simonetti, L., Forcada, F., Rivera, O.E., Carou, N., Alberio, R.H., Abecia, J.A., Palacin, I. (2008). Simplified superovulatory treatments in Corriedale ewes. *Animal Reproduction Science*, 104, 227-237.
- Sosa-Pérez, G., Pérez-Hernández, P., Vaquera-Huerta, H., Salazar-Ortiz, J., Sánchez-del-Real, C, Cadena-Villegas, S., Gallegos-Sánchez, J. (2014). Somatotropina bovina recombinante en sincronización de estros y prolificidad de ovejas Pelibuey. *Archivos de Zootecnia*, 63, 219-222.
- Spencer, T.E, Bazer, F.W. (2002). Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy. *Frontiers in Bioscience*, 7, d1879-98.
- Spencer, T.E., Johnson, G.A., Bazer, F.W., Burghardt, R.C. (2004). Implantation mechanisms: insights from the sheep. *Reproduction*, 128(6), 657-668.
- Spencer TE. (2014). Biological roles of uterine glands in pregnancy. *Seminar in Reproductive Medicine*, 32(5), 346-57.
- Spencer, T.E., Forde, N., Lonergan, P. (2015). The role of progesterone and conceptus-derived factors in uterine biology during early pregnancy in ruminants. *Journal of Dairy Science*, 99, 5941-5950.
- Weems, P.W., Goodman, R.L., Lehman, M.N. (2015). Neural mechanisms controlling seasonal reproduction: principles derived from the sheep model and its comparison with hamsters. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 37, 43-51.
- Wilmut, I., Sales, D.I. (1981). Effect of an asynchronous environment on embryonic development in sheep *Journal of Reproduction and Fertility*, 61(1), 179-184.

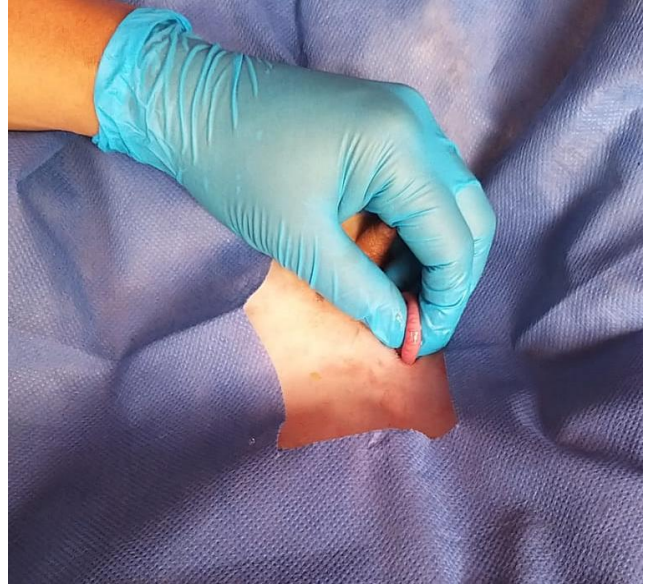
Joyce, I.M., Khalid, M., Haresign, W. (1998). Growth hormone priming as an adjunct treatment in superovulatory protocols in the ewe alters follicle development but has no effect on ovulation rate. *Theriogenology*, 50, 873-884.

XI. ANEXOS Imágenes









XII. Autorización de Publicación en el repositorio Institucional



Patricio Javier Arce Prieto portador(a) de la cédula de ciudadanía N° **0302025168**. En calidad de autor/a y titular de los derechos patrimoniales del trabajo de titulación **“Relación De La Somatotropina Recombinante Bovina Con La Tasa De Preñez De Embriones Ovinos Vitrificadas Producidos In Vivo”** de conformidad a lo establecido en el artículo 114 Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, reconozco a favor de la Universidad Católica de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos y no comerciales. Autorizo además a la Universidad Católica de Cuenca, para que realice la publicación de éste trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 21 de Diciembre del 2021

F:

Patricio Javier Arce Prieto

C.I. 0302025168