

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA

SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



SUPERFOLICULACION EN OVEJAS EN  
ANESTRO ESTACIONAL

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCION  
ANIMAL

PRESENTA:  
JOSE HORACIO GARCIA QUEZADA

MARIN, N. L.

FEBRERO 1995

IM

SF375

.5

.M6

G3

c.1



1080062388

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA

SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



SUPERFOLIACIÓN EN QUEJAS EN  
AÑESTRO ESTACIONAL

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN  
ANIMAL.

PRESENTA:  
JOSE HORACIO GARCIA QUEZADA

BIBLIOTECA Agronomía U.A.N.L.

12001

8

TN  
SF375  
.5  
.M6  
93

  
Biblioteca Central  
Maestra Solidaridad  
F. tesis

  
URadii Rangel Elias  
UANL  
FONDO  
TESIS MAESTRIA

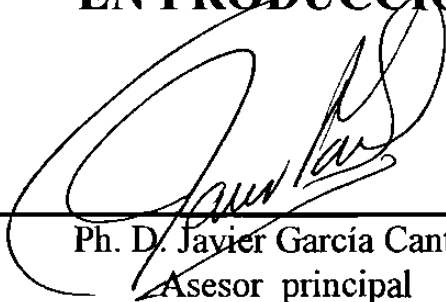
45-636  
F A 1  
1 95

**"SUPERFOLICULACION EN OVEJAS  
EN ANESTRO ESTACIONAL"**

**TESIS**

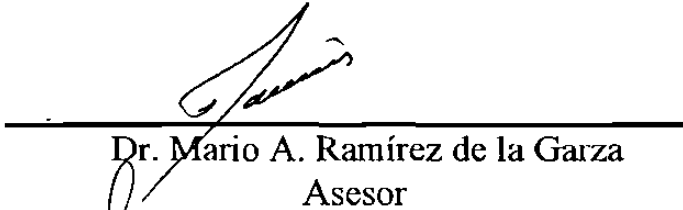
SOMETIDA AL COMITE PARTICULAR COMO REQUISITO  
PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS  
EN PRODUCCION ANIMAL.**



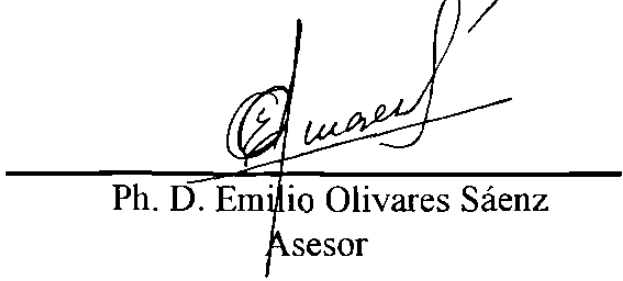
---

Ph. D. Javier García Cantú  
Asesor principal



---

Dr. Mario A. Ramírez de la Garza  
Asesor



---

Ph. D. Emilio Olivares Sáenz  
Asesor

**Febrero de 1995**

## **Dedicatoria**

A mis padres:

**Sr. Isidro García Barragán**

**Sra. Ma. Teresa Quezada Alvarez**

Por el amor y apoyo que siempre me han brindado en cada una de las etapas de mi vida.

A mis hermanos:

**Cuauhtémoc, Leonor Alejandrina y Mariana Gabriela**

Por todo el cariño que nos une, que nos alienta, y nos permite seguir siempre adelante, para alcanzar nuevas metas.

A tí, **Alva**

Con todo mi amor, por todo lo que me has dado y me manifiestas día a día.

## Agradecimientos

Al *Ph. D. Javier García Cantú*, por su siempre incondicional e invaluable cooperación, durante todo el desarrollo de la maestría y de la tesis de grado.

Al *Dr. Juan Fco. Villarreal Arredondo*, por su valiosa cooperación para la favorable culminación de esta maestría.

Al *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)* por su apoyo como estudiante de postgrado.

Al *Ph. D. Rigoberto González González*, por su ayuda brindada como coordinador de la subdirección de estudios de postgrado.

Al *Dr. Mario A. Ramírez de la Garza*, por su atención y valiosas sugerencias al escrito de tesis.

Al *Ph. D. Emilio Olivares Sáenz*, por su buena disposición como colaborador del comité de tesis.

Al *Instituto de Neurobiología de la U.N.A.M.* y muy particularmente a la *Dra. Angélica Salas Valdés* y al *M.C. Gerardo Perera Marín*, por su muy valiosa colaboración en los análisis radioinmunológicos.



# INDICE

Capítulo	Página
RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	3
I. INTRODUCCION.....	5
II. REVISION DE LITERATURA.....	7
2.1. CICLO ESTRUAL.....	7
2.2. DESARROLLO FOLICULAR (Foliculogénesis).....	9
2.3. ESTACIONALIDAD.....	10
2.4. METODOS DE SINCRONIZACION DE CELOS.....	10
2.4.1. Progesterona.....	13
2.4.2. Prostaglandina.....	15
2.4.3 Acetato de medroxiprogesterona (MPA).....	17
2.4.4 .Norgestomet-estradiol valerato.....	19
2.4.5 Estradiol valerato.....	21
2.5. METODO DE SUPERFOLICULACION DE HEMBRAS DONADORAS.....	22
2.5.1. Gonadotropina del suero de la yegua preñada (PMSG)	24
2.5.2. Hormona estimulante del folículo (FSH-P).....	26
2.6. METODO DE OVULACION DE HEMBRAS SUPERFOLICULADAS.....	26
2.6.1. Clorhidrato de naloxona (Naloxona).....	28
2.6.2. Gonadotropina corionica humana (HCG).....	29
2.6.3. Hormona luteinizante (LH).....	31

III. MATERIALES Y METODOS.....	32
3.1. DESCRIPCION DEL LUGAR.....	32
3.2. METODOLOGIA.....	33
3.2.1. Ensayo I.....	33
3.2.2. Ensayo II:.....	38
A) Obtención de la muestra.....	40
B) Determinación de la LH por medio del ensayo de radioinmunoanálisis (RIA).....	41
B.1 Marcación de la proteína.....	41
B.2 Inmunoreactividad.....	41
B.3 Curva estándar.....	41
B.4 Determinación de niveles de LH en suero ovino.....	41
3.3. ANALISIS ESTADISTICO.....	45
IV. RESULTADOS Y DISCUSION.....	47
4.1. RESULTADOS DEL ENSAYO I.....	47
4.2. RESULTADOS DEL ENSAYO II.....	54
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	62
VI. BIBLIOGRAFIA.....	65
VII. APENDICE.....	70
AI. Preparación de esponjas intravaginales.....	70
AII. Amortiguadores para el RIA.....	71
AIII. Inmunoreactividad.....	72
A IV. Cuadros de resultados del análisis de varianza de los datos de la concentración de LH.....	76

## INDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1..... Dosis utilizadas de hormonas gonadotróficas en algunas especies animales para inducir la superovulación en las hembras.	27
Cuadro 2..... Condiciones de temperatura y precipitación en Marín, N.L. prevalecientes durante el desarrollo del experimento.	32
Cuadro 3 ..... Distribución de tratamientos de sincronizadores en la prueba de superfoliculación de ovejas en anestro estacional realizada en junio de 1993 en el Campo de Marín, N.L.	34
Cuadro 4..... Distribución de los tratamientos de foliculadores en la prueba de superfoliculación de ovejas en anestro estacional realizada en junio de 1993, en el Campo de Marín, N.L.	35
Cuadro 5..... Programa de aplicación de la hormona FSH en la prueba de superfoliculación de ovejas en anestro estacional realizada en junio de 1993 en el Campo Experimental de Marín, N.L.	36
Cuadro 6..... Programa de aplicación de la hormona PMSG en la prueba de superfoliculación, de ovejas en anestro estacional realizada en junio de 1993 en el Campo Experimental de Marín, N.L.	36
Cuadro 7..... Tratamientos y dosis usados en la prueba para la determinación de LH en, suero ovino.	38
Cuadro 8..... Programa de actividades para la determinación de concentración hormonal de LH en plasma sanguíneo de ovejas sincronizadas con prostaglandinas f2 $\alpha$ realizado en el campo experimental de Marín, N.L.	39

Cuadro 9.....	40
Calendarización para la obtención de muestras para la prueba de determinación de LH.	
Cuadro 10.....	42
Número de muestreos realizados en la prueba para determinar los niveles de LH, en el suero sanguíneo.	
Cuadro 11.....	43
Protocolo realizado para conocer la dilución del 1 <sup>er</sup> anticuerpo (anti-gLH) en la determinación de LH por el método del RIA.	
Cuadro 12.....	44
Protocolo utilizado para realizar la curva estándar en el análisis del RIA.	
Cuadro 13.....	48
Efecto del MPA en dosis de 50 y 60 mg durante la estación anestro y actividad sexual.	
Cuadro 14.....	48
Valores esperados de los datos del Cuadro 13 que se refiere al efecto del MPA en la estación anestro y actividad sexual.	
Cuadro 15.....	48
Efecto del NGT en dosis de 1.5 y 2.0 mg durante la estación anestro y actividad sexual.	
Cuadro 16.....	48
Valores esperados de los datos del Cuadro 15 que se refiere al efecto del NGT en la estación anestro y actividad sexual.	
Cuadro 17.....	49
Efecto del sincronizador (MPA ó NGT) durante la estación anestro y actividad sexual.	
Cuadro 18.....	49
Valores esperados de los datos del Cuadro 17 que se refiere al efecto del sincronizador durante la estación anestro y actividad sexual.	

Cuadro 19.....	50
Efecto del sincronizador MPA (Acetato de medroxiprogesterona), aplicado con esponja durante la etapa de superfoliculación.	
Cuadro 20.....	51
Efecto del sincronizador NGT (Norgestomet), aplicado en implante durante la etapa de superfoliculación.	
Cuadro 21.....	52
Concentración de datos del sincronizador (MPA o'NGT) con los foliculadores FSH y PMSG.	
Cuadro 22.....	52
Efecto del foliculador (FSH o' PMSG) durante la estación anestro y actividad sexual.	
Cuadro 23.....	53
Valores esperados del Cuadro 22 que se refiere al efecto del foliculador durante la estación anestro y actividad sexual.	
Cuadro 24.....	53
Efecto del foliculador (FSH o' PMSG) en el número de cuerpos lúteos presentes, en ovejas en las cuales se practicó la laparatomía.	
Cuadro 25.....	53
Valores esperados del Cuadro 24 que se refiere al efecto del foliculador en el número de cuerpos lúteos.	
Cuadro 26.....	56
Parámetros de la curva estándar. para el análisis de inmunoreactividad.	
Cuadro 27.....	61
Comportamiento en la ovulación de las borregas tratadas con naloxona, HCG y testigo.	
Cuadro 28 (Apéndice).....	76
Datos de la oveja 3A (0471).	
Cuadro 28 A (Apéndice).....	76
Análisis de varianza de la oveja 3A (0471).	

Cuadro 28 B (Apéndice).....	76
Resultados de la comparación de medias de la oveja 3A (0471).	
Cuadro 29 (Apéndice).....	76
Datos de la oveja 3G (9213).	
Cuadro 29 A (Apéndice).....	76
Análisis de varianza de la oveja 3G (9213).	
Cuadro 29B (Apéndice).....	77
Resultados de la comparación de medias de la oveja 3G (9213).	
Cuadro 30 (Apéndice).....	77
Datos de la oveja 3H (92109).	
Cuadro 30 A (Apéndice).....	77
Análisis de varianza de la oveja 3H (92109).	
Cuadro 30 B (Apéndice).....	77
Resultados de la comparación de medias de la oveja 3H (92109).	
Cuadro 31 (Apéndice).....	77
Datos de la oveja 3B (2-125).	
Cuadro 31 A (Apéndice).....	78
Análisis de varianza de la oveja 3B (2-125).	
Cuadro 31 B (Apéndice).....	78
Cuadro de medias de la oveja 3B (2-125).	
Cuadro 32 (Apéndice).....	78
Datos de la oveja 3C (92-70).	
Cuadro 32 A (Apéndice).....	78
Análisis de varianza de la oveja 3C (92-70).	
Cuadro 32 B (Apéndice).....	78
Cuadro de medias de la oveja 3C (92-70).	
Cuadro 33 (Apéndice).....	79
Datos de la oveja 3F (2-66).	

Cuadro 33 A (Apéndice).....	79
Análisis de varianza de la oveja 3F (2-66).	
Cuadro 33 B (Apéndice).....	79
Cuadro de medias de la oveja 3F (2-66).	
Cuadro 34 (Apéndice).....	79
Datos de la oveja 3I (92152).	
Cuadro 34 A (Apéndice)..	79
Análisis de varianza de la oveja 3I (92152).	
Cuadro 34 B (Apéndice).....	80
Cuadro de medias de la oveja 3I (92152).	
Cuadro 35 (Apéndice).....	80
Datos de la oveja 3D (9296).	
Cuadro 35 A (Apéndice).....	80
Análisis de varianza de la oveja 3D (9296).	
Cuadro 35 B (Apéndice).....	80
Cuadro de medias de la oveja 3D (9296).	
Cuadro 36 (Apéndice).....	80
Datos de la oveja 3E (2130).	
Cuadro 36 A (Apéndice).....	81
Análisis de varianza de la oveja 3E (2130).	
Cuadro 36 B (Apéndice).....	81
Cuadro de medias de la oveja 3E (2130).	
Cuadro 37 (Apéndice).....	81
Datos de la oveja 3J (9289).	
Cuadro 37 A (Apéndice).....	81
Análisis de varianza de la oveja 3J (9289).	
Cuadro 37 B (Apéndice).....	81
Resultados de la comparación de medias de la oveja 3J (9289).	

## INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1..... Eficiencia de marcación, actividad específica y yodo incorporado de la LH marcada, para determinar su concentración en el suero sanguíneo.	55
Figura 2..... Comportamiento de las fracciones 7, 8, y 9 y su determinación de la dilución a usar de acuerdo al % de unión máxima cercano al 50%.	55
Figura 3..... Comportamiento de la concentración de la LH antes y después del estímulo de las ovejas usadas como grupo testigo.	58
Figura 4..... Comportamiento de la concentración de la LH antes y después del estímulo de las ovejas tratadas con HCG.	59
Figura 5..... Comportamiento de la concentración de la LH antes y después del estímulo de las ovejas tratadas con Naloxona.	60



## RESUMEN

### SUPERFOLICULACION DE OVEJAS EN ANESTRO ESTACIONAL

Treinta y seis ovejas fueron tratadas con progestágenos y gonadotropinas en una prueba que tuvo como objetivo el provocar superfoliculización durante el anestro estacional. El ensayo se efectuó en el municipio de Marín Nuevo León, localizado a 25° 53' latitud norte y 100° 10' longitud oeste, a una altitud de 367.3 msnm. Diez y ocho ovejas fueron tratadas con esponjas intravaginales de 3 y 5 cm de diámetro y longitud, respectivamente. Estas fueron impregnadas con 50 y 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (MPA), diluída en aceite de maíz y alcohol bencílico (10%) más antibiótico. El segundo grupo fué tratado con implantes subcutáneos de Hidron, que contenían 2 o 1.5 mg de norgestomet (NGT). En la aplicación de implantes se aplicó intramuscularmente 0.5 ml de MPA (0.75 mg) y vaierato de estradiol (1.25 mg) diluídos en aceite de maíz 90 % y alcohol bencílico 10 %; ocho de cada dieciocho ovejas fueron sometidas a un programa de superfoliculización, con FSH o PMSG. FSH se aplicó durante 4 días, con dosis de 4, 4, 3 y 1 mg de FSH para los días 9, 10, 11, y 12, respectivamente, a partir de la sincronización. Mil UI de PMSG se aplicaron, en el día 15 a partir de la sincronización. A todas las ovejas se les aplicó prostanglandinas  $f_2\alpha$  (5 mg de dinoprost trometamina) en la submucosa vaginal 24 horas antes de retirar sincronizadores, y clorhidrato de naloxona (0.4 mg) 48 horas después. Los resultados mostraron que 72 y 83 % de las ovejas rompieron el anestro estacional cuando se trataron con MPA o NGT, respectivamente. Los porcentajes de ovejas en estro son independientes ( $P>0.05$ )

BIBLIOTECA REGIONAL U.A.N.L.

del tipo de sincronizador usado. A la observación del ovario por laparatomía, se observó un promedio de cuerpos lúteos de 10 y 11, para ovejas tratadas con FSH y PMSG, respectivamente.

### **DETERMINACION DE CONCENTRACION DE LH EN SUERO OVINO.**

Diez ovejas de segundo parto fueron tratadas para sincronizar el estro con dos dosis (5 mg) de prostaglandinas  $F_2\alpha$  ( $PGF_2\alpha$ ), con un intervalo de 10 días entre aplicaciones. Se formaron 3 grupos de ovejas a los que se les asignaron 3 tratamientos con el objeto de sincronizar la ovulación, que fueron suministrados 48 horas después de la segunda aplicación de  $PGF_2\alpha$ . Tres, tres y cuatro ovejas fueron tratadas con clorhidrato de naloxona, testigo y gonadotropina coriónica humana (HCG), respectivamente. Muestras de sangre fueron colectadas cada seis horas durante los períodos de proestro y de estro hasta la aplicación de los tratamientos, la sangre se centrifugó a 2500 rpm durante diez minutos. El suero fué vertido en microtubos de 1.5 ml y congelado a  $-196^\circ\text{C}$  para su posterior análisis; las muestras se analizaron para la concentración de la hormona luteinizante (LH) por el método de radioinmunoensayo (RIA). Una de las ovejas tratadas con naloxona mostró un nivel de 38.5 ng de LH/ml las dos restantes no mostraron incremento de LH post tratamiento, en el grupo tratado con HCG y en en el grupo testigo no se observaron niveles de LH que induzcan la ovulación. Los resultados de este estudio, sugieren un efecto de naloxona en el incremento de LH durante el estro en ovejas.

## SUMMARY

### SUPERFOLLICULIZATION OF EWES IN SEASONAL ANESTROUS

Thirty six ewes were treated with progestagens and gonadotrophins, to determine superfolliculization effect during seasonal anestrus. The trial was conducted in Marín, Nuevo León, México, located at 25° 5' North latitude and 100° 10' West longitude, and 367 mosl. Intravaginal sponges of 3 and 5 cm of diameter and longitude respectively, were administrated to eighteen ewes, sponges were impregnated with 50 or 60 mg of Medroxyprogesterone acetate (MPA) diluted in corn oil (90%) and Bencilic alcohol (10%) plus antibiotic. The second group was treated with subcutaneous ear implant contained 2 or 1.5 mg of Norgestomet (NGT) in hydron polymer, at implantation time 0.5 ml of a corn oil solution, and MPA (0.75 mg) and Estradiol valerate (1.25 mg) was i.m. administrated at each of 18 ewes. Eight of two 18 groups were selected to superfolliculization program with FSH or PMSG, respectively. The FSH program consisted of i.m. administration of 4, 4, 3 and 1 mg of FSH-P on days 9,10, 11 y 12 after progestagen withdrawal, respectively. The PMSG program consisted of a unic i.m. application of 1000 UI on day 15 after progestagen withdrawal. All ewes in folliculization programs were treated 24 h before and 48 h after synchronized removal, with PGF<sub>2</sub>α (5 mg of Dinoprust trometamine) in vaginal submucosa, and Naloxone clorhidrate (0.4 mg) i.m., respectively. Results of the trial showed 72 and 83 % of ewes with synchronized estrus after application of MPA or NGT, respectively. Ewes in estrus were independent (P < 0.05) of synchronized (MPA or NGT). After laparatomy, the average number of luteos corpus observed were 10 or 11 to FSH and PMSG, respectively.

12004

### **DETERMINATION OF LH CONCENTRATION IN SHEEP'S SERUM**

Ten ewes at second parturition were treated in a synchronization program with two doses (5 mg) of  $\text{PGF}_2\alpha$  administered in sub vaginal mucosae 10 days apart. Forty eight there after 3, 3 and 4 ewes were treated with clorhydrate of naloxone, control and human corionic gonadotrophin, respectively. Blood samples were collected every 6 h during proestrous period and until treatment applications, blood samples were centrifugated at 2500 rpm during ten minutes. Serum was decanted and stored in liquid nitrogen ( $-196\text{ }^\circ\text{C}$ ) in a 1.5 ml microtubes. Serum samples were tawed and analyzed by RIA in order to determine LH concentration. One of three ewes treated with Naloxone clorhydrate showed a 38.5 mg LH/ml Ewes treated with HCG and the control group did not observe LH concentration response to assume ovulation. Results of these survey suggested a naloxone effect on LH during induced estrous.

# CAPITULO I

## INTRODUCCION

El crecimiento progresivo de la población humana, contrariamente a la producción de alimentos, ha obligado al hombre a buscar nuevas y mejores técnicas en la producción agropecuaria, para así satisfacer sus necesidades nutricionales básicas.

El sector ovino va adquiriendo una importancia progresiva; y nuestro mayor problema es la persistencia de sistemas de explotación muchas veces arcaicos, con bajas rentabilidades y escaso control. Así pues, el objetivo del ganadero de ovinos, debe ser la mejora del sistema de producción en todos sus aspectos, con un aumento progresivo de producción. Para ello las técnicas hormonales de control reproductivo se presentan como métodos casi indispensables, ofreciéndonos grandes ventajas, fundamentalmente la puesta en reproducción de ovejas en anestro estacionario, la puesta en reproducción de corderas que hayan adquirido los dos tercios de su peso corporal adulto (peso necesario para alcanzar la pubertad), la obtención de tres partos cada dos años y el uso de la inseminación artificial. Cabe mencionar también aquí, dentro de las técnicas hormonales, el desarrollo folicular múltiple y la superovulación, como un método importante en la reproducción. La metodología del desarrollo folicular múltiple se basa en inyectar hormonas gonadotróficas a las hembras algunos días antes del celo, para conseguir, debido a su acción foliculoestimulante, una cuota de desarrollo folicular superior a la natural por el número de óvulos llevados a maduración y ovulación.

Diversos estudios se han centrado generalmente en el empleo de hormonas de foliculo-estimulantes, como la gonadotropina del suero de la yegua preñada (PMSG),

que posee gran actividad folículo estimulante pero, que carece de capacidad ovulatoria en la mayor parte de las especies. Consecuentemente, es necesaria la administración de la hormona luteinizante (LH) ó un análogo como la gonadotropina corionica humana (HGC) que posee muchas cualidades de tipo LH. Con la combinación de estas dos hormonas generalmente puede inducirse el desarrollo folicular y la ovulación.

El objetivo de este estudio es establecer un protocolo para la foliculización y ovulación en ovejas pelibuey (*Ovis aries*).

Definición de objetivos parciales.

- 1.- Comparar diferentes sincronizadores de celo.
- 2.- Comparar diferentes foliculadores.
- 3.- Comparar diferentes ovuladores en hembras superfoliculadas.

## CAPITULO II

### REVISION DE LITERATURA

#### 2.1. CICLO ESTRUAL

Las ovejas y cabras exhiben estro, o calores, a intervalos regulares durante la estación reproductora. El estro es el período fértil y si la hembra no concibe, se repite cada 16-17 días en la mayoría de las ovejas. En los animales más juvenes este intervalo puede ser de 1-2 días menor. El ciclo estral se puede dividir en dos fases, la fase folicular (período de crecimiento folicular) y fase lútea (período de cuerpo lúteo). El estro se presenta en la última parte de la fase folicular, fase que es relativamente corta sólo 3-4 días en ovejas ocupando la fase lútea el resto del ciclo (13 días).

**Fase folicular.** El crecimiento folicular se encuentra bajo el control de las dos gonadotropinas liberadas en la hipófisis, llamadas hormona foliculo-estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH). La FSH estimula el crecimiento temprano de los folículos y la LH es necesaria para completar las últimas fases del crecimiento. Además, de provocar el crecimiento folicular las gonadotropinas hacen que el folículo secrete hormonas sexuales femeninas, estrógenos e inhibina, que se liberan al torrente circulatorio. La inhibina disminuye los niveles de FSH circulantes: cuando el nivel de estrógenos es lo suficientemente alto se dispara la oleada de LH a partir de la hipófisis. Este efecto, llamado oleada preovulatoria de LH, produce cambios en la pared del folículo que conduce a su rotura y liberación del óvulo.

Los estrógenos circulantes en la corriente sanguínea durante la fase folicular son los responsables de la inducción del comportamiento estral en las hembras. El nivel de estrógenos en la sangre se eleva y alcanza el máximo justamente antes de la aparición del estro. La oleada preovulatoria de LH ocurre al principio del estro, siguiendo luego, a las 18-24 horas, la ovulación.

Además de los estrógenos, las células del estrato granuloso producen la hormona inhibina, que al limitar la secreción de FSH, evita el crecimiento folicular adicional cuando existan folículos de Graff con lo que se limita el ritmo de ovocitación.

**Fase lútea.** Después de la ovocitación el folículo de Graff roto se llena por un coágulo de sangre constituyendo lo que se conoce con el nombre de cuerpo hemorrágico. Por la influencia de LH, las células de granulosa, en la pared del folículo roto, proliferan y se transforman en células luteínicas que subsiguientemente llenan el antro del folículo. A los 4-5 días el cuerpo hemorrágico se transforma en cuerpo amarillo sólido, ó cuerpo lúteo. Este proceso se conoce con el nombre de luteinización.

El cuerpo lúteo secreta la hormona sexual femenina progesterona. El nivel de progesterona en la corriente sanguínea alcanza un máximo después de unos 6 días y permanece alto durante la gestación. Si la hembra no es capaz de concebir, transcurridos unos 11-12 días el cuerpo lúteo disminuye de tamaño, empalidece (*corpus albicans*) y comienza a descender la secreción de progesterona. Al eliminarse esa inhibición al final de la fase lútea aparece una nueva onda de crecimiento folicular y el progreso de un nuevo ciclo.

La inhibición del cuerpo lúteo se debe a la presencia de una sustancia luteolítica, prostaglandina- $F_2\alpha$ , que se produce en el utero después de la exposición a la progesterona. Si el animal queda gestante se suprime la producción de prostaglandina- $F_2\alpha$  permaneciendo activo el cuerpo lúteo (Evans, 1990).



## 2.2. DESARROLLO FOLICULAR (Foliculogénesis)

El proceso de desarrollo folicular comprende dos etapas (Driancourt, 1991), la primera es la basal, que puede ser llevada a cabo aunque sea en parte en la ausencia de gonadotropinas, y la segunda es la etapa tónica, la cual depende del aporte de gonadotropinas.

Durante la segunda etapa, los folículos se hacen extremadamente dependientes de las gonadotropinas, particularmente la FSH. Esta etapa consta de tres procesos casi simultáneos, definidos como reclutamiento, selección y dominancia para su maduración final (Driancourt, 1991 citado por Gutiérrez, 1993).

El reclutamiento consiste en la estimulación del crecimiento de un conjunto de folículos, de entre los cuales surgirá el que llegará a ovularse.

Una vez reclutada cierta cantidad de folículos, se realiza la selección del folículo dominante por interferencia del folículo más grande de esa camada hacia el aporte de gonadotropinas a los folículos pequeños. Hay dos mecanismos posibles para que se desarrolle esta relación, uno es el indirecto, en el cual el folículo más grande inhibe el crecimiento del resto produciendo sustancias como la inhibina y el estradiol que actúan sobre la hipófisis reduciendo la secreción de FSH a niveles insuficientes para los folículos chicos. El otro es directo, por medio de la secreción de factores paracrinos que reducen la sensibilidad de los folículos pequeños a la FSH. Este folículo seleccionado ejercerá dominancia sobre el resto de los folículos. La dominancia se refiere al crecimiento selectivo de un folículo y la atresia que éste provoca en los demás. El folículo dominante es más sensible a las gonadotropinas que los demás folículos, por lo que no sufre atresia a pesar de provocar con sus secreciones una reducción en la producción hipofisiaria de FSH (Echternkamp, *et al.* 1990 citado por Gutiérrez, 1993).

### 2.3. ESTACIONALIDAD

La oveja presenta unos cambios notables de actividad de unas estaciones a otras. Se les denomina a esas hembras como reproductoras de los días cortos, dado que su reproducción comienza cuando se acortan los días, esto es en otoño. El período no reproductor se llama anestro, durante el cual las hembras no presentan síntomas estrales.

Durante el anestro la hipófisis está relativamente inactiva y secreta muy pocas gonadotropinas a la corriente sanguínea. Consecuentemente, el crecimiento folicular no se ve estimulado y la hembra no presenta estro ni ovula. Estimulando el estro y la ovulación, antes de la aparición normal de la estación reproductora, los ganaderos pueden obtener crías listas para el mercado, cuando los precios sean más altos (Evans, 1990).

### 2.4. SINCRONIZACION DE CELOS

Bajo control de celo y ovulación se entiende la inducción de un celo fértil en un momento deseado y, por supuesto, independientemente del ciclo espontáneo del animal. Tiene importancia, sobre todo, en forma de la llamada sincronización del celo, así como la inducción del celo en un período anéstrico del correspondiente animal.

Dentro del margen del planeamiento de una producción dirigida en la reproducción animal, la reproducción controlada llega a alcanzar una particular importancia por eliminación del azar biológico. En relación con esto, es importante la posibilidad de controlar y dirigir el ciclo sexual de las hembras ajustándolo a las previsiones del plan de apareamientos (Smidt, 1972).

La sincronización de estros consiste en controlar el ciclo estral de los animales que están ciclando normalmente, agrupando los períodos de estro en lapsos cortos. La base fisiológica de la sincronización con la progesterona y sus derivados está relacionada con la función del cuerpo lúteo como reguladora del ciclo estral.

Existen muchos progestágenos que se han utilizado para sincronizar estros a través de diferentes vías de administración (intramuscular, oral, vaginal y subcutánea). Los análogos de la progesterona tienen una acción similar a la progesterona, consistente en inhibir la ovulación permitiendo la regresión del cuerpo lúteo para asegurar el desarrollo folicular después de retirar el tratamiento con progesterona (Chávez, 1989).

La sincronización de celo comprende, la coordinación simultánea del plazo de celo en grandes grupos de hembras con el fin de que puedan ser cubiertas o inseminadas en el mismo plazo.

En ovejas y cabras, interesa la sincronización del celo, sobre todo para una racionalización de la inseminación; en los rebaños puede ser deseable, además, el ajustamiento de las épocas de parto a un período de tiempo relativamente corto; otra esfera de aplicación de la sincronización del celo, es el trasplante de óvulos.

Para la realización de las ventajas representadas por la sincronización del celo, hay que recurrir a proyectos metódicos que cumplan los requisitos de un empleo práctico en el terreno de la producción animal, debiendo cumplir principalmente el de la simplicidad en su aplicación, seguridad en el resultado y ausencia de duda por lo que respecta a efectos secundarios y consecuencias. En esencia, se pueden presentar las siguientes posibilidades metódicas:

1. Provocación inmediata del celo tras inhibición sexual temporaria.
2. Inducción inmediata del celo por medio de hormonas gonadotróficas ó iniciadores del ciclo.

La represión temporal de celo y ovulación puede realizarse al ser tratados los animales durante un cierto tiempo con gestágenos, lo cual reprime tanto el celo como la ovulación por vía de acoplamiento a reacción negativa, mediante inhibición de la secreción de liberadores, sobre todo del factor liberador de LH. Al cesar la aplicación de gestágenos se presentan de nuevo las funciones sexuales de forma reforzada.

La forma de aplicación de los gestágenos, pueden ser las siguientes:

- 1.-Inyección diaria de la dosis necesaria para la represión de celo y ovulación. Este procedimiento es muy aplicado para fines prácticos.
- 2.-La aplicación diaria de la dosis de gestágenos con el alimento, lo cual supone que una dosificación exacta sólo se puede garantizar en casos de alimentación individualizada.
- 3.-Aplicación diaria del gestógeno disuelto en dimetilosulfóxido (DMSO) sobre la piel o sobre una mucosa. El DMSO penetra a través de la piel y actuando como substancia transportadora facilita el ingreso de los gestágenos.
- 4.-Colocación transitoria en la vagina del animal o en el conducto auditivo de torundas esponjosas impregnadas con el correspondiente gestágeno; el gestágeno será absorbido entonces desde la torunda.
- 5.-Empleo de un depósito subcutáneo de gestágenos, por ejemplo envuelto en una cápsula plástica permeable, a partir de la cual puede ser reabsorbido el gestágeno.

En la sincronización del celo, en ovejas y en cabras, debido a que la aparición del estro depende entre otras cosas, de la duración de la luz diurna, existe la posibilidad, que mediante la programación de los períodos de alumbrado, se influya sobre la aparición del celo en el sentido de una sincronización.

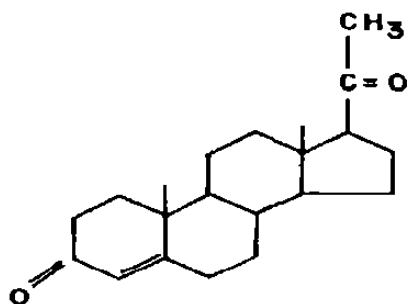
También puede alcanzarse un cierto ajuste temporal del plazo de estro mediante "flushing", es decir, mediante un incremento simultáneo de alimento administrado a todos los animales en cuestión (Smidt, 1972).

Derivaux (1976) menciona que en los grandes rebaños es posible que entren simultáneamente en celo un número suficiente de animales por lo cual se pueden encontrar sin tratamiento, donantes y receptoras suficientes.

La administración continua de progestágenos inhibe la secreción de gonadotropinas y evita la ovulación. La eliminación del bloqueo de progesterona después de la regresión natural del cuerpo lúteo, permite el desarrollo simultáneo de actividad folicular y ovulación en los animales tratados; se pueden obtener resultados similares con la  $\text{PGF}_2\alpha$  y sus análogos, estos compuestos causan lisis inmediata del cuerpo lúteo existente con lo cual, se inicia el desarrollo folicular y ovulación posterior (Holy, 1983).

#### 2.4.1. Progesterona.

Pregn-4-ene-3, 20-diona; hormona del cuerpo lúteo; lutehormona; corlutina; gestona.  $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_2$ ; PM 314.45. La progesterona es el principio activo del cuerpo lúteo, secretado durante la mitad final del ciclo menstrual. Si la preñez sobreviene, la secreción continua. Ejerce un efecto antiovulatorio cuando es administrada durante los días 5 a 25 del ciclo menstrual normal (Budavari *et al.*, 1989).



La progesterona es secretada por las células luteales del cuerpo luteo, por la placenta y las glándulas suprarrenales (adrenales). La progesterona es transportada en la sangre por una globulina enlazadora de andrógenos y progestágenos, la secreción de progesterona es estimulada en principio por la LH. La progesterona prepara el endometrio para la implatación y mantenimiento de la preñez, al incrementar la actividad de las glándulas uterinas e inhibir la motilidad del miometrio. La progesterona actúa en sinergismo con estrógeno para inducir el comportamiento estrual. Desarrolla el tejido secretor (alvéolos) de la glándula mamaria. Altos niveles de progesterona inhiben el pico ovulatorio de la LH de este modo la progesterona es importante en la regulación del ciclo estrual (Hafez, 1993).

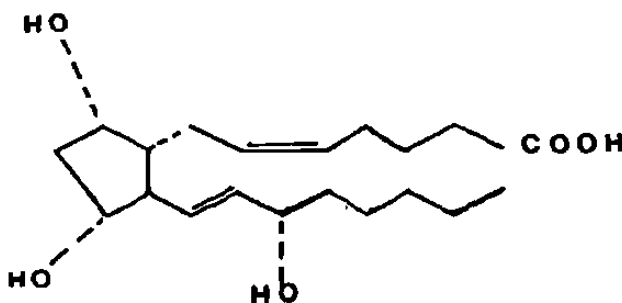
Las técnicas hormonales para la sincronización se basan en estos dos eventos: la observación de la ovulación inhibida por la progesterona y el retiro provocado de ésta. Los diferentes análogos de la progesterona, con un efecto progestativo, se han empleado para el control del estro y ovulación en borregas y cabras. Cada una de éstas, con un modo particular de administración, requiere de experimentos largos y precisos para determinar la dosis efectiva y las condiciones de uso. Además, existen diferencias significativas en la crianza para un progestágeno dado, liberado en un modo de administración determinado (Chemineau, 1991).

La inyección diaria de 5 a 10 mg de progesterona durante 12 a 14 días o de 20 mg cada dos días van seguidas de manifestaciones estrales en los 3 a 6 días que siguen al cese del tratamiento (Derivaux, 1976).

### 2.4.2. Prostaglandina.

Acido 9,11,15-trihidroxi-prosta-5,13 dien-1-óico. Dinoprost; U-14583; Enzaprost F; Glandina; Prostahormona F.

La prostaglandina  $F_2\alpha$  es una de las más estudiadas, biológicamente, por su estrecha relación a la prostaglandina  $E_2\alpha$  ( $PGE_2\alpha$ ) ya que ambas prostaglandinas son sintetizadas de los mismos precursores de tal modo que la  $PGF_2\alpha$  es el producto sintético de la reducción de la  $PGE_2\alpha$ . Las causas de la vasoconstricción y la exhibición de su actividad luteolítica es, más comunmente asociada con su papel en la preñez. Es oxitóxico, causante de aborto (Budavari *et al.*, 1989).



La aplicación de prostaglandinas es ventajosa por la fácil utilización ya que requiere un mínimo de manejo, no existe limitación en cuanto a residuos; entre sus desventajas, podemos mencionar que actúa exclusivamente en animales ciclando, y puede también producir abortos si se aplica a animales al inicio de una gestación, además los calores no se presentan muy agrupados (Odde, 1990).

Las prostaglandinas solo alcanzan una sincronización efectiva después de un ciclo de 5 días, pero solamente cuando existe un cuerpo lúteo. Consecuentemente, 2 inyecciones intramusculares (125 mg de estrumato-clorprostenol, ICI o 4 mg de prosolvin, Intervet) pueden ser dados con un intervalo de 10-14 días de separación a fin de sincronizar la mayoría de las hembras del hato. En borregas la entrada del estro ocurre 36-48 hs después de la inyección; en cabras esta ocurre 72-96 hs después de la inyección. Existe una amplia variabilidad en los datos de fertilidad obtenidos en el estro inducido pero, generalmente, la tasa de fertilidad es más bajo que después de un tratamiento con esponjas. Otra desventaja importante del uso de prostaglandinas para el control del estro son aquellas que no pueden usarse en hembras no ciclando durante períodos no ovulatorios.

En condiciones de rutina las prostaglandinas son usadas satisfactoriamente con un tratamiento corto de progestágeno (11 días) y con PMSG para sincronizar el estro en cabras y borregas en lactancia.

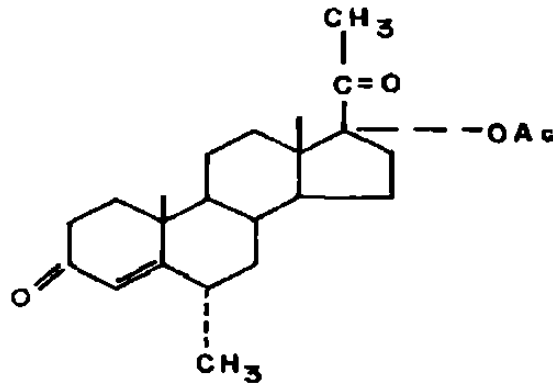
Para evitar los efectos dañinos de la repetición del tratamiento progestágeno-PMSG en borregas no preñadas, los análogos de la prostaglandina se han ensayado intensivamente en los hatos durante la estación de crianza. La inyección de prostaglandina se administra el día 28 después de eliminar la esponja en borregas que se presumen no preñadas. Siguiendo a esta inyección el 90% de las borregas tratadas estarán en estro dentro de los 3 primeros días, pero la tasa de concepción es muy baja comparada con las borregas apareadas en un estro natural (10 vs 56%) (Chemineau, 1991).



### 2.4.3. Acetato de medroxiprogesterona.

17 $\alpha$  -acetoxi-6 metilprogesterona; MAP; Agestal; Clinovir; Cumetab.

Progestágeno oralmente activo, antiguamente usado en combinaciones como un anticonceptivo oral. Se usa como tratamiento paliativo del cáncer del pecho y del endometrio (Budavari *et al.*, 1989).



Esponjas intravaginales. Los análogos sintéticos, de 10 a 20 veces más potentes que la progesterona, tal como el acetato medroxi-progesterona (AMP) y el acetato de fluorogestona (AFG) y su administración por esponjas de poliuretano intravaginales, constituyen la base de las técnicas para la sincronización del estro. Hoy, ellas son ampliamente usadas en muchos países y generalmente designadas como el "tratamiento de la esponja".

Las esponjas AFG, que contienen 30 mg son recomendadas para el uso en anestro estacional en borregas, 40 mg en borregas adultas en estación de cría y 45 mg en

todas las épocas. Las esponjas AMP contienen 60 mg y pueden ser usadas para todos los fines.

El tratamiento de progestágeno es administrado para 10 o 12 días en la estación de no crianza o de 12 a 14 días en la estación de crianza en borregos, y de 17 a 21 días cuando se usa sola o 11 días cuando se usa con  $\text{PGF}_2\alpha$ . Cada esponja puede ser tratada con un antibiótico fuerte antes de ser insertada en la vagina.

En borregas, los estudios comparativos mostraron que las esponjas AMP y la AFG dan iguales resultados cuando el apareamiento se da en forma natural pero se encontró una ventaja significativa para esponjas de 30 mg de AFG cuando se usó inseminación artificial en un tiempo determinado después de la remoción de la esponja ( $55 \pm 1$  horas). La explicación más probable de este resultado es que la sincronización del estro es más exacto posterior al uso de esponjas de AFG, o que la regulación del tiempo de la I.A. no es adaptada a tratamiento AMP (Chemineau, 1991).

La Medroxiprogesterona acetato (MPA), incorporada al alimento, en dosis de 60 mg durante 14 días, produce un buen control del estro y de la ovulación. La administración de progestágenos por vía vaginal es cada día más fácil de aplicar y parece el método del porvenir. La cronolona, cuya actividad es de 20 a 25 veces superior a la progesterona, es la más empleada; el producto se incorpora a la esponja en dosis de 30 mg dejándola en su lugar durante 16 a 17 días. Las esponjas a base de M.A.P., en dosis de 60 a 80 mg son recomendadas por algunos autores (Derivaux 1976).

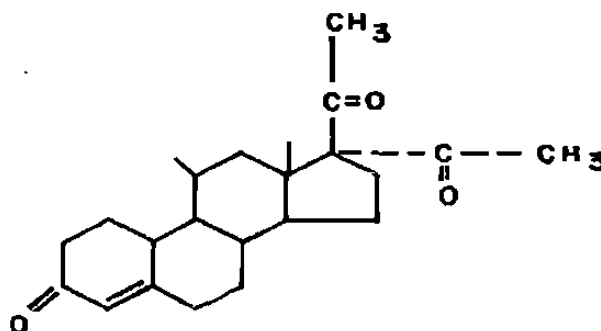
La aplicación de progestágenos tiene la ventaja de que el celo se presenta muy bien agrupado; induce el celo en animales en anestro, y no producen abortos en animales gestantes tratados accidentalmente (Odde, 1990).

#### 2.4.4. Norgestomet-Estradiol valerato.

Norgestomet-Estradiol valerato es un sistema de tratamiento integrado por dos componentes; un progestágeno sintético, Norgestomet y valerato de estradiol.

El Norgestomet está compuesto de: 17  $\alpha$ -acetoxi-11 $\beta$  metil-19 nor-preg-4-ene-3,20-diona.

El Norgestomet es un sólido cristalino, de apariencia blanca cremosa que se derrite a 183-190 °C. El compuesto es soluble en aceite de maíz y en etanol (1% solución). Es estable a la luz. El Norgestomet esta químicamente relacionado a la progesterona.



Cada implante contiene 6 mg de norgestomet y cada 2 ml de solución inyectable contiene 3 mg de norgestomet y 5 mg de valerato de estradiol en aceite de ajonjolí con 10% de alcohol bencílico vía intramuscular.

Los 6 mg de Norgestomet contenidos en el implante, suministran una dosis continua suficiente para inhibir la ovulación durante los 9 días que permanece el implante. La acción de la norgestomet es como inhibidores de la actividad del folículo

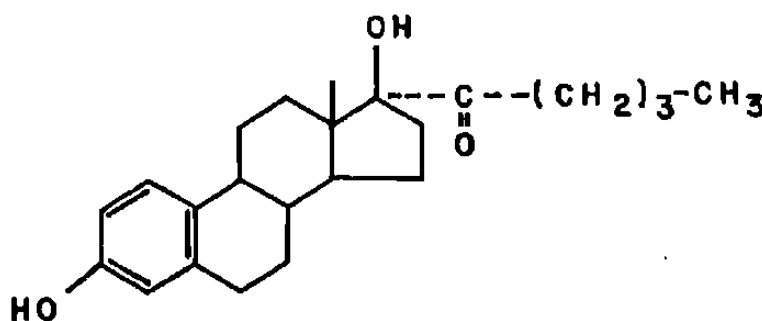
estimulante (FSH) y la luteinizante (LH) y la acción conjunta de la norgesterona y el valerato de estradiol en la inyección causando un rápido incremento del nivel de progesterona en la sangre el cual inhibe el desarrollo folicular. Al momento de retirar el implante, ocurre una marcada y estrepitosa caída de los niveles sanguíneos de Norgestomet, muy similar a la caída de progesterona en la sangre, que se observa en la regresión del cuerpo lúteo en el ciclo normal. Con la caída de la fuente exógena de proetágeno, existe un desarrollo folicular rápido, ocurriendo el estro y la ovulación subsecuentemente. La fracción inyectable de valerato de estradiol detiene las causas de regresión del cuerpo lúteo en animales con ovulación reciente (Guía para el uso del Syncro-Mate-B, 1990).

Una aproximación alternativa para las esponjas de polieuretano para la administración sostenida de progestágenos en los implantes subcutáneos consiste en un polímero de polimetacrilato impregnado con un compuesto sintético potente, Norgestomet. El implante de 1 cm contiene 1.2 o 3 mg de Norgestomet y es insertado subcutáneamente durante 12 días.

El tiempo medio de la entrada del estro después de remover el implante y la inyección de PMSG es alrededor de 26-30 horas. La ovulación es más temprana después del Norgestomet (55 hs) que después de las esponjas AFG (62 hs). Los promedios de alumbramiento (Número de borregos nacidos por hembra inseminada) obtenidos después de una inseminación artificial por hembra (51 hs para Norgestomet, 55 hrs para las esponjas AFG) son similares a los 2 tratamientos de progestágenos (Chemineau, 1991).

### 2.4.5. Estradiol Valerato. —

(17  $\beta$ )-estra-1,3,5 (10)-triene-3,17 diol, 17 valerato; Dihidroxiestrina; Compudose 365; Dihidromenformona.  $C_{23}H_{32}O_3$ . Es la hormona estrogénica más potente de los mamíferos, formada por el ovario, placenta, testículos y posiblemente por la corteza adrenal. Se ha aislado del licor folicular de los ovarios de las cerdas y de la orina de las yeguas preñadas (Budavari *et al.*, 1989).



El estradiol es el principal estrógeno, junto con la estrona y el estriol forman el conjunto de estrógenos, sin embargo, se han encontrado otros estrógenos activos tanto en plantas como en animales. Al menos ocho estrógenos son sintetizados en el ovario. El estradiol es biológicamente más activo. El precursor directo de los estrógenos ováricos es el endógeno androstenediona. Los estrógenos se sintetizan en el ovario, placenta, glándulas suprarrenales y células de Sertoli de los tubos seminíferos. Los estrógenos actúan en el sistema nervioso central para inducir el comportamiento estroal

(el libido). Pequeñas cantidades de progesterona en conjunto con estrógenos son requeridas por ovejas y vacas para inducir el estro. La primera ovulación en ovejas a la pubertad o al inicio de la estación de actividad ovárica se presenta sin la manifestación del libido por la ausencia de progesterona, sin embargo la segunda ovulación, ya se tienen pequeñas cantidades de progesterona del cuerpo lúteo en regresión y el comportamiento estrual (el libido) se manifiesta. Los estrógenos actúan en el útero para incrementar la masa tisular del miométrio y del endométrio.

El valerato de estradiol ha sido observado como luteolítico cuando es administrado durante la fase media luteal de un ciclo estral (Hansel *et al.*, 1973 citado por Pratt, 1991).

## 2.5. METODO DE SUPERFOLICULACION DE HEMBRAS DONADORAS.

Estudios sobre ovejas y vacas (Greg *et al.*, 1986) han demostrado que existen opioides en el hipotálamo del bovino en vecindad de neuronas hipofisiotróficas que regulan la secreción de hormona luteinizante (Malvan *et al.*, 1986; Leishin *et al.*, 1988). Se encontró que estos pépticos opioides están involucrados en la estimulación de la secreción de prolactina y somatotropina (STH) en ovejas y becerras (Leishin y Jackson, 1987; Leishin *et al.*, 1990). En base a los antecedentes mencionados, Leishin *et al.* (1990) reportaron que la morfina, un opioide exógeno, mimetiza el efecto de los opioides endógenos involucrados con la regulación endócrina y reproductiva. Encontrando que este alcaloide era capaz de estimular la secreción de STH y prolactina y suprimir la secreción de LH.

En estudios realizados por Guillén (1981), citado por Guerra (1988), utilizó un extracto hormonal purificado de FSH y LH y un sincronizador  $PGF_{2\alpha}$ , en siete

hembras bovinas, la administración hormonal inició el día 10 después de haberse presentado el celo por cinco días seguidos, los resultados que obtuvo fué de 71 cuerpos lúteos en total, dando un promedio de 10.14 con respecto a la recuperación del método del lavado uterino y obtuvo un promedio de 4.7 embriones por vaca.

La administración de PMS a la vaca, oveja, yegua o cerda produce aumento del crecimiento folicular, especialmente al fin del ciclo estrual o después de la eliminación del cuerpo amarillo. PMS posee gran actividad foliculoestimulante, pero carece de capacidad ovulatoria en la mayor parte de las especies, y en consecuencia suele ser necesaria la administración de la hormona LH inductora de la ovulación.

La superovulación se basa, pues, en el empleo de F.S.H. o de P.M.S.; especialmente en el terreno práctico es empleada esta última. La intervención debe hacerse al comienzo de la fase folicular, en el periodo de regresión de la actividad del cuerpo amarillo. Rowson (1954) ha demostrado que los óvulos emitidos después de la inyección de P.M.S., en presencia de un cuerpo lúteo activo, atraviesan el oviducto demasiado rápido ya que es posible encontrarlos en el útero solamente unas horas después de la ovulación. Según el método de sincronización empleado, la P.M.S. será pues administrada bien después de la enucleación del cuerpo lúteo, después de la última administración de progestágenos o en el 15<sup>o</sup> o' 16<sup>o</sup> días del ciclo cuando se trate de animales de ciclos regulares, es importante no repetir el tratamiento sin ninguna causa que lo justifique con riesgo de producir un estado refractario y no exagerar la estimulación ovárica pues se corre el peligro de modificar el equilibrio fisiológico del útero. En la oveja y la vaca, no está indicado intentar provocar más de 10 ovulaciones. La P.M.S. es el preparado que se emplea corrientemente porque presenta sobre los extractos hipofisarios varias ventajas: eliminación menos rápida, y la necesidad de una

sola inyección. Los resultados están en función de la dosis empleada, del intervalo entre el momento de la inyección y la aparición de los calores y del grado de actividad funcional del cuerpo lúteo (Derivaux, 1976).

En la oveja una dosis de 700 a 1300 U.I. de P.M.S. produce un aumento en el número de óvulos de 3 a 9 la dosis ejerce un efecto sobre el número de ovulaciones; la inyección de P.M.S. se realiza al 12º día del ciclo, o más o menos veinticuatro horas antes o después del tratamiento de sincronización (Derivaux, 1976).

### **2.5.1. Gonadotropina del suero de la yegua preñada.**

Gonadotropina equina; Suero de la gonadotropina. Glicoproteína encontrada en la sangre de las yeguas preñadas que estimula el crecimiento de los folículos del ovario y la formación del cuerpo lúteo. Contiene aproximadamente 30% de proteína y 45% de carbohidratos; rica en ácidos siálicos (Budavari *et al.*, 1989).

La gonadotropina sérica es una glucoproteína compleja. Desde el punto de vista farmacodinámico la PMSG es una gonadotropina con una alta actividad tanto de FSH como de LH. A causa de su actividad, FSH la gonadotropina sérica, estimula el crecimiento de las células intersticiales del ovario, así como el crecimiento y maduración de los folículos. Por su actividad LH la PMSG induce también la ovulación lo cual se pudo demostrar en experimentos de superovulación. En el macho, la PMSG estimula el desarrollo del tejido intersticial de los testículos (Guía Intervet, 1990).

La inducción de la ovulación puede ser obtenida provocando la descarga preovulatoria de la LH con la PMSG (Tamanini *et al.*, 1985).

La PMSG es capaz de provocar la aparición de un pico importante de estradiol, de inducir la aparición del estro, el pico preovulatorio de LH y la ovulación (Chemineau *et al.*, 1982). La asociación PMSG-GnRH produce un aumento de estradiol más importante que la PMSG sola; por el contrario, la respuesta estrogénica a la inyección



de HMG (Gonadotropina menopausal humana) es mucho más pequeña que la que se tiene con la PMSG (Tamanini *et al.*, 1985). Aunque todas estas hormonas provocan ovulación, la más utilizada por el momento es la PMSG. (Armstrong *et al.*, 1983; Moore, 1987).

En cabras, una inyección intramuscular de (PMSG) al final del tratamiento de progestágeno (después de eliminar las esponjas de la hembra y 48 hrs antes de la remoción de éstas, fuera de la estación de lactancia) incrementa el crecimiento folicular, la duración del estro, el promedio de ovulación y los avances a la entrada del estro en hembras tratadas. Siguiendo el tratamiento progestágeno-PMSG, se incrementó sobre 4 el número de ovulaciones, el tamaño de la cría y la proporción de borreguitos, sin embargo, los promedios de ovulación altos son indeseables. El nivel de dosis de PMSG inyectada en una esponja removida tiene que ser exactamente ajustada a una crianza en particular, la época del año y el estado fisiológico de la hembra.

La prolificidad y las crianzas no estacionales son, generalmente, más sensibles a PMSG y los resultados obtenidos con Romanov y Finnish Landrace en borregas criollas no indican ventajas usando más de 250 U.I. en borregas no lactantes y borregas adultas, o más de 400 U.I. en borregas lactantes (Chemineau, 1991).

Se utilizan gonadotrofinas hipofisarias (combinación FSH-LH), así como PMSG y HCG.

Numerosos trabajos han demostrado que las sustancias gonadotrópicas son capaces de provocar la liberación de un número más o menos elevado de óvulos fertilizables.

Se pueden lograr ovulaciones de 10 a 12 huevos en bovinos y en cerdas hasta 50 huevos con tratamientos de PMSG-HCG.

### **2.5.2. Hormona estimulante del folículo.**

Urufolitropina; Folitropina; Metrodina; Luteantina. Peso molecular alrededor de 36,000. Hormona glicoproteínica gonadotrópica encontrada en el tejido de la pituitaria de los mamíferos, que regula la actividad metabólica de las células de la granulosa del ovario y de las células de Sertoli de los testículos. En las hembras, la FSH induce la maduración de los folículos de Graff en el ovario. Las células foliculares que rodean al huevo en desarrollo, tienen la capacidad para producir estrógenos que inducen a los cambios proliferativos en las paredes del útero y la vagina. El alcance de la concentración del estrógeno conduce a la ovulación y el cambio de la actividad progestacional. En los machos, promueve el desarrollo de las células germinales de los testículos. Para uso veterinario la FSH purificada es obtenida de la glándula pituitaria de los animales domésticos (Budavari et al., 1989).

El aumento del número de folículos en crecimiento y su ovulación, son obtenidos con la inyección de hormonas gonadotrópicas al final de un tratamiento progestativo. Una preparación de extractos hipofisarios (FSH/LH) es actualmente utilizada (Armstrong et al., 1983; Moore, 1987).

### **2.6. METODO DE OVULACION EN HEMBRAS SUPERFOLICULADAS.**

Bajo el concepto de ovulación se entiende la liberación de un óvulo maduro destinado a ser fecundado; bajo el concepto de poliovulación se comprende la liberación de varios óvulos en el curso de ovulaciones espontáneas.

Con el término de superovulación se designa el aumento, hormonalmente, de la cuota natural de ovulación. La importancia de la superovulación para la práctica de la

producción animal radica en que puede elevarse la cuota natural de reproducción, en cuanto lo permite la capacidad biológica de las correspondientes hembras.

En la oveja ocupa el primer plano el mejoramiento de los resultados de preñez por incremento de la frecuencia de partos gemelares. Esto es aplicable, sobre todo, a las razas de ovejas productoras de carne y de fecundidad relativamente baja (Smidt, 1972).

El principio básico que lleva a cabo la superovulación, es que, los ovarios de los mamíferos contienen más oocitos de los que puede ovular, debido a que se pierden por atresia el cual es el proceso de degradación folicular. La superovulación es llevada a cabo por medio de la administración de hormonas exógenas para capturar algunos de los oocitos antes de que se pierdan por atresia (Donaldson, 1991).

La metodología de la superovulación se basa en inyectar hormonas gonadotróficas a las hembras algunos días antes del celo, para conseguir, debido a su acción foliculoestimulante, una cuota de ovulación superior a la natural por el número de óvulos llevados a maduración y ovulación. Se utilizan gonadotrofinas hipofisarias (combinación FSH-LH), así como PMSG y HCG. A continuación se mencionan algunos ejemplos en los que se ha usado la superovulación en animales zootécnicos mediante gonadotrofinas.

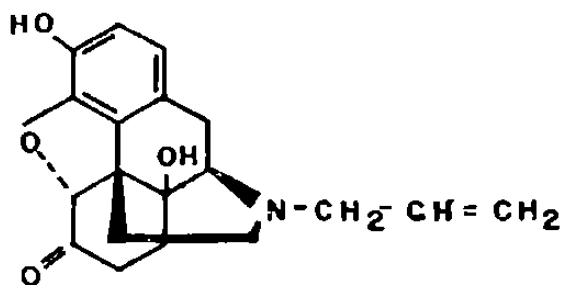
**Cuadro 1. Dosis utilizadas de hormonas gonadotróficas, en algunas especies animales para inducir la superovulación en las hembras.**

<b>Especie animal</b>	<b>PMSG</b>	<b>HCG</b>
Vacas (novillas de 12-14 semanas)	2000 U.I	5000 U.I
Vacas (adultas)	1000 U.I	4000 U.I
Ovejas	1250-2000 U.I	-----
Cerdas	1200 U.I	500 U.I

En cada caso, el efecto de estas hormonas depende, entre otras cosas, de la especie animal, raza, reacción individual, dosificación, estadio del ciclo, régimen de aplicación, combinación hormonal y estación del año (Smidt, 1972).

### 2.6.1 Clorhidrato de naloxona.

4,5 Epoxi-3,14-dihidroxi-17-(2 propenil)morfina-6-ona;  $C_{19}H_{21}NO_4$ ; PM 327.37. Antagonista específico de los opioides (Budavari *et al.*, 1989).



BIBLIOTECA DE LA UNAM

La administración de naloxona, un antagonista en receptores de opioides, incrementa la liberación de la hormona luteinizante (LH) en una gran cantidad de especies, proporcionando esencial soporte para involucrar los péptidos opioides endógenos en la regulación de la liberación de la LH (García Cantú, 1990).

En el hombre, las dosis pequeñas de naloxona (0.4 a 0.8 mg) por vía intramuscular o intravenosa revierten rápidamente los efectos de los agonistas opioides.

La duración de los efectos antagonistas dependen de la dosis, pero usualmente

varía entre 1 y 4 hs. El antagonismo de los efectos opioides que presenta la naloxona, a menudo está acompañado de un fenómeno de "rebote excesivo" ("overshoot") (Goodman *et al.*, 1991).

La administración de naloxona; antagónico de los opioides, incrementa la liberación de la LH en varias especies, para que esto ocurra se requiere la presencia del péptido opioide endógeno capaz de inhibir la liberación de la LH y el receptor opioide funcional de la ruta metabólica para la liberación de la LH (Weesner *et al.*, 1989).

Gregg *et al.*, (1986) reportan en estudios realizados con inyecciones de naloxona, que se incrementa abruptamente la concentración de la LH en ovejas.

Fuentes (1990) estudió el efecto de la naloxona sobre la secreción pulsátil de LH en la cabra alpina durante la época de anestro. Se utilizaron 20 cabras alpinas divididas al azar en 5 grupos de 4. Al grupo 1 considerado como testigo, se le administró 1 ml de solución salina fisiológica por vía intramuscular. Al grupo 2 se medicó con 0.2 mg de naloxona i.m.; el grupo 3 recibió 0.4 mg de naloxona i.m., el grupo 4 recibió 0.8 mg de naloxona i.m. y el grupo 5 recibió 10 mg de buserelina i.m.. Se observó que la dosis de 0.2 mg de naloxona produjo una liberación de significancia de LH, pero con poca duración, mientras que la naloxona en dosis de 0.4 mg y 0.8 mg i.m. produjo una liberación significativa de LH tanto en frecuencia como en amplitud. Al compararse con el efecto de la buserelina se observó que se produjo una liberación de significancia de LH, comparando con controles pero sin diferencia significativa cuando se compara con las cabras medicadas con Naloxona.

### **2.6.2. Gonadotropina coriónica humana.**

Gonadotropina coriónica; extracto urinario de la preñez; Coriogonina; Foluteina; Coriantina. Una hormona sintetizada por el tejido coriónico de la placenta y encontrada en la orina durante la preñez. Encontrada en los fluidos corporales que padecen la

enfermedad trofoblástico o' embriónica testicular o' tumores ovaricos. HCG, junto con la LH, FSH y TSH comprenden la familia hormonal de las glicoproteínas. Todas son diméricas y contienen subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . Dentro de unas especies, las porciones peptídicas de la subunidad  $\alpha$  son esencialmente idénticas entre las cuatro hormonas, mientras que las subunidades  $\beta$  aunque muestran varios grados de homología, son únicas y se cree que son las responsables de la especificidad biológica de las hormonas individuales. Los suplementos de la hipófisis en el mantenimiento del crecimiento del cuerpo lúteo, durante la preñez desaparecen de la circulación maternal después de liberar la placenta. Estimula el tejido Leydig en los machos, que resulta en la secreción de andrógenos (Budavari et al., 1989).

La estructura química de la HCG (Gonadotropina Córionica Humana, no tiene una secuencia de aminoácidos aún definida; solamente se sabe que tiene dos cadenas de aminoácidos (AA), una  $\alpha$  (con 32 AA) y otra  $\beta$  (145 AA), teniendo además un peso molecular (PM) de 38.600 (Goodman *et al.*, 1991).

Las principales gonadotropinas son la HCG y la PMSG. Estas hormonas polipeptídicas tienen efectos FSH y LH sobre las gónadas, de tal manera que la HCG ejercerá un primer efecto luteinizante, aunque también lo tiene foliculo estimulante (Sumano y Ocampo, 1988).

La fuente de LH más comunmente disponible es la gonadotropina coriónica humana (HCG) que posee muchas cualidades de tipo LH (Mc Donald, 1971).

La HCG se obtenía de la orina de mujeres preñadas, pero en la actualidad se obtiene sobre todo de la orina de primates preñados, donde las concentraciones son mucho mayores (Sumano y Ocampo, 1988).

Mc Donald (1971) menciona que se puede lograr ovulaciones de 10 a 12 huevos en bovinos y en cerdas hasta 50 huevos con tratamientos de PMSG-HCG.

Derivaux 1976 Menciona que la inyección de 250 a 500 U.I de HCG 48 horas

después de terminar la M.A.P. provoca la ovulación en las 24-26 horas siguientes.

### **2.6.3 Hormona luteinizante.**

Hormona estimulante de las células intersticiales. PM alrededor de 30,000. Una hormona glicoproteínica gonadotrópica encontrada en el lóbulo anterior de la glándula pituitaria; aislada por primera vez de la pituitaria de borregas. Estimula la síntesis de la progesterona en los ovarios. Junto con la FSH permite la liberación del estrógeno de los folículos de Graff. También, induce el proceso de ovulación en el que el huevo maduro es forzado a salir del folículo y, seguido a esto, las células que lo rodean hasta aquí, se convierten bajo la influencia de la LH en células luteínicas (cuerpo lúteo). En el macho, estimula las células intersticiales de los testículos para secretar testosterona. La estructura glicoproteínica contiene dos subunidades disimilares designadas como  $\alpha$  y  $\beta$  (Budavari et al., 1989).

La hormona luteinizante, es una proteína globular que induce la ruptura del folículo una vez madurado. Después de la ovulación promueve un cambio en las células de granulosa, y estos modifican su forma llenándose de grasa (cuerpo amarillo) y a medida que las células siguen creciendo comienzan a producir progesterona.

La hormona LH está involucrada en la ovulación y la posterior formación del cuerpo lúteo (Sorensen, 1979).

La LH actúa sobre el ovario previamente preparado por la FSH desencadenando la ovulación y posteriormente la luteinización de los folículos (Derivaux, 1976).

La secreción de LH no es un fenómeno continuo, está demostrado ampliamente que ocurren pulsaciones (descargas rápidas) en el torrente sanguíneo; cada una de estas descargas resulta de la estimulación de las células pituitarias por la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH); como consecuencia la frecuencia de la misma determina la estimulación de las gónadas (Holy, 1983).

## CAPITULO III

### MATERIALES Y METODOS

#### 3.1. DESCRIPCIÓN DEL LUGAR.

Los estudios se condujeron en el Campo Experimental de Zootecnia de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en el municipio de Marín, N.L., el cual se localiza a 25° 53' latitud norte y 100° 03' longitud oeste, a una altitud de 367.3 msnm, con las condiciones ambientales que se muestran en el Cuadro 2.

**Cuadro 2. Condiciones de temperatura y precipitación, en Marín, N.L. prevalecientes durante el desarrollo del experimento.**

MES	CONDICIONES AMBIENTALES	
<b>JUNIO</b>	Temperatura máxima extrema	42 °C
	Temperatura mínima extrema	19 °C
	Temperatura media máxima	33 °C
	Temperatura media mínima	21.7 °C
	Temperatura media mensual	28 °C
	Precipitación total	333.6 mm.
<b>JULIO</b>	Temperatura máxima extrema	39 °C
	Temperatura mínima extrema	21 °C
	Temperatura media máxima	35 °C
	Temperatura media mínima	23 °C
	Temperatura media mensual	29 °C
	Precipitación total	5.0 mm



## 3.2. METODOLOGÍA.

Este trabajo consistió en dos pruebas las cuales se realizaron por separado en diferente fecha y con diferentes animales tal como se describe a continuación.

### 3.2.1. Ensayo I:

Este ensayo se realizó en los meses de junio y julio de 1993. Para desarrollar este trabajo se utilizaron treinta y seis borregas las que fueron previamente suplementadas, vitaminadas y desparasitadas de acuerdo al calendario de la región. Para la etapa de sincronización se utilizaron diez y ocho de las treinta y seis ovejas para ser tratadas con esponjas intravaginales (ver Apéndice 1), las esponjas esterilizadas se impregnaron con 50 y 60 mg de acetato de medroxiprogesterona diluída en aceite de maíz (a 9 borregas para cada dosis, respectivamente); la vulva se limpió asépticamente con una gasa con yodo diluído al 5% previo a la introducción del espéculo (lubricado), para después colocar la esponja previamente remojada con aceite vegetal con el fin de evitar adherencia, y mezclado con antibiótico (Clamoxil) para evitar infección. El segundo grupo de diez y ocho ovejas (dos subgrupos de nueve ovejas cada uno) fué tratado con implantes subcutáneos de hidrón, un polímero hidrofílico, los que contenían 2 y 1.5 mg de norgestomet, éste se aplicó en forma subcutánea en la oreja con una pistola para implantar, aplicando azul de metileno después de la implantación.

Tanto las ovejas del tratamiento con esponja, como las del implante recibieron una dosis de 0.5 ml de una mezcla de 15 mg de acetato de progesterona y 25 mg

de valerato de estradiol 17 $\beta$  mezclados en 9 ml de aceite vegetal y 1 ml de alcohol bencílico, vía intramuscular con el fin de que el producto aplicado de esta manera tenga un efecto más rápido que el que presenta a través del implante o la esponja que tiene un efecto más duradero. Se identificaron a los animales de cada tratamiento con collares de colores diferentes, los tratamientos fueron como lo describe el Cuadro 3.

**Cuadro 3. Distribución de tratamientos de sincronizadores en la prueba de superfoliculación de ovejas en anestro estacional realizada en junio de 1993 en el Campo Experimental de Marín, N.L.**

Tratamiento	Tipo de tratamiento	Identificación	Total de animales
T1	2.0 mg (NGT) implante	collar rojo	9 borregas
T2	1.5 mg (NGT) implante	collar azul	9 borregas
T3	50 mg (MPA) esponja	collar amarillo	9 borregas
T4	60 mg (MPA) esponja	collar negro	9 borregas

Del grupo de ovejas tratado con esponjas se seleccionaron cuatro de cada dosis, de estas cuatro dos ovejas fueron superfoliculadas con FSH y las restantes con PMSG. Del mismo modo, fueron tratadas las ovejas del grupo con implante, quedando como lo describe el Cuadro 4.

**Cuadro 4. Distribución de los tratamientos de foliculadores en la prueba de superfoliculación de ovejas en anestro estacional realizada en junio de 1993 en el Campo Experimental de Marín, N.L.**

Tipo de sincronizador	Dosis	Total de borregas sincronizadas	Total de borregas superfoliculadas	Tratamiento
Implante	2 mg	9	4	2 FSH 2 PMSG
Implante	1.5 mg	9	4	2 FSH 2 PMSG
Esponja	50 mg	9	4	2 FSH 2 PMSG
Esponja	60 mg	9	4	2 FSH 2 PMSG

Para la superfoliculación, el programa utilizado consistió en la aplicación de dosis de 4, 4, 3 y 1 mg de FSH en los días 9, 10, 11 y 12 a partir de la sincronización (Cuadro 5); y de una sola dosis de 1000 UI de PMSG en el día 15 a partir de la sincronización (Cuadro 6). A todas las ovejas se les aplicó 5 mg de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  en la submucosa vaginal 24 horas antes de retirar los sincronizadores, 48 horas después de retirar los sincronizadores se aplicó clorhidrato de naloxona (0.4 mg/ml) en suero salino fisiológico, y posteriormente se proporcionó el macho.

**Cuadro 5. Programa de aplicación de la hormona FSH en la prueba de superfoliculación de ovejas en anestro estacional realizada en junio de 1993 en el Campo Experimental de Marín, N.L.**

Días					
	9	10	11	12	13
Mañana	2mg	2mg	1.5 mg	1 mg	
Tarde	2mg	2mg	1.5 mg		
			*	**	***

- \* Se aplica prostaglandina
- \*\* Se retira el implante o esponja
- \*\*\* Se aplica naloxona y se proporciona el macho

**Cuadro 6. Programa de aplicación de la hormona PMSG en la prueba de superfoliculación de ovejas en anestro estacional realizada en junio de 1993 en el Campo Experimental de Marín, N.L.**

Días				
12	13	14	15	16
		PMSG 1000 U.I		***
		*		
		**		

- \* Se aplica prostaglandina
- \*\* Se retira el implante o esponja
- \*\*\* Se aplica naloxona y se proporciona el macho

Las montas se realizaron por espacio de 3 días seguidos hasta el momento en que las hembras no permitieran acercarse al macho. A los 6 días después de la última monta, las ovejas se trasladaron a jaulas individuales, aislándolas, con el fin de dietarlas, para esto se dejó a los animales que consumieran aproximadamente 200 g de concentrado y agua *ad libitum* en el primer día de dieta y, el segundo día de la dieta se

mantuvo al animal solamente con agua fresca, para someterlas a una laparatomía ventral con objeto de observar el número de cuerpos lúteos.

Al momento de la intervención se procedió a lavar el área ventral de las ovejas con agua y jabón seguido de una solución de yodo al 10%, posteriormente se eliminó el pelo del área a tratar para realizar la incisión.

La cirugía se inició con la aplicación de 1 ml de anestésico general vía intravenosa (rompun) en forma lenta seguida de 2 ml de sulfato de atropina vía intramuscular para evitarle un "shock" al animal, posteriormente se suministraron 10 ml de xilocaína vía subcutánea, como anestésico local en el área de incisión; cuando el animal se encontraba totalmente anestesiado se procedió a sujetarlo de las extremidades sobre una mesa de cirugía; con un bisturí se realizó el corte (tratando de que con un solo corte atravesase la piel) de las diferentes capas del vientre procurando no lesionar los intestinos, para esto primero se cortó la piel, el tejido conectivo y luego con mayor precaución el peritoneo; con la ayuda de un espéculo introducido por la vagina hasta el cervix, se procedió a localizar el aparato reproductor introduciendo la mano con un guante de látex en el vientre abierto, para posteriormente exponerlo en la región ventroabdominal, exponiendo principalmente útero y ovarios; seguidamente se efectuó el conteo de los cuerpos lúteos en cada ovario, que concuerdan con datos previos, donde los ovarios izquierdo y derecho promediaron 9 y 11 cuerpos lúteos, respectivamente, (Fernández, 1993), finalmente se procedió a un lavado de toda el área de la herida tanto interna como externamente con una solución salina con antibiótico y se suturó al animal en forma continua en el peritoneo y tejido conectivo, y discontinua en la piel, después se aplicó Topazone, y azul de metileno como desinfectantes y antibiótico vía intramuscular.

Los animales fueron trasladados a las jaulas individuales para su recuperación aplicando antibiótico cada 24 hs durante un período de 4 días y proporcionándoles agua

y concentrado de buena calidad. Posteriormente, en un espacio de 2 semanas de efectuada la operación se procedió a quitar las suturas de la piel observando a todos los animales completamente recuperados.

### 3.2.2 Ensayo II:

Este ensayo se realizó de diciembre de 1993 a enero de 1994. Para esta etapa se seleccionaron 10 ovejas de acuerdo a sus características físicas (peso y edad) y de 2° parto, estas fueron identificadas con pintura, formando 2 grupos de 3 ovejas cada uno; un grupo se trató con una inyección intramuscular de naloxona (0.4 mg) y otro se consideró como grupo testigo; un tercer grupo de 4 ovejas fué tratado con HCG (gonadotropina coriónica humana 1000 U.I) que se aplicó en forma de inyección intramuscular, los tratamientos se muestran en el Cuadro 7.

**Cuadro 7. Tratamientos y dosis usados en la prueba para la determinación de LH en suero ovino.**

Tratamiento	Tipo de sincronizador	Total de Ovejas	Dosis
Naloxona	PGF <sub>2</sub> α (5mg)	3	0.4 mg
Testigo	PGF <sub>2</sub> α 5mg).	3	-----
HCG	PGF <sub>2</sub> α (5mg)	4	1000 U.I.

Quince días antes del inicio de la prueba las ovejas se suplementaron y vitaminaron con A,D,E (3 cc) vía intramuscular, posteriormente se desparasitaron internamente (5 cc de Valvazen), vía oral. Para la sincronización de las ovejas se utilizó 1 ml (5 mg) de prostaglandina F<sub>2</sub>α, ésta se aplicó con una jeringa insulínica con la ayuda de un espéculo para colocarla en la mucosa vaginal; la primera aplicación de

PGF<sub>2</sub>α fué el día 25 de diciembre y la segunda el día 4 de enero con un espacio de 10 días entre aplicaciones, el segundo día después de la primera aplicación se detectó el celo de las ovejas con un borrego celador. En las 48 horas después de la segunda aplicación de PGF<sub>2</sub>α se suministraron los tratamientos correspondientes; HCG, Naloxona o Testigo tal como se muestra en el Cuadro 8.

**Cuadro 8. Programa de actividades para la determinación de concentración hormonal de LH en plasma sanguíneo de ovejas sincronizadas con prostaglandinas F<sub>2</sub>α realizado en el campo experimental de Marín, N.L.**

Diciembre de 1993							Enero de 1994					
25 PGF <sub>2</sub> α (1 ml)	26 celo	27 celo	28	29	30	31	1	2	3	4 PGF <sub>2</sub> α (1 ml)	5	6 Naloxona, HCG ó testigo

En el período de proestro se colectaron muestras del plasma sanguíneo a cada tiempo de aproximadamente 6 horas hasta la aplicación de la Naloxona ó HCG y posteriormente se tomaron muestras cada 2 horas tal como se muestra en el Cuadro 9 para después analizar los niveles de LH, vía sanguínea, por el método de radioinmunoanálisis (RIA).

**Cuadro 9. Calendarización para la obtención de las muestras para la prueba de determinación de la LH.**

Día	Horas							
9	6	12	18	24			muestreo	<b>Proestro</b>
10*	6	12	18	24			muestreo	<b>Proestro</b>
11	6	12	18	24			muestreo	<b>Estro</b>
12	6	12	18**	20	22	24	muestreo	<b>Estro</b>
<b>A las 48 horas de la aplicación de las prostaglandinas F<sub>2</sub>α (*) se aplicó la Naloxona (**) ó el HCG dependiendo del tratamiento.</b>								

#### A) Obtención de la muestra:

Para la obtención de las muestras se identifican los tubos "vacutainer" (tubo sellado al vacío que al momento de hacer la punción succiona la sangre), con el número de muestra, tipo de tratamiento y número de animal. Una vez identificados se les colocó una cinta adhesiva transparente sobre la identificación, con el fin de que la humedad no dañara los datos de identificación; después de esto se procedió a tomar 3 ml aproximadamente de las muestras por la vena yugular, para obtener de 1 a 1.5 ml de suero sanguíneo, estas muestras se refrigeraron para posteriormente centrifugarlas por 10 minutos a 2500 rpm; al cabo de este tiempo, se separó el suero del resto del tejido y se depositó en tubos eppendorf (de 1.5ml) previamente identificados, para conservarlos en congelación en nitrógeno líquido, hasta procesarse en el Instituto de Investigaciones Biomédicas por el método del RIA. El número de muestras sanguíneas obtenidas en esta prueba se muestran en el Cuadro 10.



## **B) Determinación de LH por medio de un radioinmunoanálisis (RIA)**

**B.1 Marcación de la proteína:** Se realizó con el método de la cloramina T (Grenwood y Hunter, 1963) modificada en el banco de hormonas protéicas de origen animal. Centro de neurobiología-UNAM. (Perera *et al.*, 1993). Se calcularon los parámetros actividad específica, eficiencia de marcación, y yodo incorporado.

**B.2 Inmunoreactividad:** Con el propósito de conocer la dilución del 1<sup>er</sup> anticuerpo (anti-gLH) se procedió a colocar diluciones desde 1:100 hasta 1:32000 en presencia del antígeno marcado (gLH)(Ver Apéndice 3). El Cuadro 11 resume el procedimiento del protocolo de la fracción 7, 8 y 9.

**B.3 Curva estándar:** Una vez conocida la dilución de la fracción adecuada de anticuerpo (Ab) (50% Bo) se procedió al montaje de la curva estándar, utilizando para ello el mismo antígeno no marcado. El protocolo para llevar a cabo lo antes mencionado se resume en el Cuadro 12.

**B.4 Determinación de niveles de LH en suero ovino:** La cuantificación con el sistema previamente establecido, permitió medir los niveles de LH en suero ovino, se utilizó de cada sangrado 50  $\mu$ l para su cuantificación, los valores obtenidos se extrapolaron a 1 ml de suero.

**Cuadro 10. Número de muestreos realizados en la prueba para determinar los niveles de LH, en el suero sanguíneo.**

Fecha	No de muestra	Hora
3/enero/94	1ª muestra	5:00 PM
4/enero/94	2ª muestra	9:40 AM
4/enero/94	3ª muestra	4:00 PM +
		2ª aplicación de PGF <sub>2</sub> α
4/enero/94	4ª muestra	10:00 PM
5/enero/94	5ª muestra	6:00 AM
5/enero/94	6ª muestra	10:30 AM
5/enero/94	7ª muestra	4:00 PM
5/enero/94	8ª muestra	10:00 PM
6/enero/94	9ª muestra	4:00 AM
6/enero/94	10ª muestra	11:00 AM 6:00 PM
6/enero/94	11ª muestra	+
		aplicación de Naloxona o' HCG
6/enero/94	12ª muestra	8:00 PM
6/enero/94	13ª muestra	10:00 PM
6/enero/94	14ª muestra	12:00 PM

**Cuadro 11. Protocolo realizado para conocer la dilución del 1<sup>er</sup> anticuerpo (anti-gLH), en la determinación de LH por el método del RIA.**

	Amortiguador	1 <sup>er</sup> Ab	H*		2 <sup>o</sup> Ab		PEG	
CT	---	---	50		---		---	
UNE	300	---	50		100		1000	
1:100	250	100	50		100		1000	<b>Centrifugación</b>
1:1000	250	100	50	<b>Incubación</b>	100	<b>Incubación</b>	1000	<b>a</b>
1:2000	250	100	50	<b>por</b>	100	<b>por</b>	1000	<b>3000 rpm</b>
1:4000	250	100	50	<b>24 horas</b>	100	<b>24 horas</b>	1000	<b>por</b>
1:8000	250	100	50	<b>a</b>	100	<b>a</b>	1000	<b>30 min</b>
1:16000	250	100	50	<b>4<sup>o</sup> C</b>	100	<b>4<sup>o</sup> C</b>	1000	<b>a</b>
1:32000	250	100	50		100		1000	<b>4<sup>o</sup> C</b>

CT = Cuentas totales  
 UNE = Unión no específica  
 Ab = Anticuerpo  
 H\* = Hormona marcada  
 PEG = Polietilenglicol

**Nota:** Los números corresponden a microlitros.

**Cuadro 12. Protocolo utilizado para realizar la curva estándar en el análisis del RIA.**

	Amortiguador	1 <sup>er</sup> Ab	H*		2 <sup>o</sup> Ab		PEG	
CT	----	----	50		----		----	
UNE	350	----	50		100		1000	
Bo	250	100	50		100		1000	
ST								
32 (50)	200	100	50		100		1000	
16 (50)	200	100	50		100		1000	Centrifugación
8 (50)	200	100	50	Incubación	100	Incubación	1000	a
4 (50)	200	100	50	por	100	por	1000	3000 rpm
2 (50)	200	100	50	24 horas	100	24 horas	1000	por
1 (50)	200	100	50	a		a	1000	30 min
0.5 (50)	200	100	50	4 <sup>o</sup> C		4 <sup>o</sup> C	1000	a
0.25 (50)	200	100	50				1000	4 <sup>o</sup> C
0.10 (50)	200	100	50				1000	
0.05 (50)	200	100	50				1000	
0.025 (50)								

CT = Cuentas totales

UNE = Unión no específica

Bo = Unión máxima

St = Estándar de referencia

Ab = Anticuerpo

H\* = Hormona marcada

PEG = Polietilenglicol

Nota: Los números corresponden a microlitros.

### 3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para el análisis del Ensayo I de sincronización y superfoliculación de ovejas en anestro estacional se utilizó una prueba de chi cuadrada (Yamane, 1967).

$$\chi^2_{cal} = \sum_i^h \sum_j^c \frac{(O_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}} = \frac{(o_{11} - e_{11})^2}{e_{11}} + \dots + \frac{(o_{1c} - e_{1c})^2}{e_{1c}} + \dots + \frac{(o_{hc} - e_{hc})^2}{e_{hc}}$$

Donde:

$O_{ij}$  = # de observaciones en la  $i$ -ésima hilera y  $j$ -ésima columna de la tabla de contingencia.

$E_{ij}$  = valor esperado en esta categoría.

$h$  = # de hileras.

$c$  = # de columnas.

Siendo el valor esperado:

$$E_{ij} = \frac{(n_{i.})(n_{.j})}{n_{..}}$$

$E_{ij}$  = frecuencia esperada en la  $i$ -ésima hilera y  $j$ -ésima columna de la tabla de contingencia.

$n_{i.}$  = sumatoria sobre la  $i$ -ésima hilera.

$n_{.j}$  = sumatoria sobre la  $j$ -ésima columna.

$n_{..}$  = total.

Para el ensayo 2, debido a que la varianza entre ovejas es amplia y no explicada, se realizó solamente un análisis descriptivo con respecto a la tendencias mostradas en las gráficas en base a la curva estándar. Se realizaron análisis estadísticos (prueba de  $F$ ) para observar la variación en los niveles de LH dentro de cada oveja, tomando las observaciones de estro y metaestro como una clase y diestro y proestro como otra.

## **CAPITULO IV**

### **RESULTADOS Y DISCUSION**

El trabajo experimental se dividió en dos etapas (descritos en materiales y métodos) por lo que los resultados y su discusión se muestran de acuerdo a las mismas.

#### **4.1. RESULTADOS DEL ENSAYO I.**

De las 36 ovejas que se sometieron a los tratamientos de sincronización, 18 fueron tratadas con acetato de medroxiprogesterona (MPA), 6 de 9 ovejas y 7 de 9 ovejas, rompieron el anestro cuando se les aplicó 50 y 60 mg del producto, respectivamente, el otro grupo de 18 ovejas fueron tratadas con Norgestomet (NGT), 8 de 9 ovejas y 7 de 9 ovejas, mostraron estro después de la aplicación de 2.0 mg y 1.5 mg de NGT, respectivamente.

No existió diferencia estadística ( $p > 0.05$ ) para suponer que la manifestación de estro depende de la dosis de sincronizador usado.

En los Cuadros 13 y 15 se muestran los resultados obtenidos para las diferentes dosis usadas en cada sincronizador. Así, como en los Cuadros 14 y 16 se muestran los valores esperados para ambos sincronizadores.

**Cuadro 13. Efecto del MPA en dosis de 50 y 60 mg, durante la estación anestro y actividad sexual.**

Dosis MPA	No. de ovejas en estro	No. de ovejas en anestro	Total
50 mg	6	3	9
60 mg	7	2	9
	13	5	18

**Cuadro 14. Valores esperados de los datos del Cuadro 13, que se refiere al efecto del MPA en la estación anestro y actividad sexual.**

	Estro	Anestro
50 mg	6.5	2.5
60 mg	6.5	2.5

$$\chi^2_{\text{cal}} = 0.27 \text{ n.s.}$$

**Cuadro 15. Efecto del NGT en dosis de 1.5 y 2.0 mg, durante la estación anestro y actividad sexual.**

Dosis NGT	No. de ovejas en estro	No. de ovejas en anestro	Total
1.5 mg	7	2	9
2.0 mg	8	1	9
	15	3	18

**Cuadro 16. Valores esperados de los datos del Cuadro 15, que se refiere al efecto del NGT en la estación anestro y actividad sexual.**

	Estro	Anestro
1.5 mg	7.5	1.5
2.0 mg	7.5	1.5

$$\chi^2_{\text{cal}} = 0.38 \text{ n.s.}$$



Como observamos en la primera fase de la prueba No. 1 tenemos que, de las 18 ovejas tratadas con las esponjas impregnadas con MPA, 13 de ellas que representan un 72% fueron capaces de romper el anestro estacional. Del segundo grupo de 18 ovejas que se trataron con los implantes adicionados con NGT, 15 de estas ovejas, que son el 83% también fueron capaces de romper el anestro estacional.

De acuerdo con la prueba estadística de ji-cuadrada podemos establecer que el número de ovejas que presentan un estado estral es independiente del tipo de sincronizador y forma de aplicación. En el Cuadro 17 se resumen los datos obtenidos en esta fase de la prueba y en el Cuadro 18 se muestran los valores esperados de esta tabla.

**Cuadro 17. Efecto del sincronizador (MPA ó NGT) durante la estación anestro y actividad sexual.**

	Estro	Anestro	total
MPA	13	5	18
NGT	15	3	18
total	28	8	36

**Cuadro 18. Valores esperados de los datos del Cuadro 17 que se refiere al efecto del sincronizador durante la estación anestro y actividad sexual.**

	Estro	Anestro
MPA	14	4
NGT	14	4

$$\chi^2_{\text{cal}} = 0.642 \text{ n.s}$$

En la etapa de superfoliculación, que fué la segunda fase de la prueba No. 1, tenemos que los resultados obtenidos de las cuatro hembras seleccionadas al azar, de los grupos que mostraron esto, y de las que se formaron grupos de dos individuos para cada uno de los dos superfoliculadores, FSH y PMSG (Hormona foliculo estimulante y Gonadotropina del suero de la yegua preñada) fueron los siguientes: de las hembras tratadas con la dosis menor del sincronizador MPA las dos que se sometieron a FSH, ninguna foliculó; de las dos pertenecientes a la dosis mayor de MPA que fueron tratadas para el mismo foliculador, las dos hembras respondieron positivamente al tratamiento. En el caso del foliculador PMSG, del grupo de las dos hembras de la dosis menor de MPA, el 50% fué capaz de superfolicular; de las hembras seleccionadas (dos) en la dosis mayor de MPA, para el mismo superfoliculador, el total de ellas presentaron el efecto del tratamiento. Aunque los resultados no soportan una prueba estadística por el reducido número de datos, porque de acuerdo con Mc. Clave, (1979) se asume que para la prueba de  $\chi^2$  sea válida ésta debe de exceder de más de cinco valores esperados por celda, la tendencia que observamos en estos tratamientos es que el efecto del superfoliculador está determinado, en este caso, por la dosis superior del sincronizador. En el Cuadro 19 se muestran los resultados comparativos antes descritos.

**Cuadro19. Efecto del sincronizador MPA (Acetato de medroxiprogesterona) aplicado con esponja durante la etapa de superfoliculación.**

Foliculador	Dosis MPA (mg)	Foliculadas	No foliculadas	Total
FSH	50	0	2	2
FSH	60	2	0	2
PMSG	50	1	1	2
PMSG	60	2	0	2
		5	3	8

Los resultados obtenidos para el sincronizador NGT, fueron que, las hembras tratadas con la dosis mayor del sincronizador, las dos que se sometieron al foliculador FSH, ambas presentaron el estado de superfoliculación; mientras a las que se les aplicó la dosis menor de NGT que fueron tratadas para el mismo foliculador, una hembra respondió positivamente al tratamiento. En el caso del foliculador PMSG, del grupo de las dos hembras pertenecientes a la dosis mayor de NGT, el total fué capaz de superfolicular; y de las seleccionadas (dos) en la dosis menor de NGT, para PMSG, el 50% de ellas presentaron el efecto del tratamiento. El número de muestras no soporta la prueba estadística, sin embargo, la tendencia que observamos en estos tratamientos es que el efecto de ambos superfoliculadores está determinado, por la dosis mayor del sincronizador. En el Cuadro 20 se muestran los resultados comparativos antes descritos.

**Cuadro 20. Efecto del sincronizador NGT (Norgestomet), aplicado en implante, durante la etapa de superfoliculación.**

Foliculador	Dosis NGT (mg)	Foliculadas	No foliculadas	Total
FSH	1.5	1	1	2
FSH	2.0	2	0	2
PMSG	1.5	1	1	2
PMSG	2.0	2	0	2
		6	2	8

En el Cuadro 21 se muestra el efecto conjunto de ambos sincronizadores (MPA y NGT) en sus dosis de 50-60 mg y 2-1.5 mg, respectivamente, con los foliculadores (FSH y PMSG), estos datos se explican con más detalle en los Cuadros 19 y 20.

**Cuadro 21. Concentración de datos del sincronizador (MPA o' NGT) con los foliculadores FSH y PMSG.**

	NGT	MPA	
FSH	3	2	5
PMSG	3	3	6

Con el fin de validar los datos obtenidos del efecto conjunto de sincronizador-foliculador (Cuadros 17, 19 y 20) se llevó a cabo un análisis estadístico y el resultado obtenido muestra que el 62.5% de las hembras sometidas al foliculador FSH mostraron estro y el resto no tuvieron efecto del foliculador, mientras que del 100% de las hembras tratadas con PMSG respondió al efecto del foliculador un 75% y el 25% no presentó efecto del foliculador; al llevarse a cabo una prueba de independencia, se observó que los resultados obtenidos no dependen del tipo de foliculador usado ( $p > 0.05$ ).

**Cuadro 22. Efecto del foliculador (FSH o' PMSG) durante la estación anestro y actividad sexual.**

	FSH	PMSG	total
Estro	5	6	11
Anestro	3	2	5
total	8	8	16

**Cuadro 23. Valores esperados del Cuadro 22 que se refiere al efecto del foliculador durante la estación anestro y actividad sexual.**

	FSH	PMSG
Estro	5.5	5.5
Anestro	2.5	2.5

$$\chi^2_{\text{cal}} = 0.29 \text{ n.s.}$$

Por otro lado, se practicaron laparatomías para observar el desarrollo folicular múltiple, medido como cuerpos lúteos presentes, en un muestreo de tres ovejas. Se observaron un promedio de 10 y 11 cuerpos lúteos para las ovejas tratadas con FSH y PMSG, como se observa en el Cuadro 24. Esta observación manifestó la misma tendencia que fue observada en trabajo previo desarrollado por Fernández, (1993).

**Cuadro 24. Efecto del foliculador (FSH o' PMSG) en el número de cuerpos lúteos presentes, en ovejas en las cuales se practicó la laparatomía.**

Foliculador	Ovario izquierdo	Ovario derecho	Cuerpos lúteos totales
FSH	5	6	11
PMSG	5	7	12
PMSG	4	6	10
	14	19	33

**Cuadro 25. Valores esperados del Cuadro 24, que se refiere al efecto del foliculador en el número de cuerpos lúteos.**

Foliculador	Ovario izquierdo	Ovario derecho
FSH	4.6	6.33
PMSG	5.09	6.90
PMSG	4.24	5.75

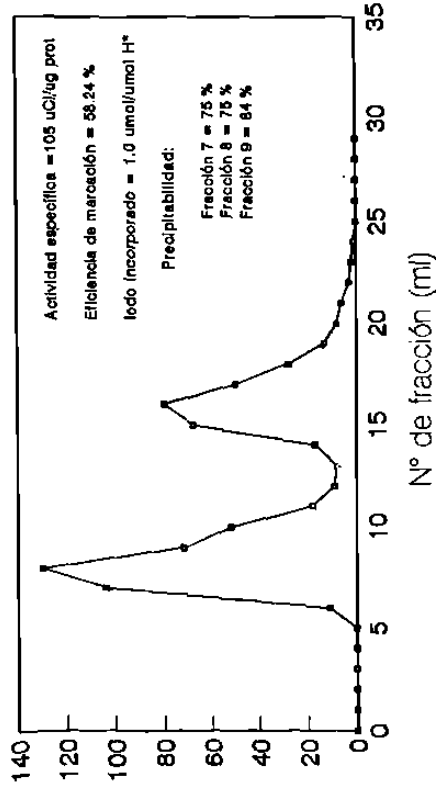
$$\chi^2_{\text{cal}} = 0.075 \text{ n.s.}$$

#### 4.2. RESULTADOS DEL ENSAYO II:

En la prueba No. 2 que consistió en la determinación de la concentración de la hormona LH en el suero sanguíneo por medio del método de radioinmunoanálisis, se validó la hormona marcada en cuanto a los parámetros eficiencia de marcación, actividad específica y yodo incorporado. En cuanto a la eficiencia de marcación se obtuvo un 68.24%, en actividad específica 105  $\mu\text{Ci}/\text{mg}$  y en yodo incorporado 1.0  $\mu\text{mol}/\mu\text{mol H}^*$  tal como se muestra en la fig. No. 1.

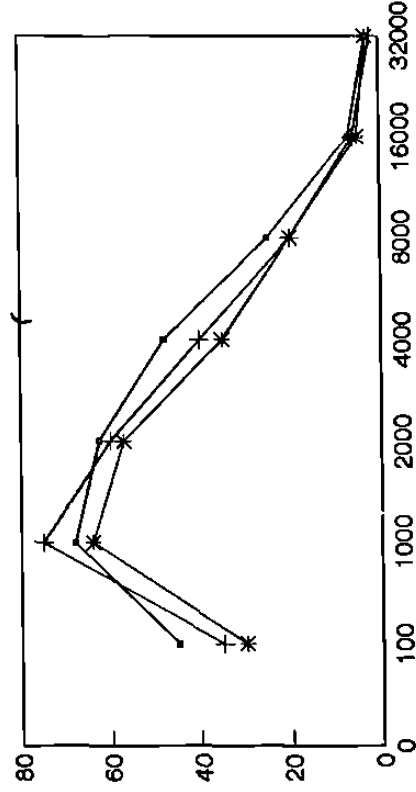
En lo referente a la inmunoreactividad en la fig. No. 2 se muestra el comportamiento de las fracciones 7, 8 y 9 en sus diluciones llegando a decidir el emplear una dilución de trabajo de 1:4000, con lo cual se obtuvo un porcentaje de unión máximo cercano al 50% en el momento de la titulación lo que nos permitió obtener la mejor sensibilidad del sistema.

## Marcación Cloramina T CM-2ab-DEAE-1a (910)



**Fig. 1. Eficencia de marcación, actividad específica y yodo incorporado de la LH marcada, para determinar su concentración en el suero sanguíneo.**

## Inmunoreactividad Ab-gLH (D831)



-- Fracción 7    + Fracción 8    \* Fracción 9

**Fig. 2. Comportamiento de las fracciones 7,8 y 9 y su determinación de la dilución a usar de acuerdo, al % de unión máxima, cercano al 50 %.**

En lo concerniente a la curva estándar en el Cuadro 26 se resumen los valores obtenidos en cuanto a sus parámetros.

**Cuadro 26. Parámetros de la curva estándar para el análisis de inmunoreactividad.**

PARÁMETRO	VALORES + D.S.
Cuentas totales (cpm)	14305 ± 609
Unión máxima (%)	41.5 ± 2.06
Unión no específica (%)	1.9 ± 0.48
Pendiente (m)	-0.77 ± 0.05
Coefficiente de correlación (%)	98.4 ± 0.05
Determinación al 80% (ng/ml)	0.075 ± 0.016
Determinación al 50% (ng/ml)	0.445 ± 0.057
Determinación al 20% (ng/ml)	2.73 ± 0.33
Control de calidad (ng/ml)	11.70 ± 1.82

Los valores determinados corresponden a n = 5  
D.S. = Desviación estándar.

Las figuras 3, 4 y 5 describen el comportamiento de la concentración de la hormona LH antes y después del estímulo refiriéndose cada figura a un tratamiento determinado. La figura No. 3 se refiere al grupo control, en ella se muestra como los niveles de LH se mantienen en un estado basal en las tres hembras del grupo. En la figura No. 4 que fué el grupo que se estimuló con HCG teniendo en este grupo 4 unidades experimentales, se observó que de las cuatro ovejas, una de ellas tuvo un incremento de LH, éste se detectó en la muestra sanguínea No 10 antes de haberse aplicado el estímulo, lo que hace pensar de que el estro en esta oveja empezó antes de tomar la muestra No. 11 (que fué en donde se realizó la aplicación del estímulo). En la figura No. 5 se representa el grupo al que se le aplicó la naloxona,



en este grupo una oveja respondió al estímulo de la naloxona y aunque la muestra que representa el aumento es en el preciso momento del estímulo hace pensar que el tiempo transcurrido entre la aplicación y la toma de muestra fué el suficiente para reportar el incremento de LH en el análisis, dado que como se tuvieron que muestrear otros animales antes en este tiempo, tuvo su efecto el estímulo llegando a reportar un máximo de concentración de LH de 35.8 ng de LH/ml

# Control

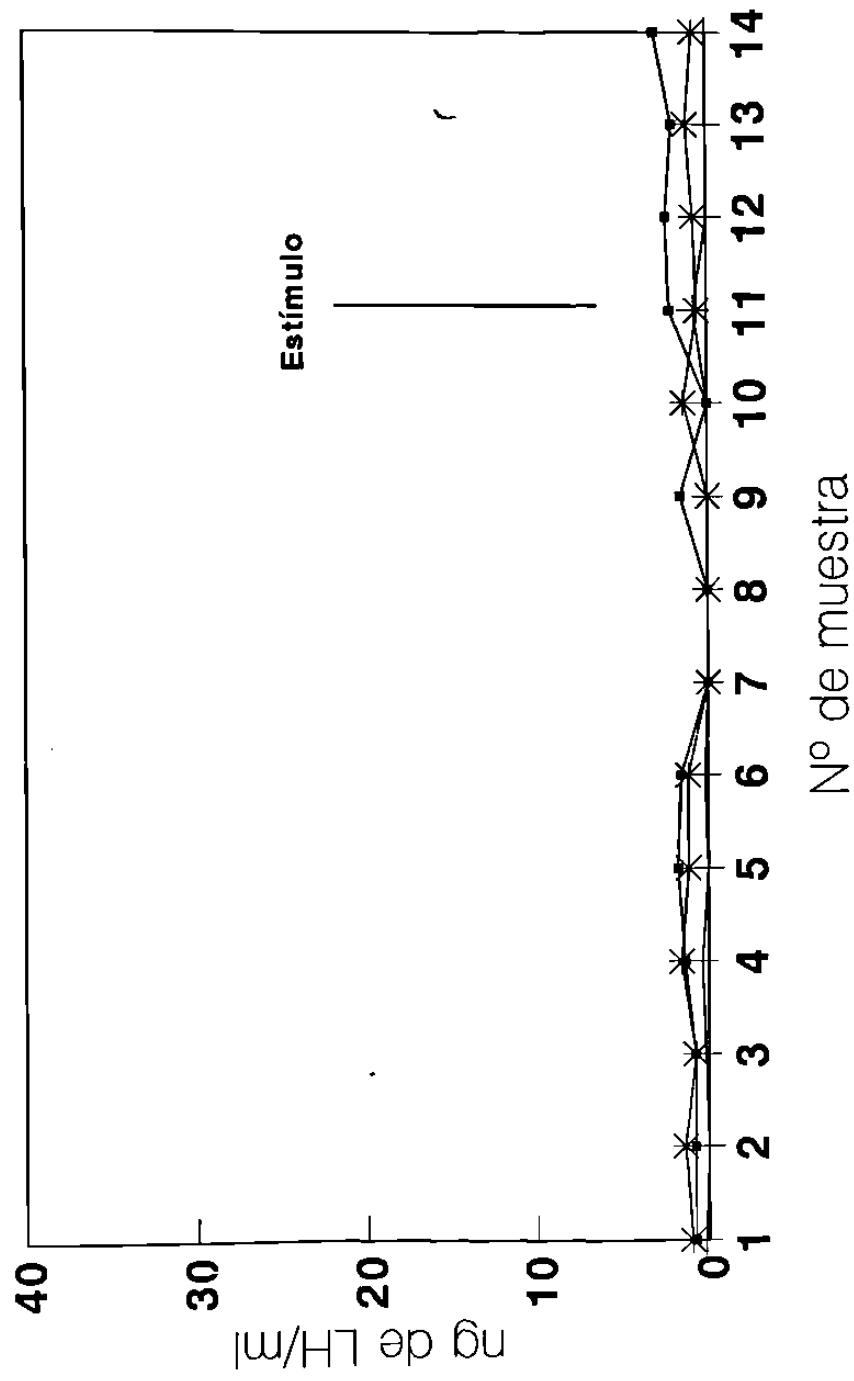


Fig. 3. Comportamiento de la concentración de la LH antes y después del estímulo de las ovejas usadas como grupo testigo.

# HCG

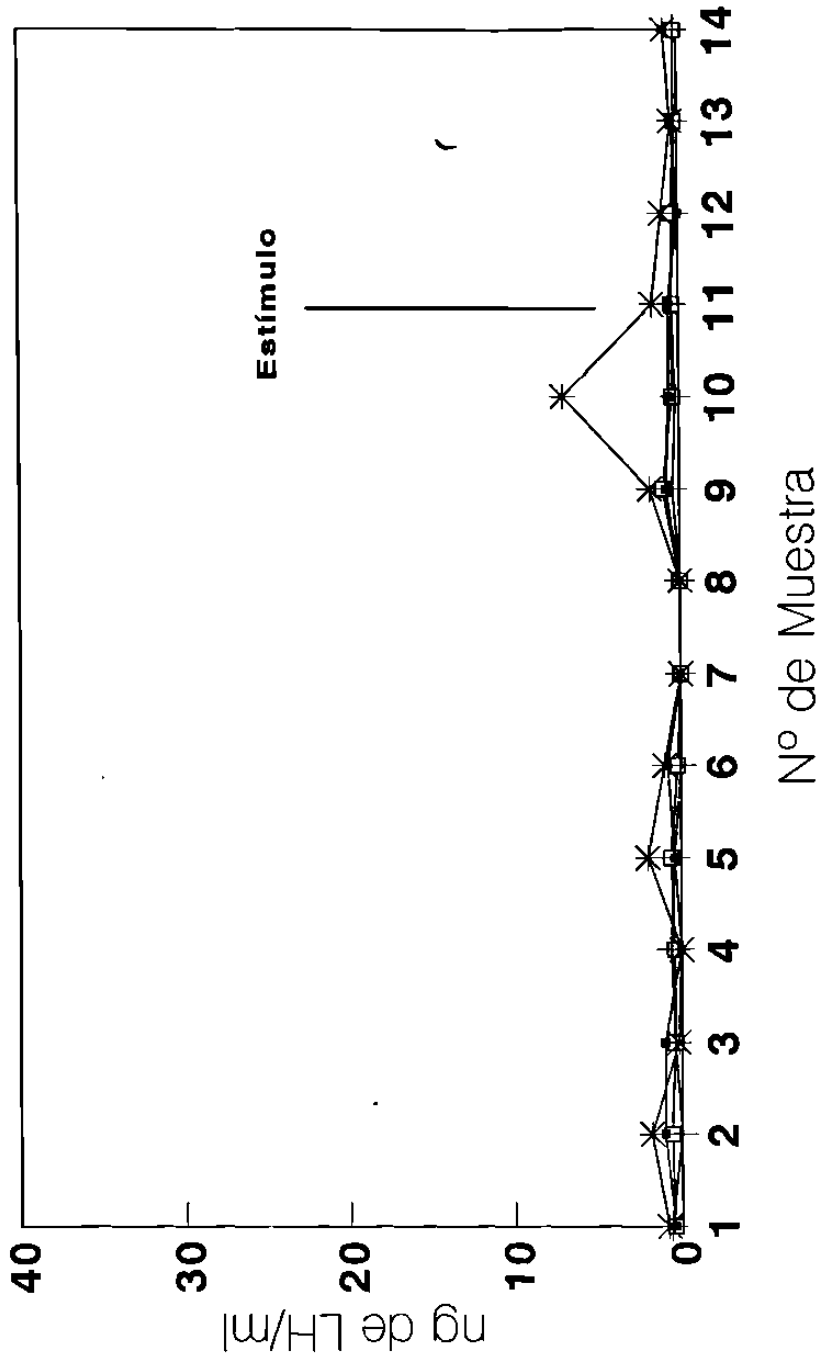


Fig. 4. Comportamiento de la concentración de la LH antes y después del estímulo de las ovejas, tratadas con HCG.

# Naloxona

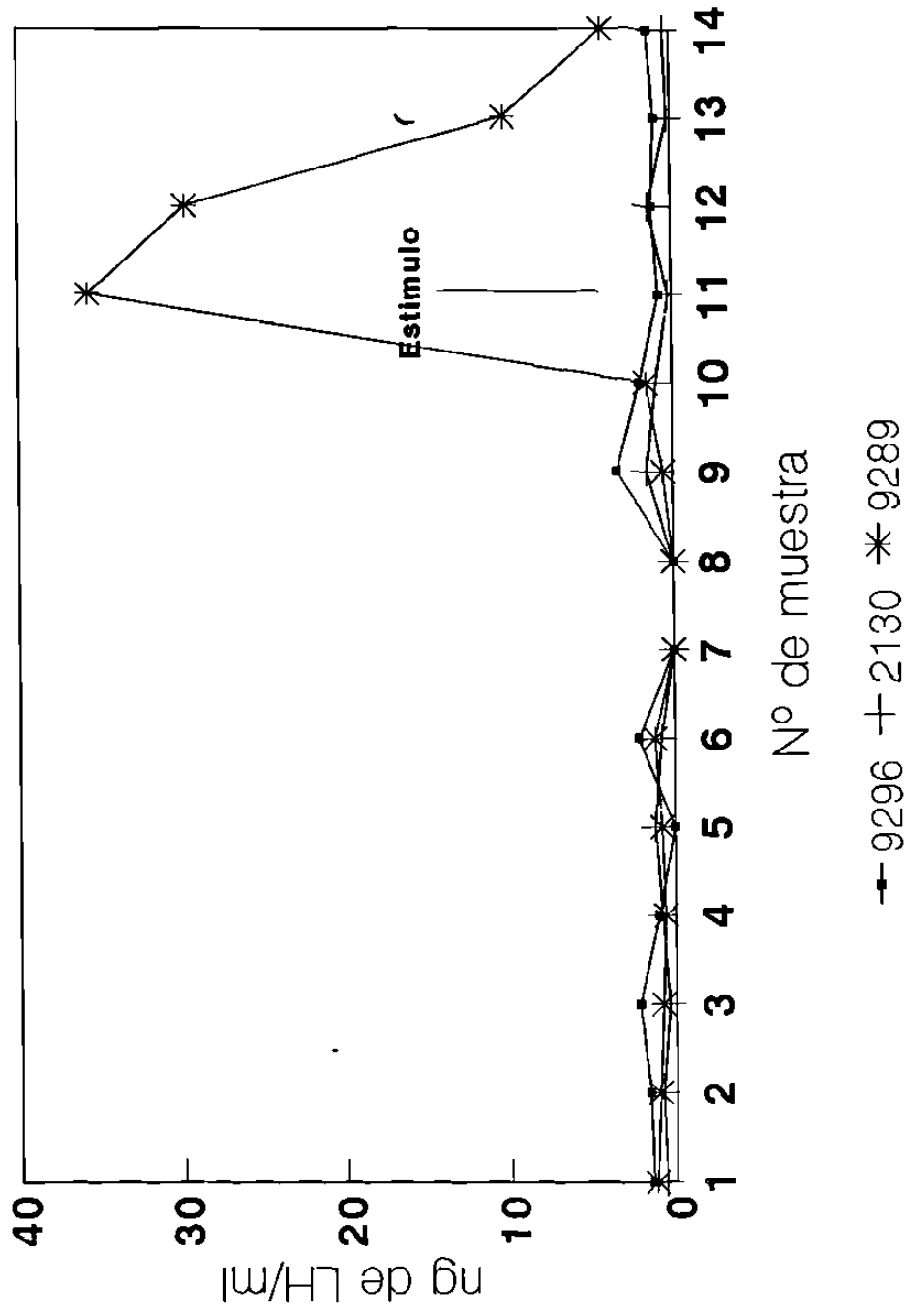


Fig. 5. Comportamiento de la concentración de la LH antes y después del estímulo de las ovejas tratadas con naloxona.

La literatura reporta que la sincronización con  $\text{PGF}_2\alpha$  en ovejas producen el pico preovulatorio de 48 hasta 96 horas después de la segunda aplicación, esta aseveración no concuerda con nuestros resultados donde el 44 % de las ovejas sincronizadas con  $\text{PGF}_2\alpha$  observaron picos preovulatorios de LH antes de las 48 h, en el 23 % , después de las 48 h y en el 33 % restante no se observaron niveles lo suficientemente altos para considerar que respondieron al tratamiento de sincronización en el período de tiempo que duró la evaluación de la prueba. En el Cuadro 27 se observan los resultados obtenidos durante la prueba, descritos anteriormente. En el Apéndice A4 se muestran los resultados del análisis de varianza (ANVA), necesarios para el Cuadro 27.

**Cuadro 27. Comportamiento en la ovulación de las borregas tratadas con naloxona, HCG y testigo.**

TESTIGOS	OBSERVACIONES
3A (0471)	Ovuló después de la aplicación de naloxona.
3G (9213)	Probablemente ovuló después de la aplicación de naloxona.
3H (92109)	Ovuló antes de la aplicación de naloxona.
<b>2° TESTIGO HCG</b>	
3B (2-125)	No ovuló después de la aplicación de naloxona.
3C (92-70)	No ovuló después de la aplicación de naloxona.
3F (2-66)	Ovuló antes de la aplicación de naloxona.
3I (92152)	No ovuló después de la aplicación de naloxona.
<b>NALOXONA</b>	
3D (9296)	Ovuló antes de la aplicación de naloxona.
3E (2130)	Ovuló antes de la aplicación de naloxona.
3J (9289)	Ovuló después de la aplicación de naloxona.

## **CAPITULO V**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

Dado las circunstancias y características en las que se realizaron los dos ensayos se concluye y se recomienda lo siguiente:

#### **Conclusiones del Ensayo I.**

- Se cumplió con el objetivo de la prueba, que consistía en romper el anestro estacional.
- El efecto de los sincronizadores resultó independiente del tipo de sincronizador utilizado.
- El número de las ovejas superovuladas es independiente del programa de superovulación usado, con FSH o' PMSG.

Con lo referente a las recomendaciones de esta prueba tenemos que:

- Se recomienda hacer más pruebas utilizando mayor número de unidades experimentales.
- Considerar grupos de animales lo más homogéneos posible en cuanto a peso, edad y raza.
- Contar con una infraestructura más apropiada, para realizar un mejor manejo del ganado (luz, techo, etc.).
- Se recomienda usar otro tipo de productos y compararlos contra los de esta prueba.

- También es conveniente usar dosis diferentes a las utilizadas en este experimento para fines de comparación.

### **Conclusiones del Ensayo II.**

- En el grupo tratado con naloxona, se visualizó un pico en la concentración de LH en una de las tres unidades experimentales lo que hace suponer que existió un efecto de ésta sobre la unidad experimental.
- Con la aplicación de HCG los niveles de LH se mantuvieron basales; sin embargo, a pesar de que una de las unidades experimentales mostró un pico en la concentración de la LH, éste no fué tan pronunciado como con la naloxona.
- El grupo testigo se mantuvo sin cambios en la concentración de la LH.

Con respecto a la prueba II se recomienda que:

- El tiempo entre muestreos debe ser menor (15 minutos) para detectar en más detalle los cambios en la concentración hormonal.
- Se realicen más pruebas en las que se analicen, la concentración de progesterona, de FSH y de LH, en la misma unidad experimental, para así obtener una interacción entre hormonas.
- Se consideren períodos más largos de muestreo.
- Se considere más atención en el tiempo del estado estral.
- Se consideren más unidades experimentales, para la obtención de mayor número de datos y así inferir de forma más acertada en los cambios ocurridos.
- Se realicen pruebas utilizando diferentes productos para sincronizar el estro (prostaglandina vs. progestágeno).

- Se prueben más productos de aplicación y compararlos con los usados en este trabajo.
- Se utilicen diferentes dosis de aplicación, a las utilizadas en este experimento.



## CAPITULO VI

### BIBLIOGRAFIA

Armstrong, D., T., A. P. Pfitzner, G. M. Warnes y R.E. Seamark, 1983. Superovulation treatments and embryo transfer in Angora goats. *J. Reprod. Fert.* 67: 403.

Armstrong, D. T. and Evans, G., 1983. Factors affecting success of embryo transfer in sheep and goat.

Budavari, S., O'Neil, M.J., Smith, A., Heckelman, P. (edit.), 1989. The Merck Index 11<sup>th</sup>. Ed. Merck & Co., Inc. U.S.A. pp. 583, 699, 728, 862, 909, 1006, 1199, 1234 y 1252.

Chemineau, P., D. Gauthier, J. C. Poririer y J. Saumande J, 1982. Plasma levels of LH, FSH, Prolactin, Oestradiol 17B and progesterone during natural and induced oestrus in the dairy goat. *Theriogenology*. 17(3) pp. 313

Derivaux, J., 1976. Reproducción de los Animales Domésticos. Edit. Acribia. Zaragoza, España. pp 468-475.

- Domínguez, F. C., 1988. Inducción y sincronización de celos durante el anestro estacionario, en la oveja Ripollesa mejorada, mediante esponjas vaginales, FGA y PMSG inyectable. *Anales de la Facultad de Veterinaria de León*. Vol 34, pp.77
- Donaldson, Lloyd E, 1991. Superovulation on trial. Published by AUSA International Inc. RT 8 Box 324-12 Tyler Tx 75703.
- Evans, G., Maxwell W. M. C., 1990. Inseminación artificial de ovejas y cabras. Edit. Acribia. Zaragoza, España. pp 43-51.
- Fernández, M. N., 1993. Ovulación múltiple con tres diferentes dosis de FSH-P en ovinos sincronizadas con SMB y PGF<sub>2</sub>α. Tesis de licenciatura. Facultad de Agronomía. U.A.N.L. pp. 42-44.
- Fuentes, H., V. O., C. Arce, y Mo. Ponce, 1990. Efecto de la naloxona sobre la secreción pulsátil de LH en la cabra: Fac. de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. pp 135-139.
- Goodman, G. A., Taylor, P., 1991. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Edit. Médica Panamericana. México pp. 507.
- Greg, D. W., G. E. More, R. E. Hudgens., 1986. Endogens and opioid modulation of luteinizing hormone and prolactin secretion in postpartum ewes and cows. *J. Anim. Sci.* 63 pp. 839.

Intervet International B.V., 1990. Guía Intervet. Boxmeer-Holanda.

Gutiérrez, A., 1993. Foliculogénesis en el Bovino. V Curso Internacional de Reproducción Bovina México D.F. pp 45-58.

Holy, L., 1983. Bases Biológicas de la Reproducción Bovina. Primera Ed. Edit. Diana. México D.F. pp 50-58, 115-137.

Land, R. B. and Hill, W. G., 1975. The possible use of superovulation and embryo transfer in cattle to increase response to selection. *Anim. Prod.* 21 pp. 1-12.

Leishin, L. S., L. A. Runo, F. N. Thomson, M. B. Mahaffey, W. J. Byerly, y T. E. Kiser, 1990. Serum Prolactin and growth hormone response naloxone and intercerebral ventricle morphin administration in heifers. *J. Anim.Sci.* 68 pp. 1656.

Mc. Clave, J. T., 1979. Statistics. Delle Publishing Co. pp. 347. U.S.A.

Mc. Donald, L. E., 1971. Reproducción y Endocrinología Veterinarias.Edit. Interamericana, S.A. México pp. 264-265.

Nicholas, F. W. y Smith, C., 1983. Increase rates of genetic change in dairy cattle by embryo transfer and splitting. *Anim. Prod.* 36 pp. 341-353.

- Odee, K. G., 1990. A Review of Synchronization of Estrus in Postpartum Cattle. *J. Animal Sci.* 68: pp. 817-830.
- Perera, M. G., 1993. Homologous Radioimmunoassay for goat Luteinizing Hormone. Enviado a publicación.
- Pratt, S. L., Spitzer, G. L., 1991. Luteal function, estrous response, and pregnancy rate after treatment with norgestomet and various dosages of estradiol valerate in suckled cows. *J. Anim. Sci.* 69. pp.-2721-2722.
- Smidt, D. E., 1972. Endocrinología y Fisiología de la Reproducción de los Animales Domésticos. Edit. Acribia. España. pp 310-313, 318, 323.
- Smith, C., 1986. Use of embryo transfer in genetic improvement of sheep. *Anim. Prod.* 42 pp. 81-88.
- Sorensen, A. M., 1979. Animal Reproduction: Principles and Practices. Mc Graw-Hill Book Company N.Y. USA.
- Tamanini, C., G. Bono, F. Cairolì, y F. Chiesa, F., 1985. Endocrine responses induced in anestrus goats by the administration of different hormones after a fluorogestone acetate treatment. *Anim. Reprod. Sci.*: 9 pp. 357.
- Weesner, G. D., W. E. Troot y P. U. Malven, 1989. Specific binding of naloxone to ovine brain tissue: Comparison of brain regions and endocrine states. *J. Anim. Sci.* 67 pp. 1537.

Yamane, T., 1967. Statistics an introductory analysis 2<sup>a</sup> Ed. Harper & Row, Publishers.  
U.S.A. pp. 625-631.

## **CAPITULO VII**

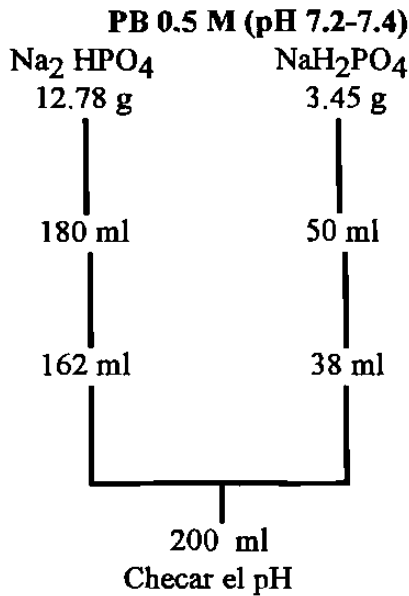
### **APENDICE**

#### **APENDICE I. Preparación de esponjas intravaginales.**

Para la preparación de las esponjas intravaginales se utilizó hule espuma de 3 cm de diámetro por 5 cm de longitud; para darle esta figura, al hule espuma, se perforó mediante un tubo cilíndrico, y posteriormente se les colocó un hilo, éste para poder extraer la esponja después de que haya transcurrido el tiempo respectivo para retirarlas; posteriormente se sometieron a esterilización por un tiempo de media hora en una autoclave.

**APENDICE II. Amortiguadores para el RIA:**

(Estos se conservan en refrigeración)

**Utilización**

1. Amortiguador madre

metasulfito.

**PBS 0.05 M**

PB 0.05 M + NaCl 0.14 M  
(1000 ml + 8.18 g)

**Utilización**

1. Preparar el PEG 6%
2. Preparar el 2° Ab
3. Centrifugación en muestra de plasma

**PBS-BSA**

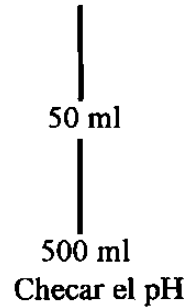
PBS + BSA 1%  
(100 ml + 1 g)

**Utilización**

1. Amortiguador del ensayo
2. Diluir los estándares

**PB 0.05 M (pH 7.4)**

PB 0.5 M

**Utilización**

1. Hinchar el Sephadex
2. Equilibrar columna
3. Preparar cloro y
4. Buffer de corrida

**PBS-EDTA**

PBS + EDTA 0.02 M  
(1000 ml + 7.6 g)

**Utilización**

1. Preparar el 1er. Ab
2. Preparar el SNC

**PBS + BSA**

PBS + BSA 0.1%  
(100 ml + 0.1 g)

**Utilización**

1. Diluir las fracciones obtenidas en la marcación

### APENDICE III. Inmunoactividad

1.-Se diluye el 1<sup>er</sup> anticuerpo a una relación de 1:100; tomando 100 microlitros de esta solución y aforandolo a 10 ml con una solución 0.05 M de PB o' con agua.

Para asegurar la homogenización de la solución anterior, se toman 100 microlitros del anticuerpo y se le agregan 900 microlitros de agua obteniendo un volumen final de 1 ml, para posteriormente proporcionarle los 9 ml de PB o agua que darán los 10 ml

2.- Se llevan en los frascos los siguientes volúmenes para sacar la relación correspondiente.

Relación	1er anticuerpo	+	SNC	+	PBS-EDTA	total
1:1000	200 micros		100 micros		1700	2 ml
1:2000	100 micros		100 micros		1800	2 ml
1:4000	100 micros		200 micros		3700	4 ml
1:8000	100 micros		400 micros		7500	8 ml
1:16000	50 micros		400 micros		7550	8 ml
1:32000	25 micros		400 micros		7575	8 ml

3. Se continua con el protocolo descrito a continuación:.

Se les agrega 700 µl de PBS-BSA 1%, a los tubos de unión no específica y a los siguientes se les agrega 500 µl (se aplica con dosificador eppendorf). Se prosigue a aplicar 200 µl a partir de los tubos 1:1000 y así sucesivamente "dependiendo de la concentración son los 200 µl de cada frasco". Ejemplo 1:1000 son 200 µl del frasco primero; 1:2000 son 200 µl del frasco 1:1000 preparado anteriormente y así sucesivamente hasta el frasco 1:32000 con su respectiva repetición "es importante cambiar de punta después de haber hecho sus dos tubos con su respectiva dilución".



Después de esto se procede a añadir 100  $\mu$ l del antígeno marcado "a todos los tubos". Posteriormente se tapan las muestras con papel aluminio y se guardan en el cuarto frío (incubación).

NOTA: El SNC (Suero Normal de Conejo) se usa cuando existe poca proteína en el tubo de ensayo lo que provoca una reacción muy inestable, así que el SNC estabiliza la reacción; es decir, ayuda a los componentes del sistema.

La secuencia seguida en la inmunoactividad es como a continuación se menciona: Primero se aplica el amortiguador (PBS-BSA 1%), después se agrega el 1<sup>er</sup> anticuerpo, posteriormente la hormona marcada y se procede a la incubación por 24 hrs. a 4 °C. Una vez transcurrido este tiempo se aplica el 2<sup>o</sup> anticuerpo y se procede a una segunda incubación por 24 hrs. a 4 °C, por último se añade el polietilenglicol al 6% en PBS y se centrifuga a 3000 rpm durante 30 min. a 4 °C.

## PROTOCOLO

	PBS-BSA	1° Ab	H*		2° Ab		PEG 6%	
1. CT3	-----	---	10		---		-----	
		-	0		-			<b>Centrifugación</b>
3. UNE	700	---	10	<b>Incubació</b>	200	<b>Incubació</b>	1000	
		-	0	<b>n</b>		<b>n</b>		<b>3000 rpm</b>
5. 1:1000	500	200	10		200		1000	
			0					
7. 1:2000	500	200	10	<b>por</b>	200	<b>por</b>	1000	<b>a 4 °C</b>
			0					
9. 1:4000	500	200	10		200		1000	
			0					
11. 1:8000	500	200	10	<b>24 horas</b>	200	<b>24 horas</b>	1000	<b>por 30 min.</b>
			0					
13. 1:16000	500	200	10		200		1000	
			0					
15. 1:32000	500	200	10		200		1000	
			0					

NOTA: Los 200 µl del 2° anticuerpo se aplican dentro del cuarto frío, se le aplicarán a cada tubo puesto a incubar, anteriormente. !!Los tubos no se sacan del cuarto frío!!.

NOTA: La función del polietilenglicol es la de precipitar el complejo Ag-Ab o sea dejar caer. El PGE se aplica a todas las muestras excepto a las cuentas totales, las cuales tampoco se centrifugan.

Después de realizar lo antes dicho se prosigue a colocar los tubos en una gradilla de esponja para decantarlos y se dejan boca abajo los tubos de ensaye un buen tiempo (7 min aprox.) en papel absorbente (higiénico) para después colocar los tubos en el contador "primero poner cuentas totales y luego los del ensayo".

**APENDICE IV. Cuadros de resultados del análisis de varianza de los datos de la concentración de LH.**

**Cuadro 28. Datos de la oveja 3A (0471).**

Tratamiento							
Diestro-proestro	0.8	0.8	0.8	1.4	1.8	1.6	1.6
Estro-metaestro	2.2	2.4	2.0	3.0			

**Cuadro 28 A. Análisis de varianza de la oveja 3A (0471).**

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamiento	1	3.324678	3.324678	17.2249	0.003
Error	9	1.737144	0.193016		
Total	10	5.061823			

C.V. = 26.26 %

**Cuadro 28 B. Resultados de la comparación de medias de la oveja 3A (0471).**

Tratamiento	Repeticiones	media
Estro-metaestro	4	2.400000 a
Diestro-proestro	7	1.257143 b

**Cuadro 29. Datos de la oveja 3G (9213).**

Tratamiento				
Diestro-proestro	0.2	0.2	0.4	0.2
Estro-metaestro	0.8			

**Cuadro 29 A. Análisis de varianza de la oveja 3G (9213).**

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamiento	1	0.242000	0.242000	24.2000	0.014
Error	3	0.030000	0.010000		
Total	4	0.272000			

C.V. = 27.78 %

**Cuadro 29B. Resultados de la comparación de medias de la oveja 3G (9213).**

Tratamiento	Repeticiones	media
Estro-metaestro	1	0.80 a
Diestro-proestro	4	0.25 b

**Cuadro 30. Datos de la oveja 3H (92109).**

Tratamiento							
Diestro-proestro	1.0	1.4	0.8	1.6	1.2	1.2	1.4
Estro-metaestro	0.6	0.8	1.2	0.8			

**Cuadro 30 A. Análisis de varianza de la oveja 3H (92109).**

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamiento	1	0.364804	0.364804	5.2592	0.046
Error	9	0.624289	0.069365		
Total	10	0.989093			

C.V. = 24.14 %

**Cuadro 30 B. Resultados de la comparación de medias de la oveja 3H (92109).**

Tratamiento	Repeticiones	media
Diestro-proestro	7	1.228571 a
Estro-metaestro	4	0.850000 b

**Cuadro 31. Datos de la oveja 3B (2-125).**

Tratamiento							
Diestro-proestro	0.4	1.0	1.0	0.4	0.8	0.8	0.6
Estro-metaestro	0.6	0.4	0.8				

**Cuadro 31 A. Análisis de varianza de la oveja 3B (2-125).**

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamiento	1	0.027429	0.027429	0.4683	0.518
Error	8	0.468571	0.058571		
Total	9	0.496000			

C.V. = 35.59 %

**Cuadro 31 B. Cuadro de medias de la oveja 3B (2-125).**

Tratamiento	repetición	media
Diestro-proestro	7	0.714286
Estro-metaestro	3	0.600000

No hay diferencia significativa

**Cuadro 32. Datos de la oveja 3C (92-70).**

Tratamiento						
Diestro-proestro	0.6	0.4	0.6	0.4	0.4	0.2
Estro-metaestro	0.4	0.2	0.2	0.2		

**Cuadro 32 A. Análisis de varianza de la oveja 3C (92-70).**

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamiento	1	0.080667	0.080667	4.5023	0.065
Error	8	0.143333	0.017917		
Total	9	0.224000			

C.V. = 37.18 %

**Cuadro 32 B. Cuadro de medias de la oveja 3C (92-70).**

Tratamiento	repetición	media
Diestro-proestro	6	0.4333
Estro-metaestro	4	0.2500

No hay diferencia significativa

**Cuadro 33. Datos de la oveja 3F (2-66).**

Tratamiento							
Diestro-proestro	0.8	1.8	0.2	2.0	1.0	1.8	7.0
Estro-metaestro	1.6	1.0	0.4	0.8			

**Cuadro 33 A. Análisis de varianza de la oveja 3F (2-66).**

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamiento	1	3.283247	3.283247	0.9393	0.640
Error	9	31.458576	3.495397		
Total	10	34.741823			

C.V. = 111.77 %

**Cuadro 33 B. Cuadro de medias de la oveja 3F (2-66).**

Tratamiento	repetición	media
Diestro-proestro	7	2.080
Estro-metaestro	4	0.950

\*Aunque no existe diferencia significativa entre tratamientos, el valor de la media del tratamiento 1 indica un nivel adecuado de concentración de LH, para inducir a la ovulación.

**Cuadro 34. Datos de la oveja 3I (92152).**

Tratamiento								
Diestro-proestro	0.4	0.6	0.4	0.4	0.6	0.2	1.0	0.4
Estro-metaestro	0.4	0.4	0.2	0.2				

**Cuadro 34 A. Análisis de varianza de la oveja 3I (92152).**

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamiento	1	0.106667	0.106667	2.4242	0.148
Error	10	0.440000	0.044000		
Total	11	0.546667			

C.V. = 48.41 %

**Cuadro 34 B. Cuadro de medias de la oveja 3I (92152).**

Tratamiento	repetición	media
Diestro-proestro	8	0.5
Estro-metaestro	4	0.3

No hay diferencia significativa.

**Cuadro 35. Datos de la oveja 3D (9296).**

Tratamiento								
Diestro-proestro	1.4	1.6	2.2	1.0	2.2	3.4	2.0	
Estro-metaestro	0.8	1.2	1.0	1.4				

**Cuadro 35 A. Análisis de varianza de la oveja 3D (9296).**

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamiento	1	1.932987	1.932987	4.6339	0.058
Error	9	3.754288	0.417143		
Total	10	5.687275			

C.V. = 39.04 %

**Cuadro 35 B. Cuadro de medias de la oveja 3D (9296).**

Tratamiento	repetición	media
Diestro-proestro	7	1.971429
Estro-metaestro	4	1.100000

\*Aunque no existe diferencia significativa entre tratamientos, el valor de la media del tratamiento 1 indica un nivel adecuado de concentración de LH, para inducir a la ovulación.

**Cuadro 36. Datos de la oveja 3E (2130).**

Tratamiento								
Diestro-proestro	0.6	0.8	0.4	0.8	1.2	0.8	1.6	1.0
Estro-metaestro	0.2	1.4	0.2	0.4				

\*Aunque no existió diferencia significativa entre medias de tratamientos, el nivel de 1.6 en la concentración de LH en una de las repeticiones del tratamiento 1 permiten la ovulación de la unidad experimental.



**Cuadro 36 A. Análisis de varianza de la oveja 3E (2130).**

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamiento	1	0.326668	0.326668	1.6752	0.223
Error	10	1.949999	0.195000		
Total	11	2.276667			

C.V. = 56.37 %

**Cuadro 36 B. Cuadro de medias de la oveja 3E (2130).**

Tratamiento	repetición	media
Diestro-proestro	8	0.90
Estro-metaestro	4	0.55

No hay diferencia significativa.

**Cuadro 37. Datos de la oveja 3J (9289).**

Tratamiento								
Diestro-proestro	1.2	1.0	0.8	0.6	0.8	1.2	0.6	1.6
Estro-metaestro	35.8	29.8	10.2	4.2				

**Cuadro 37 A. Análisis de varianza de la oveja 3J (9289).**

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamiento	1	965.201599	965.201599	13.9441	0.004
Error	10	692.195068	69.219505		
Total	11	1657.396667			

C.V. = 113.71 %

**Cuadro 37 B. Resultados de la comparación de medias de la oveja 3J (9289).**

Tratamiento	Repeticiones	media
Estro-metaestro	4	19.999 a
Diestro-proestro	8	0.9750 b

12001

