

INFLUENCIA DE LA SUPLEMENTACIÓN EN LA DIETA CON LEVADURAS Y MINERALES SOBRE LA PRODUCCIÓN DE OVOCITOS DE OVEJAS PÚBERES ESTIMULADAS OVÁRICAMENTE

The Influence of Diet Supplementation With Yeasts and Organic Minerals Over Oocyte Production of Ovarian Stimulated Ewes

Eugenia I. González Parra¹, Luis F. Navarrete Sierra¹, Alvar A. Cruz Tamayo², Alvaro Domínguez Rebolledo¹, José R. Sanginés García¹ y Julio P. Ramón Ugalde¹

¹Centro de Selección y Reproducción Ovina. Instituto Tecnológico Agropecuario No 2. Km 16.3 Antigua Carretera Mérida-Motul, Conkal Yucatán México. E-mail: jramon@itaconkal.edu.mx

²Centro de Selección y Reproducción Caprina y Ovina. San Luis Potosí

RESUMEN

Para producir ovocitos cultivados "in vivo" se estudió la respuesta superovulatoria de ovejas púberes suplementadas con un alimento proteico que contiene levaduras o minerales orgánicos. Dieciocho hembras (7 meses de edad) fueron distribuidas en 3 grupos: **TA**: 1 kg alimento 15% PC+Yea Sacc®, (levadura *Saccharomyces cerevisiae* cepa 1026). Dosis: 5 gr/animal/día+heno *ad libitum*. **TB**: 1 kg alimento 15% PC+Bioplex Plus®, (cultivo de levaduras vivas y minerales orgánicos). Dosis: 4 gr/animal/día+heno *ad libitum*. **TT**: Testigo. 1 kg alimento 15% de PC+heno *ad libitum*. El estro se sincronizó con esponjas vaginales (40 mg FGA) durante 12d. A los 10d de la inserción de las esponjas se aplicó 225 mg de prostaglandina/oveja. La superovulación se realizó 36h antes de la retirada de las esponjas mediante 100 mg-NIH FSHp y 500 UI eCG en una sola dosis/oveja. 24h de la retirada de las esponjas se aplicaron 100 µg GnRH/oveja. La tasa de ovulación se midió por endoscopia. Los ovocitos se recuperaron del oviducto 48h de la retirada de las esponjas. La TO resultó superior ($P<0,05$) en los TA y TB ($16,6\pm 6,84$ y $15,5\pm 4,18$), respecto al TT ($9,16\pm 3,81$). La tasa de recuperación (TR) muestra diferencias ($P<0,05$) entre el TA (93,9%) respecto a los TB (56,9%) y TT (61,8%). La proporción ($P<0,05$) de ovocitos de calidad 1 en el TA respecto a los TB y TT fue mayor. En conclusión, la adición de levaduras en la dieta favorece la respuesta a un tratamiento de estímulo superovulatorio en ovejas púberes incrementando la tasa de ovulación y calidad de los ovocitos.

Palabras clave: Ovocitos, levadura, minerales, superovulación, nutrición.

ABSTRACT

The superovulatory response of pre-pubertal or pubertal ewes fed with protein supplement that contained yeast or organic minerals was evaluated in order to obtain "in vivo" matured oocytes. Eighteen females (7 months of age) were allocated to one of the following treatment and fed as follow: Treatment A (TA): 1 kg food with 15% PC+Yea sacc® (yeast *Saccharomyces cerevisiae* stump 1026), dose: 5 gr/animal/day and hay *ad libitum*. Treatment B (TB): 1 kg food with 15% PC+Bioplex Plus® (Cultivation of live yeasts and organic minerals), dose: 4 gr/animal/day and hay *ad libitum*. Treatment C (TT: Control): 1 kg food with 15% PC and hay *ad libitum*. The estrous cycle was synchronized through the insertion of vaginal sponges with 40 mg of fluorogestone acetate (FGA) during 12 days. At day 10th of the sponges insertion 225 mg of prostaglandin F₂α was administered per ewe. To induce supra-ovulation 100 mg-NIH FSHp and 500 UI eCG in a single dose were applied 36 h before the withdrawal of the sponges, and 24 h from the last application 100 µg of GnRH was also injected. The ovulation rate was measured by endoscopy and ovulated oocytes collected by flushing. The total of ovulation (TO) was greater in the TA and TB (16.6 ± 6.84 and 15.5 ± 4.18) treatment, than on the control TT (9.16 ± 3.81) ($P<0.05$). The oocyte recovery (TR) after flashing was significantly higher in the TA (93.9%) treatment compared to TB (56.9%) and TT (61.8%). Finally, the proportion ($P<0.05$) of grade I oocytes in the diet supplementation in TA was in higher than the quality of oocytes in the TB and TT treatment. In conclusion, the addition of with yeasts, to supra-ovulated pre-pubertal ewes promotes ovulation rate and oocytes quality.

Key word: Oocytes, yeast, minerals, supra-ovulation, nutrition.

INTRODUCCIÓN

Pese a que actualmente se vienen practicando diferentes protocolos de estímulo superovulatorio en ovinos, los resultados son inconsistentes en número y calidad de embriones recuperados, a consecuencia de diversos factores tales como el tratamiento de sincronización / superovulación empleado [2]. Paralelo a ello, el balance nutricional desempeña un papel importante a la hora de obtener resultados adecuados [5]. En este sentido, algunos trabajos con ovejas adultas suplementadas con alimento de alto valor proteico, han demostrado que las características de la degradación proteica de los nutrientes de un alimento, pueden ejercer un efecto favorable o detrimental sobre el desarrollo embrionario temprano [24]. Así mismo, es conocida la acción benéfica sobre el ovario, cuando se suplementa con aceites vegetales ricos en ácidos grasos poli-insaturados [39], donde un aumento de energía y proteína de la dieta permite un incremento en el número y diámetro de los folículos preantrales [12] y, una mejor calidad y desarrollo de los ovocitos [27]. Por el contrario, un exceso de energía y proteína puede reducir la respuesta a un estímulo superovulatorio [5]. Evidentemente, en todos los casos se refleja que la relación nutrición-reproducción debe guardar cierto equilibrio. Más aún, tratándose de rumiantes donde la microflora y fauna son inestables, dependiendo sobre todo del tipo y calidad de los alimentos [18]. En este sentido, la suplementación de la dieta con levaduras y minerales orgánicos, además de modular los eventos de la digestión ruminal [20] incrementa la fertilidad y disminuye la mortalidad embrionaria [4]. Ciertas variedades y combinaciones microbianas para alimentación directa benefician el rendimiento y la salud de los animales. Estos elementos incrementan el consumo de alimento, la ganancia de peso corporal y la eficiencia del alimento, a través de un balance microbiano saludable en el tracto digestivo [15,29], aunque otros indican que no existe tal efecto [17].

La aplicación práctica de la fertilización *in vitro* (FIV), requiere que los óvulos provengan de animales de alto valor económico, genético y de historial sanitario conocido [2]. La técnica de recuperación de ovocitos por aspiración laparoscópica directa en los ovarios [3,32,36] es una manera de recolección eficiente de ovocitos procedentes de animales vivos. Aunque, también puede utilizarse ovocitos recuperados de ovarios de matadero y en ambos casos se requiere de un cultivo "*in vitro*" para su uso inmediato en programas de FIV. Para ello, la posibilidad de obtener ovocitos en ovejas púberes mediante la recolección de ovocitos madurados *in vivo* y recolectados en el oviducto después de la ovulación [33] abre la posibilidad de mejorar los resultados hasta ahora obtenidos con ovocitos madurados "*in vitro*" [8], ya que la ventaja de obtener ovocitos *in vivo* es que son cultivados en las primeras etapas en un medio ambiente oviductual, por el contrario, los ovocitos *in vitro* requieren de un cultivo artificial. El objetivo de este proyecto fue medir la respuesta ovárica de ovejas púberes suplementadas con levaduras y/o minerales orgánicos con el fin de producir

ovocitos maduros "*in vivo*" para su posterior conservación mediante vitrificación.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en enero-febrero de 2004, en el Centro de Selección y Reproducción Ovina (CeSyRO) del Instituto Tecnológico Agropecuario # 2 de Conkal, Yucatán (21°02' longitud Norte y 89°29' longitud Oeste) con clima tropical subhúmedo (Awo), con temperatura media anual de 26,5°C, precipitación total de 900 mm, y 9 msnm [11].

Se utilizaron 18 ovejas púberes de raza Santa Cruz, de 7 meses de edad, peso vivo de 32,1±4,3 Kg y una condición corporal de 3 [31], con buen estado sanitario. Fueron distribuidas en 3 tratamientos (n= 6) de acuerdo a su peso.

Todas las ovejas fueron mantenidas en estabulación completa y se desparasitaron con Albendazol micronizado (OVERSOL; Lab. Ovejero de México, S.A. de C.V, España).

Tuvieron a su disposición heno de pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*) a libre acceso y se les proporcionó un kilogramo de alimento comercial (Nutrimyn; MyN Distribuidora, S.A. de C.V., México) para ovinos con 15% de PC, a base de: Sorgo, pastas de soya y canola, cascarilla de soya, sal, carbonato de calcio, fosfato de calcio, melaza, urea, bicarbonato de sodio, cloruro de potasio, óxido de magnesio, minerales traza, vitaminas A, D3 y E, azufre, minerales quelatados (Zn).

Los tratamientos consistieron en:

- TA: Levaduras (Yea Sacc® - Alltech). Dosis: 5 gr/animal/día.
- TB: Levaduras + Minerales Orgánicos (Bioplex Plus® - Alltech). Dosis: 4 gr/animal/día.
- TT: Grupo Control.

La duración del trabajo de campo fue de 25 días.

La sincronización e inducción del estro se realizó mediante la inserción de esponjas vaginales impregnadas con 40 mg de Acetato de Fluorogestona (FGA; CHRONOGEST™; Intervet, México) ocho días después de iniciado el manejo alimenticio, y se mantuvieron 12 días. A los 10 días de la inserción de las esponjas se les aplicó 225 mg de prostaglandina (PGF₂Ü; ILIREN®, Intervet, México). Para inducir la superovulación, 36 horas antes de la retirada de las esponjas, se aplicó en dosis única vía intramuscular un compuesto a base de 100 mg-NIH de Hormona Folículo Estimulante Porcina (FSHp; FOLTROPIN-V®; Vetrepharm Inc. Canada) y 500 UI de Gonadotropina Coriónica Equina (eCG; FOLLIGON™; Intervet, México). Para sincronizar e inducir la ovulación se les aplicó una dosis de 100 µg de Hormona liberadora de las Gonadotropinas (GnRH; FERTAGYL®, Intervet, México) a las 24 horas después de la retirada de las esponjas. La respuesta al tratamiento se midió por endoscopia [25] a través del conteo de cuerpos

lúteos presentes en el ovario (TO: Tasa de Ovulación) y la calidad del cuerpo lúteo (color, forma y presencia/ausencia de fosa de ovulación). Los ovocitos se recuperaron por perfusión directa del oviducto [30] con 10 ml de PBS (BIOLIFE™ Advantage; Agtech, Inc) a las 48 horas de la retirada de las esponjas. Posteriormente se valoraron en base al aspecto morfológico y desarrollo ovocitario, y se clasificaron en cuatro categorías: Excelente (Calidad 1: C1), Bueno (Calidad 2: C2), Regular (Calidad 3: C3) y no fertilizados (Calidad 4: C4) [28], siendo vitrificados en soluciones que contenía: 10% de Glicerol (G) durante 5 minutos, 15% G + 20% de Etilenglicol (EG) durante 5 minutos, 25% G + 25% EG durante 30 segundos y posteriormente las pajuelas se expusieron a vapores de nitrógeno durante 20 segundos, sumergidas directamente en el nitrógeno [14, 22] y almacenados en nitrógeno líquido.

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente mediante la prueba Ji-cuadrado del programa estadístico Statistix [34].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La administración oral a ovejas púberes de levaduras y minerales orgánicos mejoró la tasa ovulatoria ($16,6 \pm 6,84$, $15,5 \pm 4,18$) ($9,16 \pm 3,81$); con respecto al grupo de control ($P < 0,05$, TABLA I). La tasa ovulatoria con el uso de levaduras es superior a la reportada por Magaña [21], donde utilizó el mismo protocolo de superovulación en ovejas primíparas con una dosis única de FSHp+eCG, ($11,85 \pm 7,32$) y similar al obtenido en el TT ($9,16 \pm 3,81$).

De igual forma, el uso de levaduras mejoró la tasa de ovulación con respecto a protocolos de estímulo superovulatorio múltiples, previamente reportados. En esos estudios, la respuesta se situó en valores que varían entre $6,8 \pm 3,91$ (ovejas Ile de France) [37], $9,8 \pm 1,05$ a $11,5 \pm 5,04$ ovejas Pelibuey [26, 38]. Aunque se debe tener en cuenta las diferencias entre

razas y condiciones ambientales a las cuales fueron sometidas las ovejas, los resultados sugieren que la administración de levaduras en la dieta favorece el nivel de respuesta superovulatoria a través de un incremento de la TO.

La tasa de recuperación (TR) de ovocitos fue mayor en el tratamiento TA (93,9%) y significativamente diferente a los tratamientos TA y TT (56,9 y 61,8%, respectivamente, $P < 0,05$, TABLA I). Aunque el número de ovocitos recuperados a nivel de oviducto resulta satisfactorio, y similar al reportado por otros investigadores utilizando técnicas similares (83,2%) Folch y col [7]; (57,4%): Alwan y col [1], no es posible explicar las diferencias obtenidas entre los tratamientos. Por lo tanto, futuros estudios se deben realizar para entender si existen diferencias fisiológicas y/o técnicas en la colección de ovocitos.

En la TABLA II se presentan los resultados del número de ovocitos clasificados de acuerdo a su morfología. La mayoría de los ovocitos colectados en los diferentes tratamientos fueron clasificados como calidad 1 (C1) y en una menor proporción, los de calidad 2 (C2) y 3 (C3). Si bien es conocido que los ovocitos están en metafase II cuando ocurre la ovulación [6], éstos son captados por la fimbria que rodea al ovario siendo conducidos hacia el oviducto. Muchos investigadores coinciden en que en el oviducto se expresan componentes macromoleculares específicos que interactúan con los gametos [35], favoreciendo su maduración a fin de estar capacitados para su fecundación [9]. La calidad del ovocito maduro *in vivo* resulta de especial interés, dado que el ovocito en esta fase, prácticamente es seleccionado naturalmente por factores de crecimiento tales como las IGFs (Insulin like growth factors). El modo de acción autocrino y paracrino de ellas sobre el medio ambiente uterino, es mediado por el tipo de receptor uterino, ya sea para IGF-I o IGF-BP (IGF-binding protein) [23]. Sin embargo, el valor y la calidad de la dieta suelen influir en la secreción de estos factores, ya sea a través de la secreción endógena de la hormona de crecimiento (GH), niveles de insu-

TABLA I

RESULTADOS OBTENIDOS EN OVEJAS DE PELO PÚBERES SUPEROVULADAS CON FSHp+eCG Y ALIMENTADAS CON LEVADURAS (TA: YEA SACC^{MR 1026}), LEVADURAS Y MINERALES ORGANICOS (TB: BIOPLEX PLUS^{MR}) Y TESTIGO (TT) ADICIONADOS A UN ALIMENTO BALANCEADO (15% PC) / RESULTS OBTAINED IN PUBERTY EWES SUPEROVULATED WITH FSHp+eCG AND FED WITH YEAST (TA: YEA SACC^{MR 1026}), YEAST AND MINERALS (TB: BIOPLEX PLUS^{MR}) AND CONTROL (TT) ADDED TO A BALANCED FOOD (15% PC)

	TA Levaduras	TB Levaduras+Minerales	TT Control
Ovejas tratadas	5**	6	6
Ovejas lavadas	5	6	6
Cuerpos luteos (Rango)	83 ^a (12 - 28)	93 ^a (9 - 21)	55 ^b (5 - 15)
media $\pm$ D.S.	$16,6 \pm 6,84$	$15,5 \pm 4,18$	$9,16 \pm 3,81$
Ovocitos recuperados	78 ^a	54 ^b	34 ^b
Tasa de recuperación (%)	93,9 ^a	56,9 ^b	61,8 ^b

** Una hembra de este grupo resulto muerta al los 10d de iniciado el experimento.

(^{a,b}) Letras diferentes en fila indican diferencia significativa ($P < 0,05$).

TABLA II
CALIDAD DE LOS OVOCITOS OBTENIDOS DE LOS TRATAMIENTOS (TA: YEA SACC^{MR 1026}), LEVADURAS Y MINERALES ORGANICOS (TB: BIOPLEX PLUS^{MR}) Y TESTIGO (TT) ADICIONADOS A UN ALIMENTO BALANCEADO (15% PC) /
QUALITY OF THE OOCYTES OBTAINED OF TREATMENTS (TA: YEA SACC^{MR 1026}), YEAST AND MINERALS (TB: BIOPLEX PLUS^{MR}) AND CONTROL (TT) ADDED TO A BALANCED FOOD (15% PC)

	TA Levaduras	TB Levaduras+ Minerales	TT Control
Ovocitos C1*	66 (84,6%) ^a	39 (72,2%) ^b	30 (88,2%) ^b
Ovocitos C2*	9 (11,5%) ^a	9 (17,0%) ^a	1 (3,0%) ^a
Ovocitos C3*	3 (3,9%) ^a	10 (18,9%) ^a	3 (8,8%) ^a
Zonas pelucidas	2	2	2

* % Respecto al total de ovocitos recuperados. C1, C2, C3: Ovocitos de Calidad 1, 2 y 3. ^(a,b) Letras diferentes en fila indican diferencia significativa (P<0,05).

lina [16] y energía [19] que parecen influir sobre la calidad del ovocito, su capacidad para ser fecundado y su posterior desarrollo embrionario [9]. El efecto favorable de las levaduras en la dieta se plasma en el resultado obtenido en el TA que responde a un patrón en el cual los ovocitos provienen de folículos maduros, dado que en aquellos folículos inmaduros (sin talla preovulatoria) que ovulan, la activación de la meiosis del ovocito es prematura en un momento en que la maduración de su citoplasma es incompleta [10,13] por lo que su capacidad para ser fecundado esta disminuido.

CONCLUSIÓN

La adición de levaduras a una dieta con 15% de PC favorece la respuesta a un tratamiento de estimulo superovulatorio en ovejas púberes de pelo incrementando la tasa de ovulación y el porcentaje de ovocitos de calidad C1.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo ha sido financiado parcialmente a través del proyecto COSNET 773.01-P. Los autores agradecen la cooperación de MyN Distribuciones, Alltech y Servivet S.A. de C.V. quienes proporcionaron algunos de los insumos requeridos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] ALWAN, S.F.; BOLAND, M.P.; GORDON, I. Superovulation and oocyte recovery in the ewe. **Theriogenol.** 29 (5): 1143-1148. 1988.

[2] BALDASARRE, H. Biotecnología reproductiva en nuestro futuro inmediato. **2º Congreso Internacional de pequeños rumiantes y camélidos sudamericanos y XI Congreso Nacional de Ovinocultura.** Mérida, 22-25 Mayo, Yucatán, México. CD Memorias. 1-16 pp. 2001.

[3] BALDASSARRE H. Ovum pick-up followed by in vitro production of embryos sheep and cattle. **Proceedings of**

the 4th SIPAR Follow-Up Seminar on Animal Reproduction and Biotechnology for Latin America. Belem, Para, Brasil. 08-20 Febrero. 62-70 pp. 1998.

[4] BAKER, D.S.; AHOLA, J.K.; BURNS, P.D.; ENGLE, T.E. Trace mineral metabolism in ruminants: impact on production, reproduction and the environment. **Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries. In: Proceedings of Alltech's 19th International Symposium.** Lexington, Kentucky, USA. May 11-14. 275-287 pp. 2003.

[5] BOLAND, M.P.; LONERGAN, P.; CALLAGHAN, D.O. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryos development. **Theriogenol.** 55: 1323-1340. 2001.

[6] DRIANCOURT, M.A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenol.** 55:1211-1239. 2001.

[7] FOLCH, J.; COCERO, M.J.; RAMÓN, JP.; FERNÁNDEZ-ARIAS, A.; ALABART, J.L. Embryo recovery in the oviductal improves efficiency of superovulation in the ewe. **In: Proceedings of the 7th Scientific Meeting of the European Embryo Transfer Association,** Cambridge, U.K. 14-16 Septiembre. 144 pp. 1991.

[8] GALLI, C.; VALLILIEV, I.; LAGUTINA, I.; GALLI, A.; LAZZARI, G. Bovine embryo development following ICSI: effect of activation, sperm capacitation and pre-treatment with dithiothreitol. **Theriogenol.** 60 (8): 1467-1480. 2003.

[9] GANDOLFI, F. Autocrine, paracrine and environmental factors influencing embryonic development from zygote to blastocyst. **Theriogenol.** 41:95-100. 1994.

[10] GANDOLFI, B.T.A.L.; GANDOLFI, F.G. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenol.** 55:1255-1276. 2001.

[11] GARCÍA, E. **Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (adaptado a las condicio-**

- nes de la República Mexicana). 3ª Ed. México, D.F. Enriqueta García de Miranda. (Ed). 252 pp. 1981.
- [12] GWAZDAUSKAS, F.C.; KENDRICK, K.W.; PRYOR, A.W.; BAILEY, T.L. Impact of follicular aspiration on folliculogenesis as influenced by dietary energy and stage of lactation. Symposium: Folliculogenesis in the bovine ovary. **J. Dairy Sci.** 83:1625-1634. 1999.
- [13] HYTTTEL, P.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Ultrastructural features of preovulatory oocyte maturation in superovulated cattle. **J. Reprod. Fert.** 76: 645-656. 1986.
- [14] ISACHENKO, V.; ALABART, J.L.; DATTENA, M.; NAWROTH, F.; CAPPAL, P.; ISACHENKO, E.; COCERO, M.J.; OLIVERA, J.; ROCHE, A.; ACCARDO, C.; KRIVOKHARCHENKO, A.; FOLCH, J. New technology for vitrification and field (microscope-free) warming and transfer of small ruminant embryos. **Theriogenol.** 59 (6): 1209-1218. 2003.
- [15] JENNY, B.F.; VANDIJK, H.J.; COLLINS, J.A. Performance fecal flora of calves fed a *Bacillus subtilis* concentrate. **J. Dairy Sci.** 74: 1968. 1991.
- [16] KAYE, P.L.; BELL, K.L.; BEEBE, L.F.S.; DUNGLISON, G.F.; GARDNER, H.G. Insulin and the Insulin-like Growth Factors (IGFs) in Preimplantation Development. **Reprod. Fertil. Dev.** 4: 373-386. 1992.
- [17] KUNG, L. Use of additives in silage fermentation. In: **Direct – Fed Microbial, Enzyme and Forage Additive Compendium**. Miller Publishing Co., Minnetonka, MN, USA. 37-42 pp. 1996.
- [18] LINDSAY, R.D.; MARTÍN, B.G.; WILLIAMS, H.I. Reproduction in domesticated animals. In: **Nutrition and Reproduction**. Chapter 17. Elsevier. 459-492pp. 1993.
- [19] LOZANO, J.M.; LONERGAN, P.; BOLAND, M.P.; O'CALLAGHAN, D. Influence of nutrition on the effectiveness of superovulation programmes in ewes: effect on oocyte quality and post-fertilization development. **Reprod.** 125: 543-553. 2003.
- [20] LYONS, T.P. Harnessing nature to feed industry problems: practical applications of natural technologies. . In: **Proceedings of Alltech's 19th International Symposium**. Lexington, Kentucky, USA. May 11-14. 1-6 pp. 2003.
- [21] MAGAÑA, H.S. **Respuesta ovárica a un estímulo superovulatorio simplificado en ovinos**. Instituto Tecnológico Agropecuario No 2. Conkal, Yucatán. (Tesis de Maestría). 55 pp. 1997.
- [22] MERMILLOD, P.; TRALDI, A.S.; GUÉRIN, Y.; POULIN, N.; MASSIP, A.P.; COGNIÉ, Y. Successful vitrification of in vitro produced ovine embryos. **13th AETE meeting**, Lyon, France. 12-13 Septiembre. 182 pp. 1997.
- [23] MONGET, P. **Le système IGF dans Lóvaire de brebis**. Université Paris VI. Paris. (Thesis de Doctorat).119 pp. 1993.
- [24] NAVARRETE, S.L.; AYALA, B.A.; RAMÓN, U.J.; FOLCH, J.; CRUZ, T.A.; AGUIAR, L.A.; EROSA, D.S.; GONZÁLEZ, P.E. El efecto de la utilización de proteína sobrepasante sobre la tasa de ovulación y la viabilidad embrionaria en ovejas superovuladas. **2º Congreso Internacional de pequeños rumiantes y camélidos sudamericanos y XI Congreso Nacional de Ovinocultura**. (Abstract Rep 15). Mérida, 22-25 mayo, Yucatán, México. CD Memorias. 58pp. 2001.
- [25] OLDHAM, C.M.; LINDSAY, D.R. Laparoscopy in the ewe: A photographic record of the ovarian activity of ewes experiencing normal or abnormal oestrus cycles. **Anim Reprod Sci.** 3: 119-124. 1980.
- [26] ORTÍZ, O.J.R.; RAMÓN, U.J.P. Resultados de un esquema de ovulación múltiple y transferencia de embriones en ovinos pelibuey. **IX Congreso Nacional de Investigación y Desarrollo Tecnológico Agropecuario**. Mérida, Yucatán. 23-26 noviembre. 224pp. 1998.
- [27] PAPADOPOULOS, S.; LONERGAN, P.; GATH, V.; QUINN, K.M.; EVANS, A.C.O.; CALLAGAN, D.O.; BOLAND, M.P. Effect of diet quantity and urea supplementation on oocyte and embryo quality in sheep. **Theriogenol.** 55: 1059-1069. 2001.
- [28] PATRIZIO, P.; TRUCKER, M.J.; GUELMAN, V. Ovocito. **Atlas de Reproducción Asistida. Aspectos clínicos y de laboratorio**. 23-43 pp. 2003.
- [29] POLLMAN, D.S.; DANIELSON, D.M.; PEO, E.R. Jr. Effects of microbial feed additives on performance of starter and growing-finishing pigs. **J. Anim. Sci.** 51:577. 1980.
- [30] RAMÓN, J.P. Aplicación de la hormona de crecimiento para disminuir la mortalidad embrionaria en ovejas sometidas a transferencia de embriones. Universidad de Zaragoza. (Tesis Doctoral). 113 pp. 1993.
- [31] RUSSEL, A.J.F.; DONEY, J.M.; GUN, R.G. Subjective assesment of body fat in live sheep. **J. Agric. Sci. Cam.** (72):451-454. 1969.
- [32] SNYDER, D.A.; DUKELOW, R. Laparoscopic studies of ovulation, pregnancy diagnoses, and follicle aspiration in sheep. **Theriogenol.** 2:143-148. 1974.
- [33] SLAVIK, T.; FULKA, J. Oviduct secretion contributes to the establishment of species specific barrier preventing penetration of oocytes with foreign spermatozoa. **Folia Biol.** 45:53-57. 1999.
- [34] Statistix. Statistix for windows users manual, versión 1.0. Analytical Software, Inc., Tallahassee, Fla. 1996.

- [35] SUTTON, R.; NANCARROW, C.D.; WALLECE, A.L.C.; RIGBY, N.W. Identification of an oestrus-associated glycoprotein in oviductal fluid of the sheep. **J Reprod and Fert.** 72: 415-422. 1984.
- [36] TERVIT, H.R. Laparoscopy/laporotomy oocyte recovery juvenile breeding. **Anim Reprod Sci.** 42:227-238. 1996.
- [37] TORRÉS, S.; COGNIÉ, Y.; COLAS, G. Transfer of superovulated sheep embryos obtained with different FSHp. **Theriogenol.** 27:407-418. 1987.
- [38] VERDURA, T.; FUENTES, J.L. Superovulación con dos niveles de FSH decrecientes en ovejas pelibuey. **Rev. Cub. Reprod. Anim.** Número Especial: 176-185. 1993.
- [39] WILLIAMS, G.L. Influence of dietary fat intake and metabolism on follicular growth in cattle. **Reprod. Dom. Anim.** 31:539-542. 1996.