

**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA**

**DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN ANIMAL,  
BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**



**TESIS DOCTORAL**

**CARACTERIZACIÓN DEL CICLO SEXUAL  
Y DEL CRECIMIENTO FOLICULAR TERMINAL  
EN LA OVEJA DE LA RAZA CANARIA**

**MIGUEL BATISTA ARTEAGA**

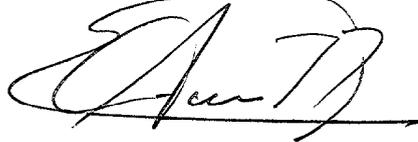
Las Palmas de Gran Canaria, 1996

29/1995-96  
UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA  
UNIDAD DE TERCER CICLO Y POSTGRADO

Reunido el día de la fecha, el Tribunal nombrado por el Excmo. Sr. Rector Magfco. de esta Universidad, el aspirante expuso esta TESIS DOCTORAL.

Terminada la lectura y contestadas por el Doctorando las objeciones formuladas por los señores jueces del Tribunal, éste calificó dicho trabajo con la nota de Apto cum Laude Las Palmas de G. C., a 1 de marzo de 1996.

El Presidente: Dr. D. Antonio Fernández Rodríguez



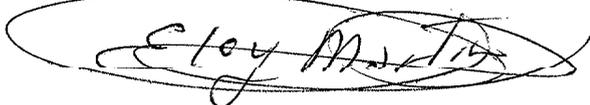
El Secretario: Dr. D. Fernando Real Valcarcel,



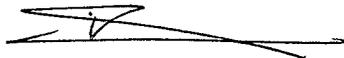
El Vocal: Dr. D. Emilio Espinosa Velázquez,



El Vocal: Dr. D. Eloy Martín Martín,



El Vocal: Dra. Dña. María del Rosario Fresno Baqueró,



El Doctorando: D. Miguel Jesús Batista Arteaga,





BIBLIOTECA UNIVERSITARIA  
LAS PALMAS DE G. CANARIA  
N.º Documento 403048  
N.º Copia 403058

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

DOCTORADO EN VETERINARIA

Departamento de Patología Animal, Producción Animal  
Bromatología y Tecnología de los Alimentos

Programa de Medicina y Sanidad Animal

**CARACTERIZACIÓN DEL CICLO SEXUAL Y  
DEL CRECIMIENTO FOLICULAR TERMINAL EN LA  
OVEJA DE LA RAZA CANARIA**

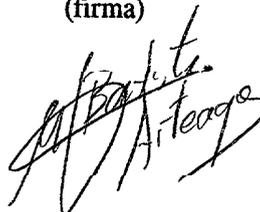
Tesis Doctoral presentada por:  
Dirigida por el Dr.:

D. Miguel Batista Arteaga  
D. Anselmo Gracia Molina

El Director,  
(firma)



El Doctorando,  
(firma)



Las Palmas de Gran Canaria, a 8 de enero de 1996

Algunos resultados del presente trabajo han sido publicados en las siguientes Comunicaciones:

- **BATISTA, M.; GONZÁLEZ, F. Y GRACIA, A. (1994):** Caracterización del ciclo sexual de la oveja Canaria. *VII Jornadas Internacionales de Reproducción Animal, 6-9 de Julio, Murcia: 293.*

- **BATISTA, M.; GONZÁLEZ, F.; RODRÍGUEZ, F. Y GRACIA, A. (1994):** Determinación de la calidad folicular a lo largo de la fase estrogénica en la oveja Canaria. *VII Jornadas Internacionales de Reproducción Animal, 6-9 de Julio, Murcia: 295.*

- **BATISTA, M.; ALABART, J.L.; GONZÁLEZ, F.; CABRERA, F. Y GRACIA, A. (1995):** Relaciones hormonales (progesterona y LH) a lo largo del ciclo estral de la oveja Canaria. *VI Jornadas sobre Producción Animal, 25-27 de Abril, Zaragoza: 362*

\* Parte de este trabajo ha sido financiado con el Proyecto CA 19/90 de la Diputación General de Aragón

**A mis padres y hermanos  
A María del Mar**

## Agradecimientos

Al Dr. D. Anselmo Gracia, director de este trabajo, por su gran capacidad de dirección y su inestimable apoyo durante estos años.

Al Dr. D. Antonio Fernández, por su colaboración en el procesado histológico de las muestras y sus acertados consejos.

Al Dr. D. Emilio Espinosa, por el apoyo, interés y orientación en numerosos aspectos de la tesis.

Al Dr. D. José Luis Alabart, modelo de rigurosidad científica, por su enorme contribución en la realización e interpretación de los análisis de progesterona.

Al Dr. D. Fernando González, por ser partícipe de tanta cooperación en la realización de la tesis y los ánimos siempre dados.

Al Dr. D. Fernando Real, por su constante disposición durante mi período como alumno de Doctorado y la ayuda prestada en todo momento que fue solicitada.

A D. Amado Ramos y D. Antonio Mirelles, director y subdirector respectivamente del matadero municipal de Las Palmas de G.C., por permitirme el acceso a todas las dependencias y su grata contribución.

A D. Francisco Reyes y D. Francisco Rodríguez, por permitir el alojamiento de los animales y el desarrollo, en ocasiones a horas intempestivas, del trabajo experimental de la tesis en las instalaciones de la Granja Agrícola Experimental del Cabildo de Gran Canaria.

A la U.L.P.G.C. por haberme concedido una beca de investigación durante el período 1992-1994, y poder dar mis primeros pasos como investigador y docente.

A todos los técnicos que colaboraron intensamente en diferentes aspectos de la tesis, tanto en el cuidado de los animales, como en los análisis hormonales o en la encuadernación de la tesis.

Y por supuesto, a todos aquellos que durante estos años me prestaron siempre su cariño, su aliento y su mano amiga, y a los dedicué menos tiempo del que merecían.

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN .....   | 1  |
| 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....   | 6  |
| 2.1. CICLO SEXUAL OVINO   |    |
| 2.1.1. Introducción .....   | 7  |
| 2.1.2. Ciclo estral: duración y fases .....   | 7  |
| 2.1.3. Estro: duración y comportamiento estral .....  | 10 |
| 2.1.3.1. Duración .....   | 10 |
| 2.1.3.2. Comportamiento estral .....  | 12 |
| 2.1.4. Endocrinología de la fase folicular .....  | 14 |
| 2.1.4.1. Estradiol .....  | 14 |
| 2.1.4.2. LH .....   | 16 |
| 2.1.4.3. FSH .....  | 21 |
| 2.1.5. Endocrinología de la fase luteal .....   | 23 |
| 2.1.5.1. Progesterona .....   | 23 |
| 2.1.5.2. Prostaglandinas .....  | 25 |
| 2.1.5.3. Oxitocina .....  | 26 |
| 2.2. DESARROLLO FOLICULAR EN PEQUEÑOS RUMIANTES   |    |
| 2.2.1. Duración y características morfológicas .....  | 28 |
| 2.2.2. Características funcionales .....  | 35 |
| 2.2.2.1. Receptores de LH .....   | 35 |
| 2.2.2.2. Niveles de estradiol y actividad aromatasa .....   | 36 |
| 2.2.2.3. Actividad de la IGF-I .....  | 37 |
| 2.2.2.4. Actividad de la FSH e inhibina .....   | 38 |
| 2.2.2.5. Factores de crecimiento .....  | 41 |
| 2.2.3. Atresia .....  | 43 |
| 2.2.3.1. Características .....  | 43 |
| 2.2.3.2. Relaciones endocrinas .....  | 48 |
| 2.2.4. Desarrollo folicular a lo largo del ciclo estral .....   | 49 |
| 2.2.4.1. Control endocrino del ciclo estral .....   | 49 |
| 2.2.4.2. Ondas de maduración folicular en el ciclo estral .....   | 54 |
| 2.2.4.3. Diferencias en el crecimiento folicular terminal<br>en razas de diferente prolificidad a lo largo del ciclo estral ..... | 57 |
| 2.2.5. Desarrollo folicular durante el anoestro .....   | 61 |
| 3. MATERIAL Y MÉTODOS .....   | 64 |
| 3.1. CARACTERIZACIÓN DEL CICLO SEXUAL   |    |
| 3.1.1. Animales .....   | 65 |
| 3.1.2. Sincronización de celos .....  | 65 |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.1.3. Extracción de sangre . . . . .                                  | 66        |
| 3.1.4. Determinaciones hormonales . . . . .                            | 66        |
| 3.1.5. Detección de celos . . . . .                                    | 68        |
| 3.1.6. Observación laparoscópica . . . . .                             | 69        |
| 3.1.7. Análisis estadístico . . . . .                                  | 72        |
| <b>3.2. DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD FOLICULAR</b>                      |           |
| 3.2.1. Animales . . . . .  | 73        |
| 3.2.2. Sincronización de celos . . . . .                               | 73        |
| 3.2.3. Detección de celos . . . . .                                    | 74        |
| 3.2.4. Ovariectomías . . . . .   | 74        |
| 3.2.5. Preparación histológica . . . . .                               | 76        |
| 3.2.5.1. Disección folicular . . . . .                                 | 76        |
| 3.2.5.2. Técnicas histológicas empleadas . . . . .                     | 77        |
| 3.2.5.3. Valoración de los folículos . . . . .                         | 77        |
| 3.2.6. Análisis estadístico . . . . .                                  | 78        |
| <b>3.3. CULTIVOS CELULARES</b>   |           |
| 3.3.1. Animales . . . . .  | 79        |
| 3.3.2. Recogida de ovarios . . . . .                                   | 80        |
| 3.3.3. Disección folicular . . . . .                                   | 81        |
| 3.3.4. Valoración folicular . . . . .                                  | 81        |
| 3.3.5. Obtención de células y recuento celular . . . . .               | 82        |
| 3.3.6. Cultivo y tratamientos . . . . .                                | 83        |
| 3.3.7. Determinación de la capacidad esteroideogénica . . . . .        | 84        |
| 3.3.8. Determinación de la capacidad proliferativa . . . . .           | 85        |
| 3.3.9. Materiales de la sala de cultivos celulares . . . . .           | 86        |
| 3.3.10. Análisis estadístico . . . . .                                 | 86        |
| <b>4. RESULTADOS . . . . .</b>   | <b>87</b> |
| <b>4.1. CARACTERIZACIÓN DEL CICLO ESTRAL</b>                           |           |
| 4.1.1. Estro . . . . .   | 88        |
| 4.1.1.1. Comportamiento estral . . . . .                               | 88        |
| 4.1.1.2. Intervalos fisiológicos . . . . .                             | 98        |
| 4.1.2. Tasa de ovulación . . . . .                                     | 102       |
| 4.1.3. Longitud del ciclo estral . . . . .                             | 103       |
| 4.1.4. Niveles plasmáticos de LH . . . . .                             | 109       |
| 4.1.5. Niveles plasmáticos de progesterona . . . . .                   | 118       |
| 4.1.6. Relaciones entre niveles hormonales, celo y ovulación . . . . . | 125       |

|   |            |
|---|------------|
| <b>4.2. DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD FOLICULAR</b>   |            |
| 4.2.1. Población folicular a lo largo de la fase folicular . . . . .                                | 127        |
| 4.2.2. Calidad folicular a lo largo de la fase folicular . . . . .                                  | 129        |
| 4.2.3. Calidad folicular en función de la talla folicular . . . . .                                 | 135        |
| <b>4.3. CULTIVOS CELULARES</b>  |            |
| 4.3.1. Proliferación de las células de granulosa . . . . .  | 145        |
| 4.3.2. Capacidad esteroidogénica de las células de granulosa . . . . .                              | 148        |
| <b>5. DISCUSIÓN . . . . .</b>   | <b>149</b> |
| <b>5.1. CARACTERIZACIÓN DEL CICLO</b>   |            |
| 5.1.1. Estro . . . . .  | 150        |
| 5.1.1.1. Comportamiento estral . . . . .  | 150        |
| 5.1.1.2. Intervalos . . . . .   | 152        |
| 5.1.2. Tasa de ovulación . . . . .  | 155        |
| 5.1.3. Longitud del ciclo estral . . . . .  | 155        |
| 5.1.4. LH . . . . .   | 156        |
| 5.1.5. Progesterona . . . . .   | 160        |
| <b>5.2. CALIDAD FOLICULAR</b>   |            |
| 5.2.1. Población folicular a lo largo de la fase folicular . . . . .                                | 165        |
| 5.2.2. Calidad folicular a lo largo de la fase folicular . . . . .                                  | 168        |
| 5.2.3. Calidad folicular en las diferentes tallas a lo<br>largo de la fase folicular . . . . .      | 170        |
| <b>5.3. CULTIVOS CELULARES</b>  |            |
| 5.3.1. Capacidad proliferativa y diferenciadora de las células<br>de granulosa en cultivo . . . . . | 174        |
| <b>5.4. SUGERENCIAS . . . . .</b>   |            |
| <b>177</b>  |            |
| <b>6. CONCLUSIONES . . . . .</b>  | <b>178</b> |
| <b>7. RESUMEN . . . . .</b>   | <b>182</b> |
| <b>8. BIBLIOGRAFÍA . . . . .</b>  | <b>185</b> |

# 1. INTRODUCCIÓN

El archipiélago canario se encuentra situado en el océano Atlántico frente a la costa noroccidental de Africa, entre los 27° 37' y 29° 37' de latitud N, y entre los 13° 20' y 18° 16' de longitud W. Está constituido por 7 grandes islas, 4 islas menores y 2 islotes, con una superficie total de 7542 km<sup>2</sup>. El clima de las Islas Canarias viene determinado por la influencia conjunta de varios factores, como su latitud geográfica y las características de sus vientos. Los vientos más importantes que afectan a Canarias son los alisios del NE que crean en las mismas un ambiente fresco y húmedo, sobre todo entre 400 y 1200 metros. Por encima de los 1500 metros y por debajo de los 400 predominan otros vientos más secos y calientes que los alisios. La t<sup>a</sup> media anual de las islas ronda los 21.1 °C y la precipitación presenta una tasa media de 290 mm/año, si bien las lluvias son más abundantes en las islas occidentales y van disminuyendo conforme se acerca la costa africana (Baéz y Sánchez, 1983).

A partir de las crónicas sobre la conquista de Canarias, se deduce que los primitivos habitantes de las Islas Canarias, denominados *guanches*, presentaban un sistema económico de subsistencia basado casi exclusivamente en las actividades agrícolas y ganaderas, teniendo menor importancia la pesca. El ganado (cabras y ovejas) constituía la principal riqueza de este bravo y noble pueblo, pues era una fuente de carne, leche, queso, vestimenta, calzado, abrigo, etc., así como era partícipe de diferentes rituales tanto religiosos como lúdicos (Torriani, 1978; Le Canarien, 1980; Meco, 1992).

El estudio osteológico y osteométrico de los restos arqueológicos de las primitivas ovejas permiten sugerir la posible conexión de la oveja paleocanaria con la de Tassili. Hace unos 4000 años, durante la máxima rigidez del período árido postneolítico del norte de Africa, los pueblos paleobereberes alcanzarían las costas atlánticas y las islas Canarias en busca de agua para sus ganados de los que dependían (Meco, 1992).

Las primeras descripciones europeas sobre el modo de vivir de los *guanches*, se encuentran asociadas a la Conquista de las islas y hablan repetidamente de la existencia de cabras y ovejas en todas las islas. Según estas crónicas y el estudio osteológico de los restos óseos, la paleooveja canaria era de talla grande, las hembras aceratas, piel con pelo, probablemente muy grasientas y de color blanco, y cola corta. Asimismo, eran animales habituados a la escasez de alimentos y de agua (Meco, 1992).

Tras la conquista de las islas, y a consecuencia de la llegada de colonizadores, que traían su propio ganado de diferentes zonas de España y Europa, tanto las cabras como las ovejas fueron sufriendo numerosos cruces, que terminaron por configurar la actual oveja de la raza canaria.

Desde el siglo XVI hasta el siglo XIX, el número de animales de las especies ovina y caprina fue aumentando progresivamente, estando presentes en un porcentaje similar; sin embargo, a principios del siglo XX comenzó un descenso en el número de cabezas ovinas que ha tenido continuidad hasta el momento actual, viniendo a situarse el total de ovejas en algo más de 30000 en toda Canarias, concentrándose fundamentalmente en la isla de Gran Canaria. El rendimiento básico obtenido de las ovejas es la leche, destinada a la producción artesanal del queso (Clavijo, 1990).

El manejo sometido a la raza ovina canaria gira en torno a la reproducción, que condiciona el manejo general de la explotación y caracteriza su sistema de producción.

Los distintos mecanismos endocrinológicos que determinan las actividades del sistema reproductivo, comienzan a presentarse de una manera rítmica una vez que la oveja alcanza la pubertad. Este mecanismo endocrinológico implica cambios cíclicos en el desarrollo folicular, modificaciones morfológicas en todo el sistema reproductivo, así como en el

comportamiento de la hembra. Esta ciclicidad se puede encontrar interrumpida de manera natural (gestación y anoestro estacional), artificial (tratamientos hormonales de control del ciclo) o patológica.

Los cambios morfológicos vienen regulados por un gobierno hormonal donde la progesterona, el estradiol y la LH, constituyen las principales hormonas de cuya compleja interacción, resultan los diferentes procesos que tienen lugar a lo largo de la vida reproductiva del animal.

La ovulación viene precedida de un proceso de maduración folicular. Sólo hay un momento ovulatorio a lo largo de todo el ciclo sexual; no obstante, son varias ondas de maduración folicular las que acontecen a lo largo del mismo. El crecimiento folicular terminal acontece en muy pocos días donde los pequeños folículos antrales (0.5-1.0 mm. de diámetro) comienzan a crecer más rápidamente, sufriendo la mayoría atresia y el resto alcanzarán un estado ovulatorio, con una serie de caracteres morfológicos y funcionales que han ido adquiriendo a lo largo del proceso de maduración folicular. Sólo la onda de maduración que se desarrolla fuera de la influencia luteal, concluye en ovulación, mientras que los procesos de maduración folicular terminal, coincidentes con la presencia luteal, no concluyen en ovulación.

Es necesario caracterizar el ciclo sexual y el crecimiento folicular terminal, para llegar a conocer la fisiología reproductiva de la hembra, para poder aplicar todas aquellas tecnologías reproductivas que permiten una racionalización de la producción animal. En la oveja canaria, no se han realizado estudios rigurosos para determinar su fisiología reproductiva, y nunca se ha realizado de manera estricta un adecuado manejo reproductivo.

Los objetivos del presente trabajo en la oveja de la raza Canaria son:

1. Establecer un modelo de las pautas de comportamiento en relación con el celo.
2. Determinar los principales caracteres y niveles hormonales del ciclo estral:
  - duración del celo
  - duración y magnitud de la onda preovulatoria de LH
  - evolución de los niveles de progesterona a lo largo del ciclo
  - relaciones entre la onda de LH, niveles de progesterona, celo y ovulación
  - duración del ciclo estral
3. Valorar el grado y profundidad de atresia folicular ovárica en relación con el tamaño folicular y con el momento de la fase folicular del ciclo estral.
4. Conocer la capacidad proliferativa y la funcionalidad esteroidogénica de las células de granulosa ovárica obtenidas durante la fase folicular y su relación con el tamaño folicular.

## **2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

## 2.1. CICLO SEXUAL OVINO

### 2.1.1. INTRODUCCIÓN

La oveja, en el ámbito reproductivo, se define como un animal poliéstrico estacional, es decir, presenta una época de actividad reproductiva caracterizada por la aparición de unos ciclos sucesivos de 15-18 días, y un período de reposo sexual, denominado anoestro estacional, variable en función de la raza.

La estacionalidad reproductiva varía entre valores de 80-90 días para la Raza Aragonesa, 90-100 días para las razas Pelibuey y Pre-Alpes, 165 días para la raza Finesa, 181 días para la raza Merino, hasta valores de 218 días para la raza Scottish Blackface y 225 días para la raza Suffolk (Thimonier and Mauléon, 1969; Wheeler and Land, 1977; Forcada *et al.*, 1992; González *et al.*, 1992).

En la presente revisión, trataremos los fundamentos del ciclo estral, así como del mecanismo endocrino en época reproductiva.

### 2.1.2. CICLO ESTRAL: DURACIÓN Y FASES

De manera general, los ciclos estrales se clasifican en función de su longitud como simples o múltiples. Dentro de los simples, distinguimos ciclos cortos (inferiores a 14 días), normales (entre 14 y 19 días) y largos (entre 20 y 26 días). Los ciclos múltiples se pueden dividir en dobles, triples o cuádruples, tomando como referencia la longitud de un ciclo simple normal (Kassem *et al.*, 1990).

Las ovejas Karakul presentan un 92.6% de ciclos simples, de los cuales un 12.85% son ciclos cortos, 11-15 días, un 76.9% son ciclos normales, 16-18 días, y un 10.14% son ciclos largos, 19-22 días, (Farid and Makarechiam, 1987). Hare and Bryant (1982) obtienen que en ovejas Suffolk x Greyface, el 94% de los ciclos son simples y un 6% es múltiple (> 26 días).

La duración media del ciclo estral en la mayoría de las razas ovinas se encuentra entre 15 y 17 días (Zarco *et al.*, 1988; Reddy *et al.*, 1989), estimándose normal cualquier duración entre 14 y 19 días, hecho presente en más del 80% de todas las razas ovinas estudiadas (Goodman, 1988; Zarco *et al.*, 1988).

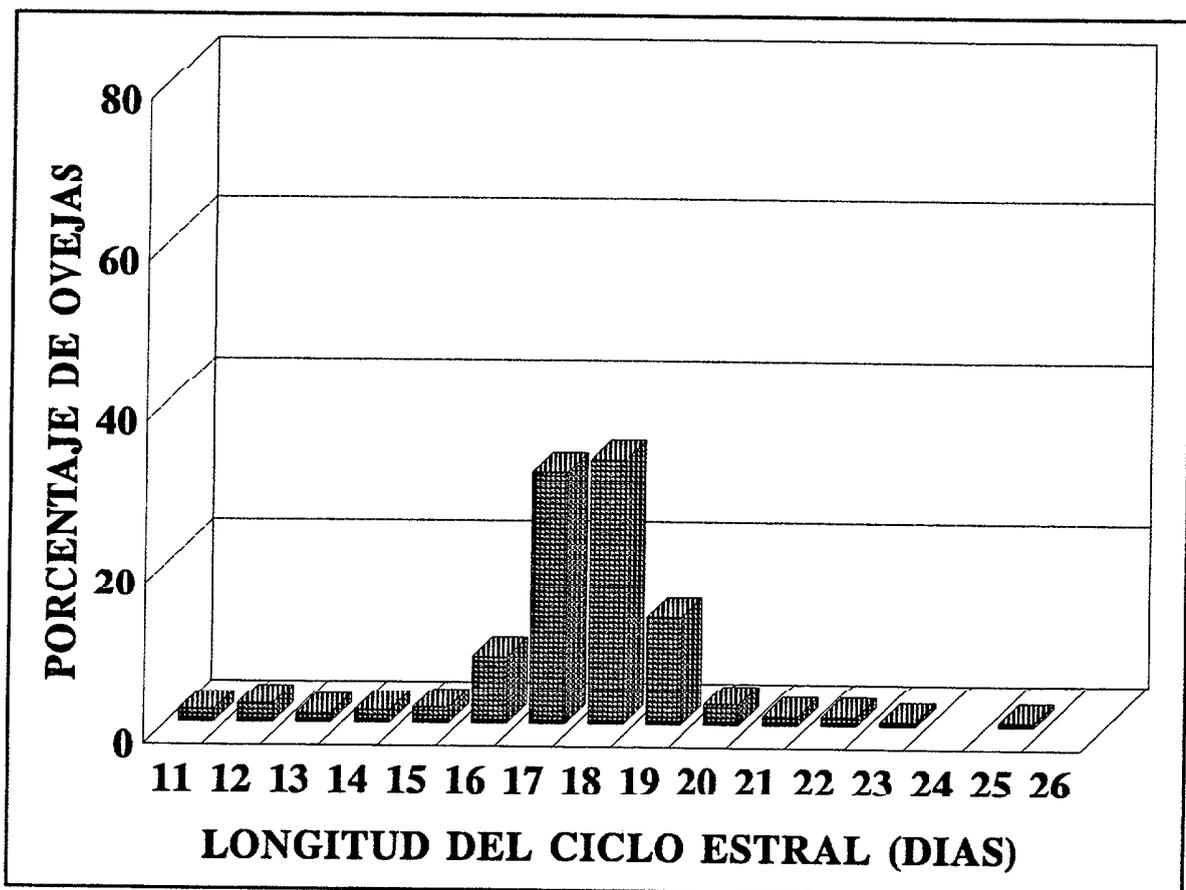


Figura 2.1. Frecuencia de ciclos estrales simples en función de su duración (Kassem *et al.*, 1990)

En diferentes razas tropicales se ha observado que la duración media del ciclo oscila entre 16.4 y 18.6 días (Yenikoye *et al.*, 1981; Carles and Kipnegno, 1986; Farid and Makarechian, 1987).

La edad del animal no parece guardar relación con la longitud del ciclo estral, ni sobre el porcentaje de ciclos cortos, normales o largos (Farid and Makarechian, 1987; Kassem *et al.*, 1990).

La presencia continuada de machos con las hembras durante la estación reproductiva se traduce en un ligero acortamiento de la longitud de los ciclos, comparando con la longitud de los ciclos obtenidos por tratamiento mediante efecto macho (Flechter and Lindsay, 1971).

Al comienzo de la estación reproductiva, la 1ª ovulación no suele acompañarse de comportamiento estral (Wheeler and Land, 1977). Hacia el final de la estación sexual, el celo no aparece tras la luteolisis (Wheeler and Land, 1977) porque las concentraciones de estradiol caen considerablemente (Legan *et al.*, 1985).

El porcentaje de ovulaciones silenciosas en la oveja es muy elevado durante el período previo a la reactivación de la actividad sexual. En ovejas Finnish Landrace x Awassi, un 50% de los animales presentan ovulaciones silenciosas hacia la mitad del anoestro (frente a un 50% de animales sin indicios de actividad cíclica) y se incrementa hasta un 90% de ovulaciones silenciosas justo antes de la reanudación de la actividad cíclica normal (Amir *et al.*, 1984).

Tanto al comienzo como al final de la estación reproductiva, las ovejas de la raza Finnish Landrace presentan un mayor porcentaje de actividad cíclica normal que las ovejas

Scottish Blackface, es decir, las ovejas Finnish Landrace muestran un menor número de ovulaciones silenciosas que las ovejas de menor tasa de ovulación (Wheeler and Land, 1977).

La duración del ciclo estral se puede determinar como el período comprendido entre dos picos de LH sucesivos (Oyedipe *et al.*, 1986), o bien entre la aparición de dos celos seguidos, tomando como referencia el inicio o el final del celo, (Farid and Makarechiam, 1987; Kassem *et al.*, 1990). También se puede determinar como el período comprendido entre dos ovulaciones sucesivas y menos frecuentemente se toman en cuenta las variaciones en los niveles plasmáticos de progesterona y/o estrógenos (Oyedipe *et al.*, 1989; Mukasa *et al.*, 1990).

### **2.1.3. ESTRO: DURACIÓN Y COMPORTAMIENTO ESTRAL**

#### **2.1.3.1. Duración**

El intervalo entre la luteolisis y el inicio del celo varía mucho entre las diferentes razas ovinas. Así en las ovejas Scottish Blackface es de unas  $36.2 \pm 2.33$  horas (Rhind and McNeilly, 1986), en ovejas Coopworth es de unas  $40.4 \pm 3.22$  horas (Schackell, 1991), mientras en las ovejas de la raza Yankasa se sitúa sobre las  $44.5 \pm 4.5$  horas (Oyedipe *et al.*, 1989).

La edad del animal tiene influencia sobre el momento de aparición del celo. En la raza Galway, el intervalo entre la luteolisis y la aparición del celo es de unas 31 horas en ovejas adultas y de unas 36.9 horas en corderas (Quirke *et al.*, 1981).

La duración del estro oscila entre 24-48 horas, aunque existen variaciones considerables en función de la raza, edad y manejo del macho (Goodman, 1988).

La duración media del celo es de  $25.0 \pm 1.9$  horas en ovejas Yankasa (Oyedipe *et al.*, 1989), y de unas 27 horas en ovejas Galway (Quirke *et al.*, 1981).

Niveles superiores de duración de celo, aparecen en razas tipo Awassi (34.7 h; Kassem *et al.*, 1990) o en ovejas Coopworth (40.4 h.; Schackell, 1991).

La mayor duración del comportamiento sexual se presenta en razas del tipo Finnish Landrace seleccionadas para alta tasa de ovulación, con una duración media de 53.6 horas (Adams *et al.*, 1988).

Por tanto, la duración del celo esta correlacionada positivamente con la tasa de ovulación en la especie ovina (Adams *et al.*, 1988). La duración del comportamiento sexual en ovejas prolíficas tipo Romanov (Bindon *et al.*, 1979), D'Man (Lahlou-Kassi and Marie, 1985) y Finnish Landrace (Adams *et al.*, 1998) es de 10 a 20 horas más largo que la longitud del celo en razas menos prolíficas.

La duración del celo en corderas de la raza Galway es ligeramente superior a las adultas (31.8 vs 27.0; Quirke *et al.*, 1981). Sin embargo, Loftsson and Dyrmondsson (1990) obtienen que en corderas de la raza nativa de Islandia la duración del celo es notablemente inferior al de las ovejas adultas (31.4 vs 46.7 horas).

La introducción de un macho con las hembras, tras un período prolongado de separación acelera la reactividad cíclica; en este caso, el celo es más corto independientemente de que exista o no copulación (Fletcher and Lindsay, 1971). La presencia continua del macho con la hembra provoca que la duración del celo sea menor que cuando se encuentran en contacto intermitente, p.e. cada 4 horas (Parsons and Hunter, 1967).

Existen diferencias en la longitud del celo según se trate de un ciclo natural o uno sincronizado. En ovejas Awassi, la duración media del celo para un ciclo natural es ligeramente inferior a la longitud del celo para un ciclo sincronizado mediante esponjas intravaginales de MPA (34.7 vs 40.0; Kassem *et al.*, 1990). Sin embargo, en ovejas nativas de Islandia, no se observan diferencias entre celo natural y celo consecutivo a una sincronización mediante esponjas intravaginales de acetato de medroxiprogesterona (46.8 vs 46.95; Loftsson and Dyrmondson, 1990).

El tratamiento de sincronización empleado influye sobre la aparición y duración del celo. En ovejas Coopworth, la utilización de esponjas intravaginales de acetato de fluorogestona y de implantes subcutáneos liberadores de progesterona se traducen en una aparición del celo a las 40.4 y 29.6 horas respectivamente (Shackell, 1991), no habiendo diferencias significativas en cuanto a la duración de los celos.

En ovejas Scottish Blackface, la aplicación de prostaglandinas en la fase luteal del ciclo, provoca la aparición del celo a las 33.7 y 36.2 horas en ovejas de baja y alta condición corporal respectivamente (Rhind and McNeilly, 1986).

### 2.1.3.2. Comportamiento estral

De modo general, el celo se define en la oveja como la tendencia a permanecer inmóvil cuando el macho realiza intentos de monta (Tomkins *et al.*, 1974; Adams *et al.*, 1988). Según Baril *et al.* (1993), durante el celo, la hembra es sensible al olor del macho y responde al cortejo con la postura de inmovilidad.

En otras ocasiones, al aspecto anterior se le suman otros signos típicos de celo como agitar la cola y búsqueda del macho (Bland and Jubilan, 1987; Baril *et al.*, 1993). Estos

signos pueden aparecer y desaparecer progresivamente al principio y al final del celo, respectivamente (Baril *et al.*, 1993).

Se considera que la oveja no se encuentra en celo, cuando evita cualquier aproximación del macho, mediante movimientos circulares en torno a sí misma o al macho, o adoptando posturas de micción (Bland and Jubilan, 1987; Blissit *et al.*, 1994).

Tanto al principio como al final del celo, existe un período de transición, que consiste en que la oveja no impide el acercamiento del macho y el olfateo de su vulva, pero la receptividad de la hembra no es suficiente como para permitir la cubrición (Bland and Jubilan, 1987).

Tanto durante el período de receptividad sexual como durante su ausencia, existe una estrecha relación entre la frecuencia de micción de la oveja y el *flehmen* del macho en respuesta a la orina de la oveja (Bland and Jubilan, 1987).

Durante el celo, la frecuencia del *flehmen* es menor debido a que queda desplazado por otros signos que dan una clara y neta información del estado reproductivo de la oveja, fundamentalmente permitiendo los avances del macho. El macho no precisa del *flehmen* para confirmar el estado reproductivo de la oveja, el reflejo de inmovilidad de la oveja es suficientemente indicativo (Bland and Jubilan, 1987; Baril *et al.*, 1993).

Durante el período de ausencia de receptividad sexual, la hembra dificulta la aproximación del macho para olfatear su vulva. La hembra orina o adquiere la postura de orinar; esta actitud, junto con la información transmitida en la orina eliminada, será suficiente para que el macho mediante el *flehmen* determine que el estado de la oveja no es el apropiado para la cubrición (Bland and Jubilan, 1987; Blissit *et al.*, 1994).

La vulva parece ser la fuente más concentrada de feromonas; la orina al ser eliminada adquiere parte de esas feromonas. La duración del *flehmen* en respuesta al olfateo de la vulva es menor que en respuesta al olfateo de la orina; la duración del *flehmen* estaría inversamente relacionado con la cantidad de estímulo feromonal presente (Bland and Jubilan, 1987).

### **2.1.4. ENDOCRINOLOGIA DE LA FASE FOLICULAR**

#### **2.1.4.1. Estradiol**

El inicio de la fase folicular es coincidente con la lisis del cuerpo lúteo, se produce una reducción de los niveles de progesterona y la desaparición del efecto de feed-back negativo sobre la secreción de LH (Goodman, 1988), seguido de un incremento lento pero sostenido en las concentraciones de LH, que culminarán en la onda preovulatoria de LH (Rawlings and Cook, 1993).

Durante la fase luteal tardía, la secreción de estradiol es netamente basal, situándose por debajo de 1 ng/ml (Campbell *et al.*, 1990). Una vez que se produce la luteolisis, y la consiguiente caída de la progesterona, se produce un incremento progresivo del estradiol (Campbell *et al.*, 1990) que se traduce en un pequeño pico en la fase folicular temprana.

Consecutivo a este pico, la secreción de estradiol continúa incrementándose hasta el momento de la onda preovulatoria de LH (Campbell *et al.*, 1990; Davies and Beck, 1993), donde alcanza sus valores máximos entre 5 y 10 veces por encima de los niveles basales (Campbell *et al.*, 1990; Davies and Beck, 1993; Rawlings and Cook, 1993).

Alrededor de 4 horas después del inicio de la onda de LH, la secreción de estradiol comienza a disminuir rápidamente, alcanzando niveles basales alrededor de 16 horas después del pico máximo de LH (Campbell *et al.*, 1990).

En la regulación de la secreción de estradiol, existen tres hormonas con acciones claramente determinadas: LH, FSH y progesterona.

La secreción de estradiol previa a la ovulación parece encontrarse regulada por el incremento en la secreción episódica de LH que acontece tras la luteolisis (Karsch *et al.*, 1983; Campbell *et al.*, 1990). A lo largo de la fase folicular, las concentraciones de estradiol se incrementan de manera paralela a las de LH (Davies and Beck, 1993).

Una vez que se hayan alcanzado los máximos niveles de LH, finaliza la secreción de estradiol (Davies and Beck, 1993). La inhibición de la liberación de estradiol requiere altas concentraciones de esta gonadotropina (Martin *et al.*, 1987).

La FSH es requerida para la secreción de estradiol durante el ciclo ovino, pero su importancia es menor que la de la LH (McNeilly, 1985). Un incremento en la FSH, por sí solo, no produce un incremento en la secreción de estradiol (McNeilly *et al.*, 1984).

Es decir, en la oveja, tanto la LH como la FSH son requeridos para la secreción de estradiol, pero son los cambios en las concentraciones de LH, los principales determinantes de la secreción ovárica de estradiol (Goodman, 1988).

La progesterona puede modular la secreción del estradiol de manera directa o indirecta. Indirectamente, al inhibir la secreción tónica de LH (Baird and Scaramuzzi, 1976), directamente la progesterona modifica la respuesta del folículo a la LH. La administración

de LH a ovejas anoéstricas conjuntamente con concentraciones de progesterona típicas de fase luteal, genera un incremento de estradiol significativamente menor que el producido por la LH en la ausencia de progesterona (Goodman, 1988).

### 2.1.4.2. LH

La onda de LH representa una breve pero masiva salida de LH desde la pituitaria. Las concentraciones de LH aumentan rápidamente entre 4 y 8 horas hasta alcanzar un pico de 50-100 veces los niveles basales, para descender rápidamente a partir de entonces, así que la longitud de la onda es aproximadamente de unas 12 horas (Goodman, 1988).

La concentración plasmática que se alcanza en el pico de la onda preovulatoria presenta una amplia variabilidad. Rawlings and Cook (1993) obtienen que en el momento del pico de LH la concentración de esta hormona se encuentra alrededor de 40 ng/ml en ovejas Finnish Landrace x Rambouillet.

En ovejas Galway y Finnish Landrace, razas de diferente prolificidad, presentan una concentración similar de LH en el momento del pico, alrededor de 75 ng/ml (Adams *et al.*, 1988). Otros autores, obtienen valores en el pico de LH de 100-200 ng/ml (Goodman, 1988).

El inicio de la onda de LH está, por lo general, acoplado al inicio del comportamiento estral (Adams *et al.*, 1988). Las razas prolíficas tienen un mayor intervalo entre el inicio del celo y el pico de LH. La raza Finnish Landrace presenta una duración media de  $11.2 \pm 0.8$  horas (Adams *et al.*, 1988), mientras en razas de más baja tasa de ovulación disminuye este intervalo: Coopworth, 6.0 (Schackell, 1991); Galway,  $4.1 \pm 1.1$  (Adams *et al.*, 1988).

En corderas de la raza Galway, la duración del intervalo inicio del estro-pico de LH es significativamente menor que en ovejas adultas de la misma raza (3.8 vs 6.4; Quirke *et al.*, 1981).

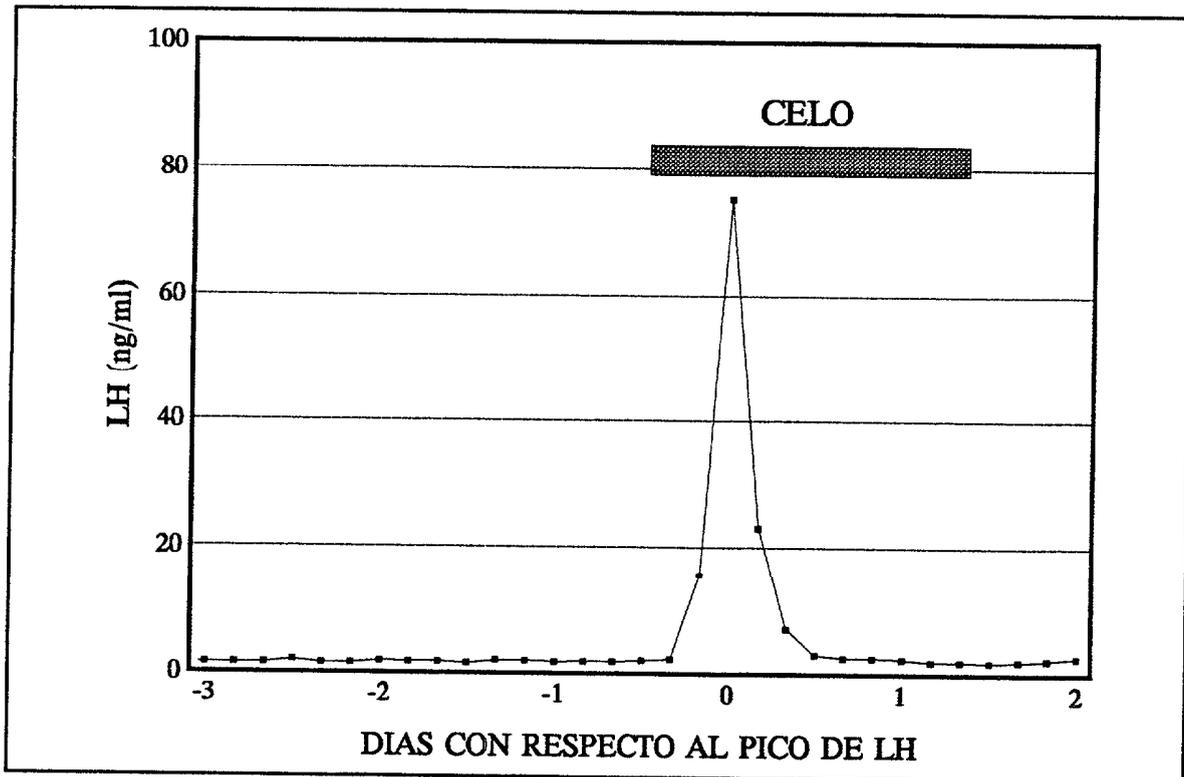


Figura 2.2. Relación entre celo y onda de LH en la oveja de la raza Galway (Adams *et al.*, 1988)

El intervalo entre la onda de LH y la ovulación, 22-26 horas, es relativamente constante (Goodman, 1988).

Los niveles tónicos de LH durante el ciclo están inversamente correlacionados con las concentraciones circulantes de progesterona (Wayne *et al.*, 1989). La secreción tónica de LH disminuye desde el día 0 al día 9 cuando las concentraciones de progesterona aumentan, permanece baja hasta el día 14, y luego se incrementa durante la fase folicular cuando los niveles de progesterona caen (Davies and Beck, 1993).

La frecuencia pulsátil de LH se incrementa progresivamente a lo largo de la fase folicular (Davies and Beck, 1993; Rawlings and Cook, 1993). Entre la fase luteal y la fase folicular, se produce un abrupto incremento en la frecuencia de los tonos pulsátiles de LH y una reducción de la amplitud de los mismos (Rawlings and Cook, 1993).

La alta frecuencia de los pulsos, una vez establecidos, continúa a un nivel constante a lo largo de toda la onda preovulatoria de LH (Rawlings and Cook, 1993). No obstante, Martin *et al.* (1987) sugieren que el incremento pulsátil de LH se produce justo antes de la onda preovulatoria de LH y tras la propia onda, pero no durante la misma.

La amplitud de los pulsos de LH se incrementa unas 25 veces durante la onda de LH (Martin and Thomas, 1985), pero no se encuentra correlacionado con los niveles medios de LH.

Quirke *et al.* (1981) no obtienen diferencias en el modelo de pulsos de LH, ni en la concentración final, entre ovejas adultas y corderas de la raza Galway; la única diferencia aparece en la longitud del intervalo entre la aparición del celo y el inicio del pico de LH. Sin embargo, en un estudio más reciente, se observa que en la raza Clun Forest, la concentración y la duración del pico de LH es menor en corderas que en adultas (Davies and Beck, 1993).

En aquellas ovejas con múltiples ovulaciones existe una mayor frecuencia pulsátil de LH en la fase luteal y una mayor amplitud de los pulsos de LH en la fase folicular, con respecto a ovejas con una sola ovulación (Rhind and McNeilly, 1986).

La condición corporal no tiene efecto sobre la concentración, frecuencia o amplitud pulsátil de la LH en la fase folicular, pero sí sobre la FSH y prolactina, que son inferiores en ovejas con peor condición corporal (Rhind and McNeilly, 1986).

En la regulación de la onda de LH, existen tres hormonas con acciones claramente definidas: estradiol, progesterona y GnRH.

La importancia del estradiol queda reflejado en que la administración de estradiol provoca ondas de LH en ~~ov~~ejas anoéstricas (Pant, 1977) u ovariectomizadas (Goodman, 1988).

La inducción de la onda de LH no requiere todo el aumento de estradiol preovulatorio; un incremento de 3-4 pg/ml de estradiol es suficiente para generar el inicio de la onda. Sin embargo, es necesario que los niveles de estradiol aumenten hasta 7-10 pg/ml para generar un pico de LH con la concentración similar a los observados durante el ciclo estral (Goodman, 1988).

La acción de la progesterona sobre la onda de LH es inhibitoria; la progesterona bloquea la capacidad del estradiol para inducir la onda de LH incrementando la dosis de estradiol requerido. Durante la fase folicular del ciclo, la caída de los niveles de progesterona elimina la acción de retroalimentación negativa sobre la acción del estradiol y se pone en marcha el mecanismo que culminará en la ovulación (Goodman, 1988).

La cantidad de LH liberada en respuesta a la GnRH exógena es máxima hacia el final de la fase folicular del ciclo estral (Hooley *et al.*, 1974).

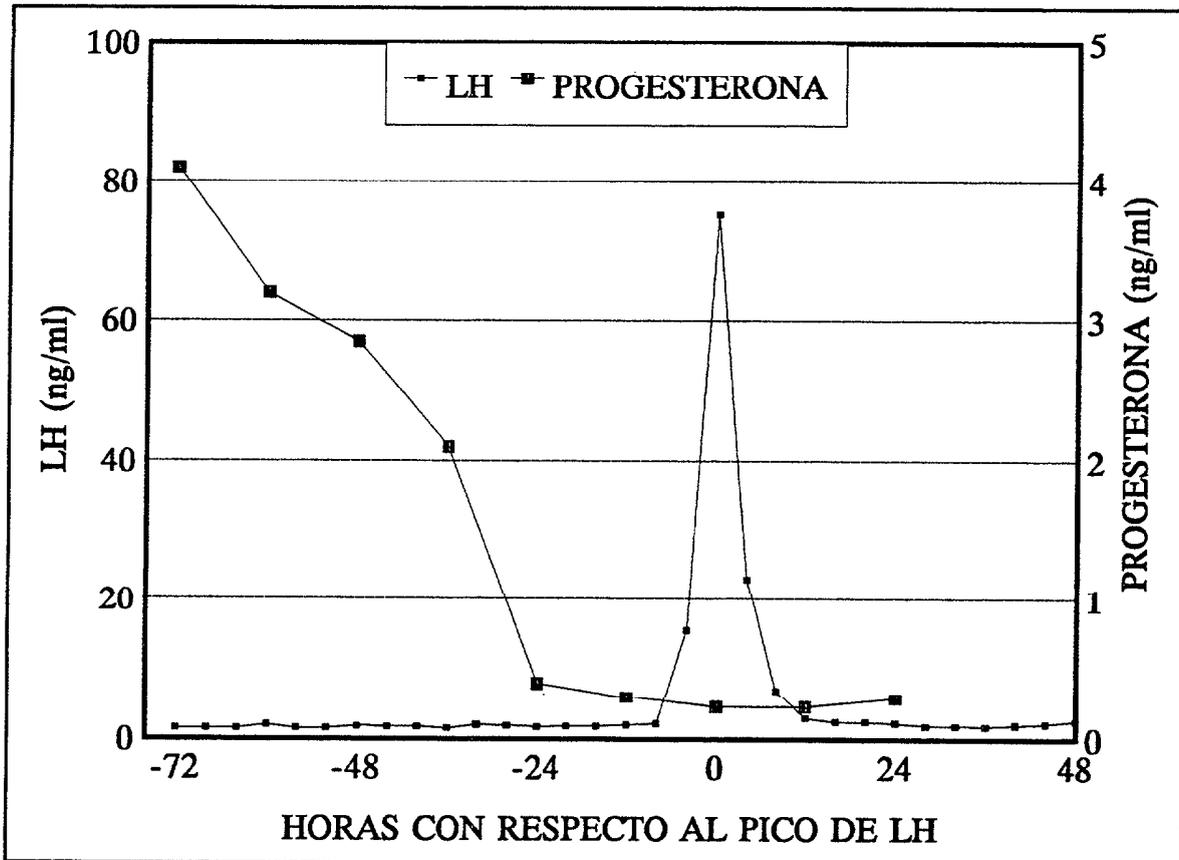


Figura 2.3. Niveles plasmáticos medios de LH y progesterona durante el período periovulatorio en ovejas Finnish Landrace (Adams *et al.*, 1988).

La secreción de GnRH parece estar incrementada durante la onda preovulatoria de LII y una vez que ésta finaliza (Clarke *et al.*, 1987). El incremento en la secreción de GnRH durante la onda de LH puede ser debido a un incremento en la frecuencia pulsátil y en la amplitud de GnRH, a un incremento en la secreción basal de GnRH, o bien a ambas (Clarke *et al.*, 1987).

Los amplios pulsos en la secreción de LH presentes durante la onda preovulatoria son un reflejo de una similar amplitud en la secreción pulsátil de GnRH (Rawlings and Cook, 1993).

2.1.4.3. FSH

Durante la fase folicular se produce un incremento en la concentración de FSH de manera coincidente al pico de LH (Goodman, 1988). Las razas de mayor prolificidad presentan unos niveles superiores tanto en la concentración de FSH en el pico de la onda, como en la concentración total de FSH a lo largo de toda la onda, con respecto a aquellas razas con una tasa de ovulación inferior (Cahill *et al.*, 1981). Sin embargo, otros autores no encuentran diferencias en los niveles de FSH entre razas de diferente prolificidad (Webb and England, 1982), e incluso Adams *et al.* (1988) obtienen que los niveles de FSH en el pico de la onda de FSH y la concentración total de FSH son superiores en ovejas de la raza Galway en comparación con ovejas de una prolificidad superior como son las Finnish Landrace.

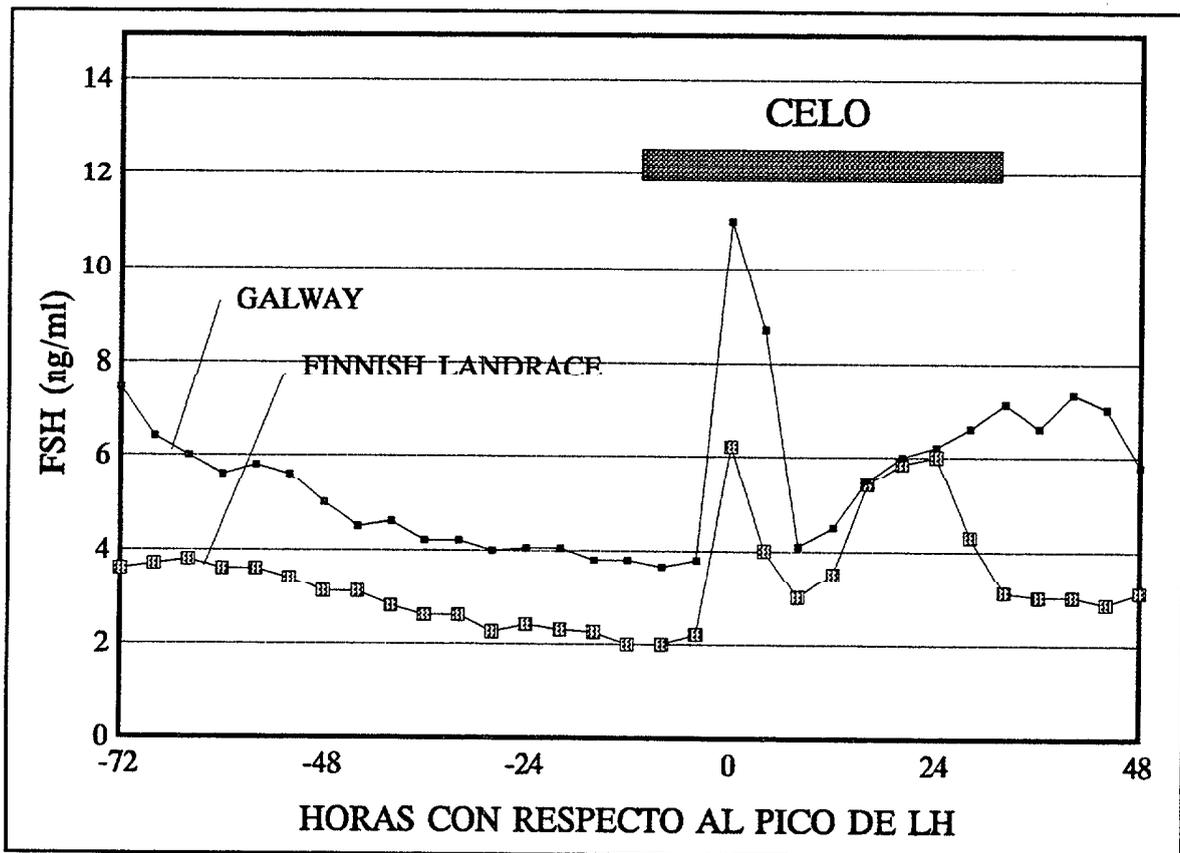


Figura 2.4. Concentraciones plasmáticas medias de FSH durante el período periovulatorio en ovejas Galway y Finnish Landrace (Adams *et al.*, 1988)

Alrededor de 24 horas (rango 12-48) tras el pico preovulatorio de LH, existe una segunda onda de FSH. Las razas de mayor prolificidad también presentan una concentración plasmática de FSH superior, a las razas de más baja tasa de ovulación (Cahill *et al.*, 1981).

La onda preovulatoria de FSH esta básicamente controlada por los mismos mecanismos que producen la onda de LH. Un aumento en la secreción de estradiol parece ser la señal ovárica que inicia la onda de FSH (Pant, 1977), y también requiere un estímulo de GnRH. Por otro lado, la progesterona bloquea la onda de FSH inducida por los estrógenos.

La 2ª onda de FSH parece estar controlada por mecanismos diferentes a los de la onda preovulatoria de FSH, puesto que es independiente de la secreción hipotalámica de GnRH (Goodman, 1988) y no se inicia por un incremento en la secreción de estradiol. Parece ser que la onda preovulatoria de LH puede iniciar esta segunda onda de FSH; el bloqueo de la onda de LH evita la aparición de la 2ª onda de FSH (Fraser and Mcneilly, 1982).

### 2.1.5. ENDOCRINOLOGIA DE LA FASE LUTEAL

#### 2.1.5.1. Progesterona

La fase luteal se caracteriza por niveles elevados de progesterona, una vez que el cuerpo lúteo se encuentra plenamente funcional.

Las concentraciones de progesterona muestran una fase de niveles basales, seguida de una fase de ascenso, que se continua con una fase de meseta. Posteriormente, viene una fase de descenso consecuencia de la luteolisis y da lugar a la fase folicular del ciclo consecutivo (Cahill *et al.*, 1981; Mukasa *et al.*, 1988; Reddy *et al.*, 1988).

Los niveles medios de progesterona valorados mediante radioinmunoensayo pasan desde niveles basales, por debajo de 0.5 ng/ml hasta niveles por encima de 4 ng/ml en plena fase luteal (Adams *et al.*, 1988).

La utilización de la técnica ELISA para determinar los niveles de progesterona, también ha resultado válida para determinar las distintas fases de la curva de progesterona a lo largo del ciclo estral. Mukasa *et al.* (1990) obtienen una fase de niveles basales desde 2 días antes del celo hasta 4 días tras el inicio del mismo con valores por debajo de 1.0 ng/ml, seguida por una fase de ascenso desde el día 5 hasta el día 9 con valores entre 1.5-4.7 ng/ml. Posteriormente se instaura una fase de meseta entre los días 10-14 con valores entre 5.0 y 5.6 ng/ml y por último una fase de caída muy rápida, de apenas dos días de duración hasta alcanzar de nuevo los niveles basales (Mukasa *et al.*, 1990).

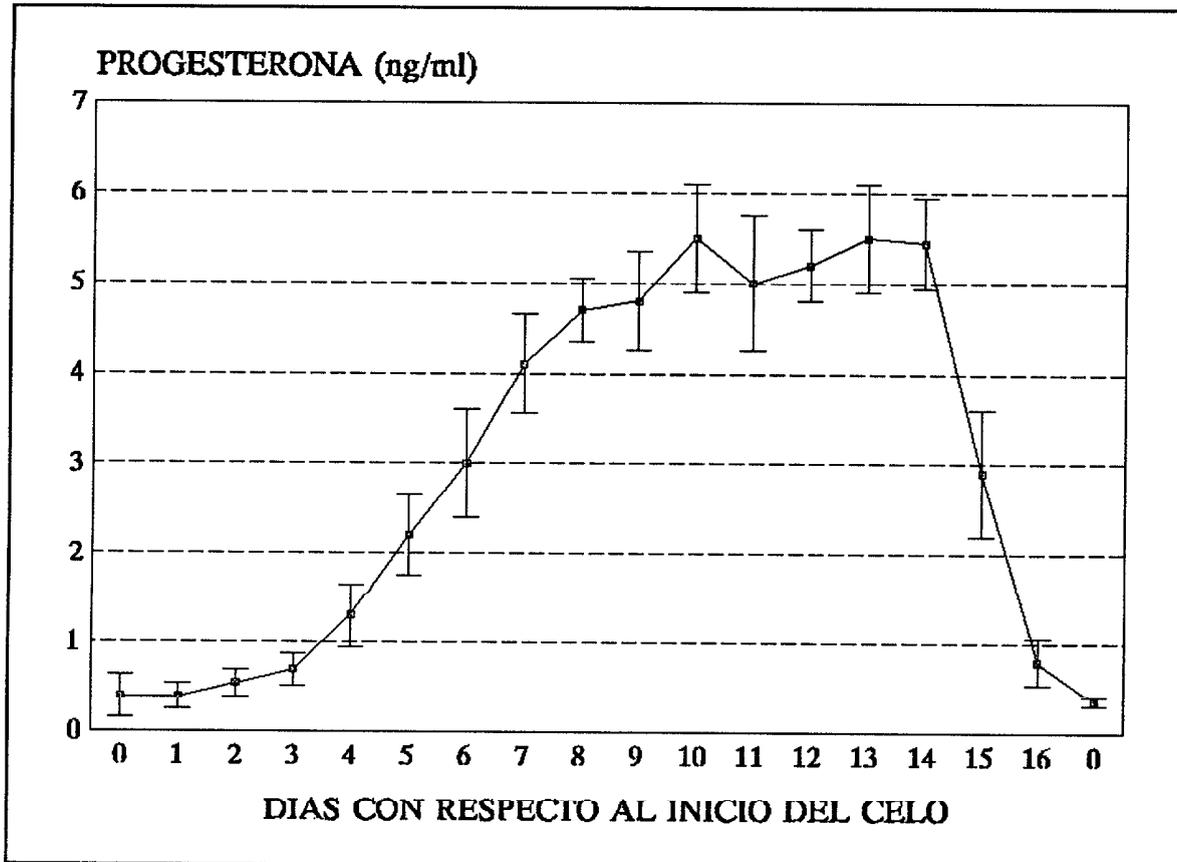


Figura 2.5. Concentraciones plasmáticas medias de progesterona durante el ciclo estral en ovejas Ethiopian Menz (Mukasa *et al.*, 1990)

Existe una correlación positiva entre el número de ovulaciones y la concentración de progesterona en la fase luteal del ciclo. Como consecuencia, los niveles de progesterona son superiores en las razas de mayor prolificidad en comparación con las de más baja tasa de ovulación (Adams *et al.*, 1988). La mayor secreción de progesterona durante la fase luteal en razas de elevada prolificidad parece tratarse más de una consecuencia que de una causa de la alta tasa de ovulación (Adams *et al.*, 1988).

La actividad funcional del cuerpo lúteo durante el ciclo estral ovino está controlado por factores luteotrópicos de la pituitaria y factores luteolíticos del útero (Goodman, 1988).

La LH es la hormona luteotrópica primaria en el ciclo estral ovino. La administración de LH incrementa de manera consistente la secreción de progesterona (Baird and McNeilly, 1981) y mantiene la función luteal en ovejas hipofisectomizadas. El incremento en la cantidad de LH prolonga la vida media del cuerpo lúteo en ovejas normales (Adams *et al.*, 1975) mientras las inyecciones de antisuero-LH causan una prematura regresión luteal.

La prolactina actúa de manera sinérgica con la LH, pero por sí sola no es capaz de mantener el cuerpo lúteo o la secreción de LH (Karsch *et al.*, 1983).

Las prostaglandinas originadas en el endometrio comienzan a aumentar sus niveles antes del descenso de la progesterona (Ottobre *et al.*, 1980) y alcanzan concentraciones suficientes para producir la luteolisis en escaso tiempo después.

### 2.1.5.2. Prostaglandinas

La secreción de  $\text{PGF-2}\alpha$  varía a lo largo del ciclo. Entre el día 2 y el día 10 del ciclo no existe liberación, o es muy escasa, de  $\text{PGF-2}\alpha$  desde el útero (Ottobre *et al.*, 1980). Los pulsos de  $\text{PGF-2}\alpha$  primero aparecen entre los días 11 y 13 del ciclo, y la frecuencia pulsátil se incrementa en los siguientes 2 a 3 días (Ottobre *et al.*, 1980).

Zarco *et al.* (1988) obtienen que los pulsos de  $\text{PGF-2}\alpha$  comienzan el día 12 del ciclo estral, y que entre los días 12-15 del ciclo estral el intervalo entre los pulsos de  $\text{PGF-2}\alpha$  es mayor que en el momento de la luteolisis. Estos cambios en la frecuencia pulsátil se reflejan en las concentraciones de  $\text{PGF-2}\alpha$  (Ottobre *et al.*, 1980) que se incrementan en la fase luteal tardía, presentando una meseta durante la fase folicular temprana, y luego se incrementa de nuevo hasta generar un pico, justo antes del celo.

En el control de la liberación de prostaglandinas, intervienen básicamente tres hormonas, el estradiol, la progesterona y la oxitocina (Goodman, 1988).

El estradiol induce la luteolisis mediante un incremento en la liberación de PGF-2 $\alpha$ , sin embargo, el estradiol precisa de la presencia de progesterona para estimular la liberación de PGF-2 $\alpha$  (Vallet and Lamming, 1991). Las concentraciones plasmáticas incrementadas de estradiol favorecen una respuesta mayor y más temprana de la PGF-2 $\alpha$  a la oxitocina en ovejas ovariectomizadas tratadas con hormonas esteroideas. Además, la magnitud de la respuesta inducida por la oxitocina esta positivamente correlacionada con las concentraciones de receptores uterinos de oxitocina (Beard and Lamming, 1994).

Durante un ciclo normal, el estradiol estimula el mecanismo luteolítico, asegurando que el útero responda a la oxitocina mediante un incremento en la secreción de las prostaglandinas (Vallet *et al.*, 1990; Beard *et al.*, 1994)

### 2.1.5.3. Oxitocina

La oxitocina es liberada por el cuerpo lúteo hacia el final de la fase luteal tardía, las concentraciones de oxitocina en la vena útero-ovárica son netamente superiores a los niveles arteriales, indicando que el cuerpo lúteo es la fuente de los picos pulsátiles de oxitocina que ocurren durante la luteolisis (Flint and Sheldrick, 1983; Moore *et al.*, 1986). Además, la concentración de oxitocina en la fase luteal esta correlacionada positivamente con el número de cuerpos lúteos presentes (Schams *et al.*, 1983) y la concentración plasmática de oxitocina se puede reducir induciendo la luteolisis (Flint and Sheldrick, 1983). Como en el cuerpo lúteo de la fase luteal tardía predomina la población de células grandes, éstas son las responsables de la producción de oxitocina.

Durante los primeros días de la fase luteal, la cantidad de oxitocina producida es mínima. Wathes *et al.* (1992) obtienen que la capacidad *in vitro* de las células luteales de dos días para producir oxitocina esta marcadamente reducida en comparación con los niveles obtenidos en la fase luteal tardía. Por tanto, el cuerpo lúteo joven integrado por células pequeñas tendría escasa capacidad de producir oxitocina.

La oxitocina de origen luteal parece estimular la liberación de PGF-2 $\alpha$  endometrial a través de los receptores presentes en el propio endometrio. Esto se basa en experiencias donde la inmunización contra la oxitocina prolonga la fase luteal (Schams *et al.*, 1983). Por otro lado, Ott *et al.* (1993) sugieren que la progesterona inhibe la formación de receptores de oxitocina mediante la reducción del número de receptores del estradiol presentes en el útero, por lo que previenen la estimulación estrogénica de los receptores a la oxitocina.

En la fase luteal, la inhibición por progesterona es el mecanismo que asegura bajas concentraciones de receptores endometriales de oxitocina y estradiol. Hacia el final de la fase luteal, la progesterona pierde su influencia inhibitoria y el estradiol se fija a receptores activados a nivel uterino y estimula el desarrollo de receptores a oxitocina. Las altas concentraciones de estradiol son más efectivas que las bajas y pueden promover un incremento más temprano en las concentraciones de receptores de oxitocina (Beard and Lamming, 1994).

Por otro lado, se ha comprobado la existencia de un sistema de retroalimentación positivo, en el que la liberación de prostaglandina favorecería la síntesis de oxitocina de origen luteal y ésta a su vez la síntesis de prostaglandina hasta el momento de la luteolisis (Flink and Sheldrick, 1983). Moore *et al.* (1986) obtiene que los niveles de PGF-2 $\alpha$  se incrementan antes que la oxitocina, indicando que un aumento en la oxitocina plasmática no inicia la liberación pulsátil de PGF-2 $\alpha$ .

## 2.2. DESARROLLO FOLICULAR EN PEQUEÑOS RUMIANTES

### 2.2.1. DURACIÓN Y CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

El ovario de la oveja contiene una amplia población de folículos primordiales y un pequeño número de folículos en diferentes estados de desarrollo (Cahill *et al.*, 1979). En el ovario de la oveja podemos encontrar varias decenas de miles de folículos primordiales, varios cientos de folículos en crecimiento y unas decenas visibles en la superficie ovárica (Espinosa, 1970). A lo largo de toda la vida reproductiva de la hembra, algunos de estos folículos van abandonando el estado de vida latente que supone su permanencia como folículo primordial, para ir complicando su estructura y adquiriendo mayor tamaño y capacidad funcional, pasando por diferentes fases antes de ovular.

Un folículo primordial consiste de un oocito diplotene y células somáticas asociadas rodeándolo con una lámina basal. Los primeros folículos se forman alrededor del día 70 de gestación en la oveja (Mauléon, 1961); el oocito y las células foliculares proliferantes contribuyen al crecimiento del folículo. La actividad proliferativa de las células foliculares se incrementa con el tamaño del oocito (Pedersen, 1970). Conforme va aumentando el tamaño del folículo, disminuye el tiempo de duplicación de las células foliculares (Mariana and de Pol, 1986); en folículos primordiales la actividad proliferativa de las células foliculares se incrementa con el tamaño del oocito, mientras que durante el crecimiento final, el crecimiento del oocito es lento en comparación con el crecimiento del folículo.

Las células de granulosa ejercen importantes acciones sobre el crecimiento del oocito y la maduración a lo largo del desarrollo folicular. Thibault *et al.* (1987), trabajando en ovino, bovino y porcino, confirmaron que las células de granulosa son absolutamente necesarias para la adquisición de competencia citoplasmática en el estado final de la

maduración del oocito. Parece ser que las células de granulosa podrían actuar produciendo un medio hormonal adecuado para el oocito (Moor *et al.*, 1980b).

El crecimiento de un folículo primordial hasta su ovulación tarda unos seis meses, y no parece que varía excesivamente entre razas, momento de la estación o entre estaciones (Cahill and Mauléon, 1980). No obstante, las razas prolíficas (Romanov, Finn, Booroola) presentan diferencias en el modelo de crecimiento folicular terminal, tanto morfológico, menor tamaño del folículo ovulatorio, (Driancourt *et al.*, 1985; Webb and Gauld, 1985; McNatty *et al.*, 1986) como funcional, mayor producción de estradiol por célula de granulosa (Webb *et al.*, 1989).

Una vez que un folículo primordial comienza su crecimiento, entra en una fase preantral de unos 130 días de duración, al final de la cual, alcanza un diámetro de aproximadamente 0.2 mm. de diámetro (Turnbull *et al.*, 1977; Cahill, 1981). Se ha estimado que alrededor de 3-4 folículos/día entran en la fase de crecimiento preantral y que el crecimiento desde el final de la fase preantral hasta el estado ovulatorio conlleva unos 24-43 días adicionales, y a partir de aquí son necesarios unos 25-34 días para alcanzar un diámetro de 0.5 mm. (Turnbull *et al.*, 1977). Los estadios finales del crecimiento folicular son extremadamente rápidos, necesitando el folículo unos 5 días para crecer de 0.5 a 2 mm. de diámetro (Turnbull *et al.*, 1977) y otros 3-4 días más para alcanzar 4-5 mm. (Turnbull *et al.*, 1977).

Durante la fase folicular, en observaciones realizadas mediante laparatomía, el folículo ovulatorio incrementaba su diámetro a razón de  $1.42 \pm 0.9$  mm/día entre las 6 y 30 horas tras la aplicación de la prostaglandina y a razón de 0.40 mm/día entre las 30 y las 54 horas tras la aplicación de la prostaglandina (Driancourt and Cahill, 1984).

El diámetro del folículo ovulatorio oscila entre los 4-10 mm. de diámetro en función de las diferentes razas ovinas (Brand and de Jong, 1973; Driancourt and Cahill, 1984; Driancourt *et al.*, 1988, 1990; Noel *et al.*, 1993; Ravindra *et al.*, 1994).

Sin embargo, ésto no implica que en anoestro se detenga el desarrollo folicular, puesto que durante la foliculogénesis basal, el crecimiento de los folículos (hasta 2 mm.) es aparentemente independiente de las gonadotropinas (Driancourt and Fry, 1988), pero no progresa más allá del tamaño anterior. Sin embargo, otros autores trabajando en ovarios de ovejas anoéstricas encuentran folículos mayores de 2 mm. de diámetro (Webb and Gauld, 1987; Noel *et al.*, 1993).

En la oveja, el número total de folículos con al menos dos capas de células de granulosa alcanza un máximo entre los 15 días y 1 mes de edad. Decece marcadamente después de este período y a los 4 meses de edad está prácticamente reducido a 4/5 de lo que estaba con un mes de edad (Mariana *et al.*, 1991). La extensa reducción en el número de folículos en crecimiento es producido por una onda de atresia que es máxima entre 1 y 4 meses tras el nacimiento; esta atresia primero aparece en el oocito y luego en la granulosa (Mariana *et al.*, 1991).

Existe una amplia variabilidad en la población folicular total presente en el ovario dependiendo del método de valoración utilizado y de la raza ovina estudiada. Cahill *et al.* (1985) observan que la población folicular  $> 0.5$  mm. de diámetro en ovejas Corriedale, es alrededor de 18 folículos/oveja el día 15 del ciclo estral. Webb *et al.* (1989) obtiene que durante la fase folicular, la población de folículos  $> 1$  mm. de diámetro se situaba en 17.3 folículos en ovejas Finnish Landrace y 23 folículos en ovejas Merino x Scottish Blackface. En ovejas Suffolk, el número de folículos  $> 2$  mm. de diámetro que se observan en la superficie ovárica desde el día 14 al día 17 del ciclo estral oscila entre 6-8 folículos/oveja

(Noel *et al.*, 1993). Sin embargo, en otras razas ovinas la población folicular  $> 1$  mm. de diámetro es muy elevada, oscilando entre 30-40 folículos/oveja (Texel: Brang and De Jong, 1973; Booroola x Romney: McNatty *et al.*, 1985; Suffolk: Castonguay *et al.*, 1990).

Los folículos preovulatorios están presentes en todo momento a lo largo del ciclo estral y del anoestro y su número se correlaciona con el número de tasa de ovulación de su raza (Cahill and Mauléon, 1980; Lahlou-Kassi and Mariana, 1984; McNatty *et al.*, 1985b; Webb and Gauld, 1985; Webb *et al.*, 1989; Driancourt *et al.*, 1990).

La ovulación puede inducirse durante la fase luteal del ciclo (Thomas *et al.*, 1987) y durante el anoestro (McNeilly and Land, 1979; Martín and Scaramuzzi, 1988). Por lo tanto, la incapacidad de ovulación en estos períodos no se debe a una pérdida de sensibilidad de los folículos a la LH, sino a una insuficiente exposición de tales folículos a dicha hormona, y a una incapacidad de los mismos para inducir el pico preovulatorio de LH.

Aunque los folículos preovulatorios están presentes en el ovario a todo lo largo del ciclo estral, sólo aquellos folículos que como mínimo hayan alcanzado los 2 mm. de diámetro en el momento de la luteolisis, son los que tienen posibilidades de ovular alrededor de 85 horas después; período coincidente con los 3-4 días que los folículos de 2 mm. necesitan para alcanzar el tamaño ovulatorio (McNatty *et al.*, 1982; Driancourt *et al.*, 1986; Webb *et al.*, 1989). El punto clave se sitúa hacia la mitad de la fase folicular (30 h. post-tratamiento), a partir del cual no habrá nuevos folículos que crezcan por encima de los 2 mm. y sólo los folículos que para entonces hayan alcanzado este tamaño constituirán la población de la que saldrán los folículos a ovular (Driancourt and Cahill, 1984). Esto no implica que el folículo mayor al inicio de la fase folicular sea el ovulatorio (Driancourt, 1987).

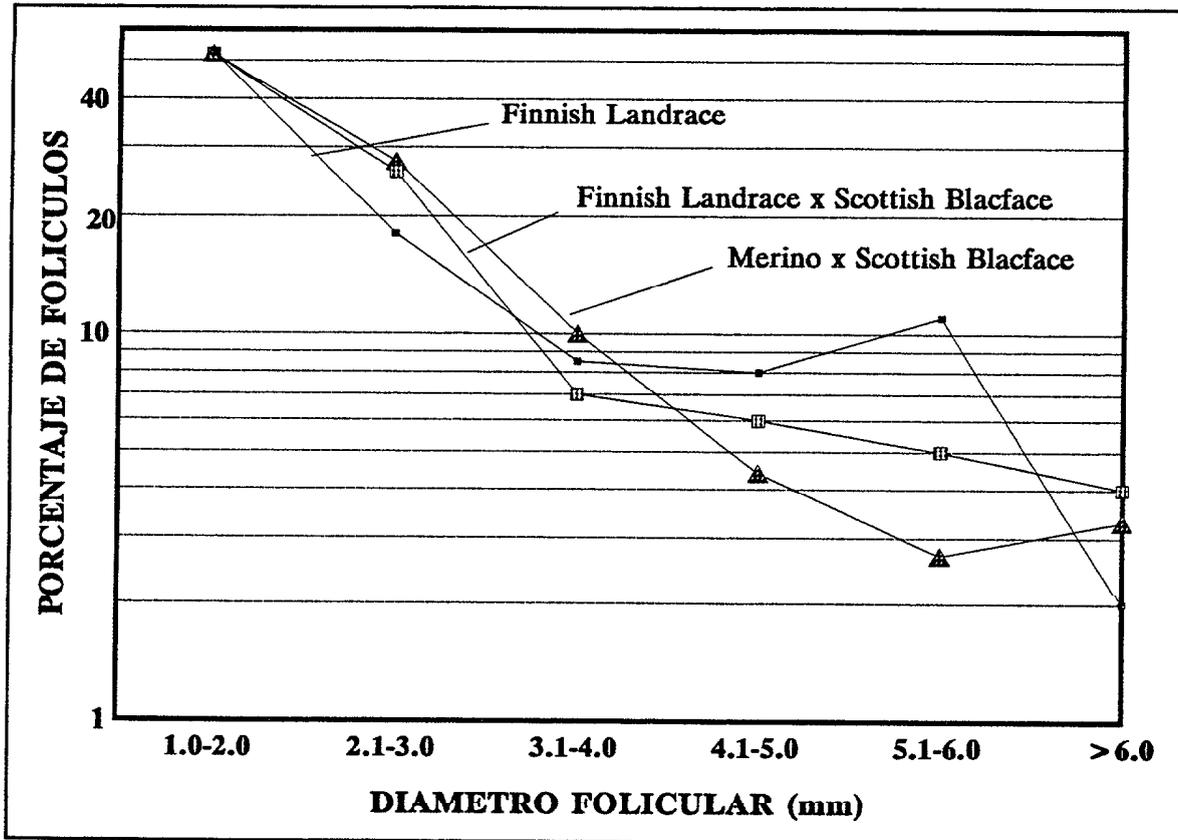


Figura 2.6. Distribución porcentual de la población folicular total de las ovejas de cada raza ovina basada en el diámetro (mm.), (Webb *et al.*, 1989).

Se ha pretendido predecir los folículos que van a ovular en función del tamaño o de la velocidad de crecimiento. Ninguno de los dos parámetros resulta válido. Los folículos más grandes van siendo los ovulatorios conforme se avanza en la fase folicular, pero no al principio (Driancourt and Cahill, 1984).

Durante la fase folicular se ha mostrado que el número de grandes folículos es similar a la tasa de ovulación de la raza (Webb *et al.*, 1989; Driancourt *et al.*, 1990). Sin embargo, en un estudio reciente en ovejas Suffolk, se obtiene que el número de folículos grandes observados es de 2 a 3 veces la tasa de ovulación de la raza (Noel *et al.*, 1993).

Driancourt and Fry (1988) afirman que cuando los folículos han alcanzado los 2 mm. de diámetro, se encuentran a partir de este momento en un estado dependiente de gonadotropinas. De esta población de folículos reclutados tiene lugar un posterior proceso de selección.

El modelo de atresia guarda similitud en razas de diferente prolificidad: existe un incremento en el porcentaje de atresia en los folículos a partir de 0.4 mm. de diámetro, se continua una fase de meseta que comienza en los folículos de 1 mm. de diámetro y se mantiene hasta por encima de los 2 mm. de diámetro, y por último una fase de descenso en aquellos folículos por encima de los 2.8 mm. de diámetro (Lahlou-Kassi *et al.*, 1984).

La atresia parece guardar una cierta relación con el momento del ciclo estral, y el grado de nutrición. En oveja, durante la onda folicular ovulatoria el instante donde el folículo preovulatorio es potencialmente más susceptible de sufrir atresia es entre el día 9 (folículos de 1 mm. de diámetro) y el día 13 (folículos de 2.5 mm. de diámetro) del ciclo estral donde la influencia luteal es mayor (Downing and Scaramuzzi, 1991).

El aporte energético resultado de un *flushing* puede prevenir la atresia en este momento de la fase luteal, incrementando la tasa de ovulación de la fase folicular consecutiva (Downing and Scaramuzzi, 1991). Las modificaciones nutricionales tienen efecto a corto plazo sobre la tasa de ovulación. Pueden provocar cambios en la proporción de atresia de la población de folículos que se encuentran en los estadios finales de desarrollo. El *flushing* no afecta al número de pequeños folículos en el ovario (1-2 mm. de diámetro), así como no afecta a las etapas más tempranas del desarrollo folicular, pero incrementa la tasa de ovulación por prevención de la atresia en los folículos de 2-3 mm. de diámetro (Haresign, 1981). Este concepto está apoyado por estudios, donde la suplementación con altramuz durante 7 días, no afecta al número de folículos mayores de 2 mm. de diámetro en el

momento del estro, pero 48 horas tras el estro, hay menos folículos atrésicos mayores de 2 mm. (McNatty *et al.*, 1986a).

En un estudio posterior (Rhind and McNeilly, 1986) determinaron los tamaños foliculares en ovarios de dos grupos de ovejas, uno en alta C.C. (condición corporal) y el otro en baja C.C. Los ovarios de aquellas ovejas en mejor C.C. tenían un número similar de pequeños folículos pero había más folículos > 4 mm. presentes. Dedujeron que los efectos de la C.C. sobre la tasa de ovulación incluían cambios en el número de grandes folículos que se desarrollaban y eran capaces de ovular.

En grupos de ovejas de distinta condición corporal, la mayoría de las ovejas en mejor condición corporal tenían folículos mayores de 2 mm. en la superficie ovárica en la fase luteal tardía, y estudios morfológicos demostraron que la mayoría de estos folículos eran no atrésicos (Xu *et al.*, 1989).

En un estudio más reciente realizado con cruces de oveja Finnish Landrace, se concluye que el número de folículos > 4 mm. de diámetro era independiente de la condición corporal, siendo la mayoría de los folículos estrógeno-activos (Rhind and Schambacher, 1991). Estos resultados contrastan con experiencias realizadas con ovejas de menor tasa de ovulación, en donde existe una correlación positiva entre el grado de nutrición, el número de folículos estrógeno-activos y la tasa de ovulación (Rhind *et al.*, 1985).

Los perfiles de LH no se modifican durante la fase luteal en ovejas de diferente condición corporal (Rhind and Schambacher, 1991). En la fase folicular, tanto la concentración, como la amplitud y el número de pulsos de LH es mayor en aquellas ovejas con ingesta moderada frente a ovejas con ingesta insuficiente (Rhind and Scambacher, 1991).

### 2.2.2. CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES

La capacidad proliferativa de las células de granulosa procedentes de folículos ováricos presenta variaciones en función del tamaño folicular. Esto se ha demostrado *in vitro*, puesto que en condiciones basales de cultivo (es decir, sin ningún tipo de tratamiento), las células de granulosa de folículos pequeños eran capaces de replicarse, mientras que las células de granulosa de folículos grandes disminuían en su número a lo largo del cultivo (Monniaux and Pisellet, 1992). Este hecho se ha comprobado tanto por la concentración celular final como por el índice de marcaje con timidina, ambos superiores en células procedentes de folículos pequeños (Monniaux and Pisellet, 1992).

Asimismo, se ha demostrado que la capacidad diferenciadora de las células de granulosa procedentes de folículos ováricos, varía con la talla folicular: en condiciones basales de cultivo, las células de granulosa de folículos grandes secretan mayor cantidad de progesterona que las células de folículos pequeños, entre las 72-96 horas de cultivo (Monniaux and Pisellet, 1992).

#### **2.2.2.1. Receptores de LH**

Los receptores para LH están presentes en las células tecaes, tanto de folículos antrales atrésicos como no atrésicos. En las células de granulosa, los receptores de LH se localizan exclusivamente en los grandes folículos no atrésicos (Carson *et al.*, 1979; England *et al.*, 1981). Los receptores a LH aparecen en la granulosa de folículos a partir de un tamaño determinado: 3 mm. en la oveja (Carson *et al.*, 1979) y 5 mm. en la vaca (Lee, 1976) y su número se incrementa con el tamaño folicular (Carson *et al.*, 1979), en correlación con la producción de estradiol folicular (Webb and England, 1982).

Estos receptores están presentes en cualquier momento del ciclo sexual, lo cual evidencia que su presencia es independiente de las fluctuaciones hormonales (England *et al.*, 1981). La concentración de receptores de LH en las células tecaes y de granulosa de los folículos no ovulatorios desciende tras el pico de la onda preovulatoria gonadotrópica (Webb and England, 1982).

Los folículos no ovulatorios tienen más receptores a la LH en las células tecaes que en las de granulosa, aunque la concentración de estos receptores es menor que en las células tecaes de los folículos ovulatorios (Webb and England, 1982). Existe una correlación positiva entre la secreción de estradiol *in vitro* y la concentración de receptores de LH en células tecaes y de granulosa en todos los tipos foliculares (Webb and England, 1982).

### 2.2.2.2. Niveles de estradiol y actividad aromatasa

Los pequeños folículos antrales de oveja (1-3 mm. de diámetro) se caracterizan por altos niveles de testosterona y bajos niveles de progesterona en el líquido folicular (Carson *et al.*, 1981). Cuando los folículos crecen, los niveles de estradiol y en menor medida, los niveles de progesterona, se incrementan drásticamente, mientras los niveles de testosterona caen (oveja, Carson *et al.*, 1981; Ireland and Roche, 1982). También conforme van creciendo, presentan respuestas máximas en términos de producción de AMP<sub>c</sub> (Henderson *et al.*, 1985; McNatty *et al.*, 1986b).

La actividad aromatasa no es detectable en pequeños folículos antrales (menores de 1 mm. de diámetro en la oveja), incrementándose con el tamaño folicular (Webb and England, 1982; Tsonis *et al.*, 1984a). En el folículo preovulatorio la actividad aromatasa de la granulosa es máxima, siendo más del 90 % del estradiol producido secretado directamente al torrente sanguíneo y el resto al antro (McNatty *et al.*, 1981a).

Las altas concentraciones de estradiol presentes en los folículos grandes, al interaccionar con la FSH estimulan la producción de IGF-I, Insulin Growth Factor, (Hsu and Hammond, 1987), por lo tanto, la concentración de IGF-I en los folículos grandes es alta (Echternkamp, 1990). Además, la alta sensibilidad a la FSH de los folículos en crecimiento terminal estimula la fijación de la IGF-I a las células de la granulosa (Monniaux and Pissellet, 1992).

### 2.2.2.3. Actividad de la IGF-I

El incremento de la producción de IGF-I coincide con un aumento de la receptividad de las células de la granulosa a la propia IGF-I, que estimulará la aromatización y nuevos aumentos de los niveles de estradiol, así como de receptores de LH (Adashi *et al.*, 1985) y maximiza la acción de la inhibina (Zhiwen *et al.*, 1988), cuya masiva producción reduce marcadamente la secreción de FSH pituitaria (Martin *et al.*, 1988), por debajo de las necesidades de mantenimiento del resto de folículos, conduciéndolos a la atresia y bloqueando el crecimiento de folículos mayores de 2.5 mm. de diámetro.

Por tanto, la IGF-I, amplificando la acción de la FSH sobre la aromatización y la aparición y aumento del número de receptores de LH, juega un papel clave en el mantenimiento de la dominancia (Driancourt, 1991). La IGF-I al incrementar la sensibilidad folicular a la FSH, provoca que el folículo con mayor proporción de IGF-I, esté mejor capacitado para soportar los niveles más reducidos de FSH que provoca la inhibina, y seguir de esta forma su desarrollo hasta el final, para lo cual no están capacitados los folículos con menor nivel de IGF-I.

2.2.2.4. Actividad de la FSH e inhibina

La FSH a corto plazo (2 horas) estimula la proliferación de las células de folículos normales (no atrésicos). Esto se ha comprobado en células de granulosa procedentes de folículos normales de tamaño pequeño (2-4 mm.) y mediano (4-6 mm.), que cultivadas *in vitro* en presencia de FSH mostraban un mayor índice de marcaje (Monniaux, 1987a). A corto plazo, la FSH disminuye la actividad aromataasa de las células de granulosa en los folículos normales de tamaño mediano (Monniaux, 1987a).

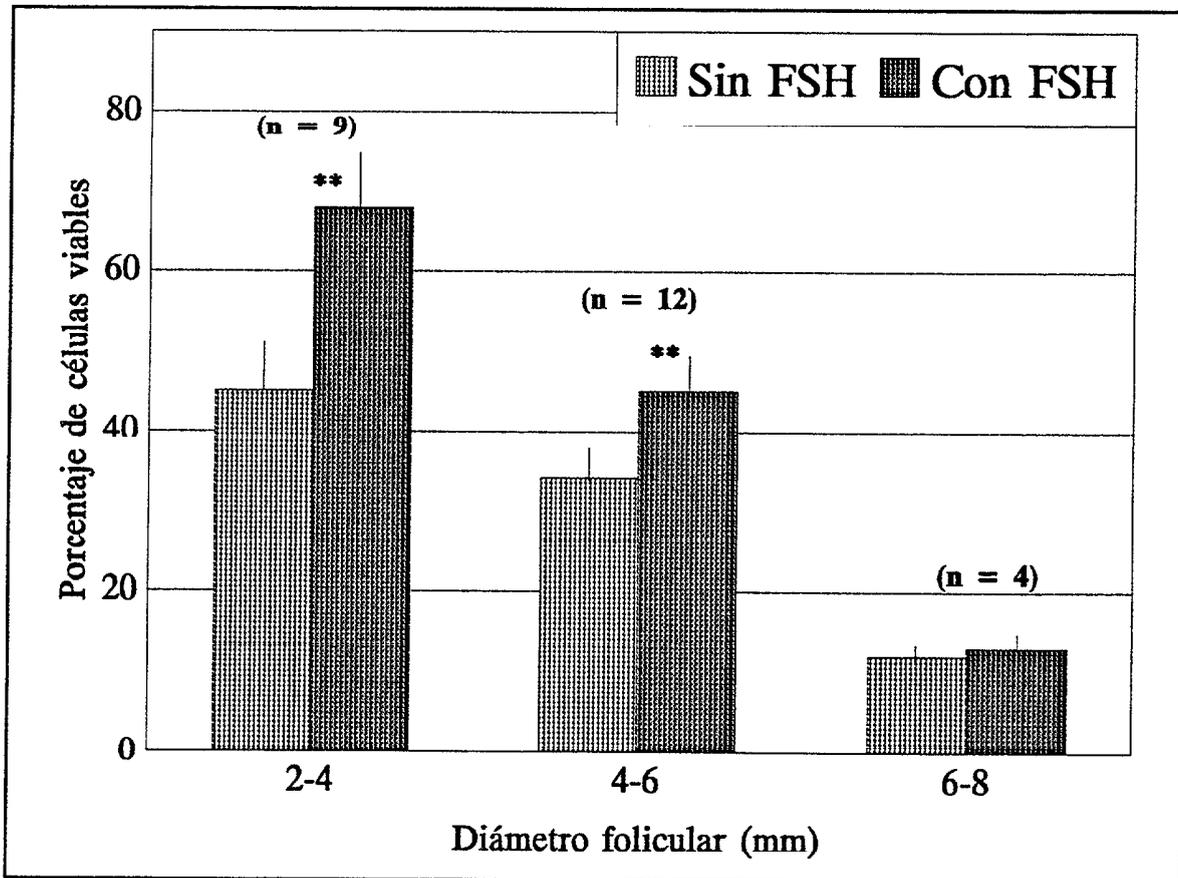


Figura 2.7. Porcentaje de células viables aisladas de folículos sanos de diferentes tamaños; para cada folículo las células se incubaron durante 2 horas con <sup>3</sup>H-timidina (5μCi/ml), con o sin FSH (100 ng/ml). Los valores son media ± error estándar. \*\* p < 0.01 comparado con los valores de células incubadas sin FSH (Monniaux, 1987).

La FSH a largo plazo no presentaba un efecto significativo sobre la proliferación celular de folículos ovinos pequeños (1-3 mm.) y grandes (5-7 mm.) a las 96 horas de cultivo (Monniaux and Pissellet, 1992), si bien *in vivo* sí se observa un efecto estimulador sobre la multiplicación celular en rata (Peluso and Steger, 1978). La FSH produce un incremento dosis-dependiente en la producción de progesterona por célula de granulosa, tanto en folículos pequeños (1-3 mm.), como en folículos grandes (5-7 mm.), si bien en estos últimos su acción es más manifiesta (Monniaux and Pissellet, 1992).

La FSH estimula la síntesis de inhibina por parte de las células de la granulosa antes de la luteinización, mientras que la LH no presenta esta acción. En células luteinizadas de granulosa, sólo la LH incrementa la producción de inhibina (Tsonis *et al.*, 1987). Además de la FSH y la LH, la producción de la inhibina de las células de granulosa es estimulada por la insulina, la IGF-I (Findlay *et al.*, 1987) y la testosterona (Tsonis *et al.*, 1987). Por contra, la inhiben la EGF (Epidermal Growth Factor), las dosis ovulatorias de LH y los antagonistas de la GnRH (Tsonis *et al.*, 1987).

El papel de la inhibina en el crecimiento folicular es complejo. Los grandes folículos sanos mayores de 3 mm. de diámetro son la principal fuente de inhibina durante la fase folicular (Campbell *et al.*, 1991). Sin embargo, los folículos sanos menores de 3 mm. de diámetro y los folículos atrésicos también producen inhibina, pero su producción es notoriamente inferior (Campbell *et al.*, 1991; Rhind and Schambacher, 1991). En otros estudios, se confirma que los folículos estrógeno-activos (> 4 mm.) producen el 55% de la producción total de inhibina, mientras que contribuyen al 90% de la producción total de estradiol (Mann *et al.*, 1992a).

En cultivos de folículos mayores de 3 mm. de diámetro procedentes de ovarios ovinos en fase folicular y fase luteal, el grado de secreción de inhibina durante la fase luteal es

similar al obtenido durante la fase folicular, confirmando que el cuerpo lúteo ovino no produce cantidades apreciables de inhibina (Campbell *et al.*, 1991).

En oveja, la inhibina conjuntamente con el estradiol, determina la supresión de la secreción de FSH. La inmunización pasiva frente a la inhibina o frente al estradiol durante la fase luteal se traduce en un incremento de las concentraciones periféricas de FSH (Mann *et al.*, 1992b), mientras la inmunización contra ambas genera un incremento de FSH aún superior.

La inmunización frente al estradiol en fase folicular se traduce en un mayor incremento de las concentraciones de FSH que la inmunización frente al estradiol en fase luteal (Mann *et al.*, 1992b).

La administración exógena de estradiol e inhibina en cantidades fisiológicas son capaces de mantener las concentraciones periféricas de FSH dentro de un rango normal en ovejas ovariectomizadas (Mann *et al.*, 1992b).

En ovejas Finnish Landrace, la condición corporal está inversamente relacionada con el contenido intrafolicular de inhibina, tanto en folículos estrógeno-activos como no estrógeno-activos. De este modo podría pensarse que la menor población folicular en hembras con un nivel más bajo de alimentación, en parte obedece a una mayor concentración de inhibina, que a su vez disminuye la secreción hipofisaria de FSH (Rhind and Schambacher, 1991).

#### 2.2.2.5. Factores de crecimiento

La IGF-I (Insulin Growth Factor) estimula la mitosis de las células de granulosa de la vaca (Savion *et al.*, 1981) y de la oveja (Adashi *et al.*, 1986).

En un estudio más reciente Monniaux and Pisselet (1992), obtienen que la IGF-I provoca un claro efecto estimulante sobre la multiplicación celular, independientemente de que se traten de folículos pequeños (1-3 mm.) o grandes (5-7 mm.), cuando se cultivan a bajas densidades. Con altas densidades, la IGF-I también incrementa el número de células de ambos tamaños foliculares a las 96 horas de cultivo.

Las células de granulosa de pequeños folículos responden más intensa y tempranamente que las células de folículos grandes frente a la estimulación con IGF-I. La IGF-I favorece la supervivencia celular en las células de granulosa de grandes folículos, bien previniendo la pérdida celular y/o incrementando la proliferación celular (Monniaux and Pisselet, 1992).

Asimismo, estimula la diferenciación celular, incrementando la actividad aromataasa de las células de granulosa y favoreciendo la aparición de receptores de LH (Adashi *et al.*, 1986).

La IGF-I produce un incremento dosis-dependiente en la producción de progesterona por célula de granulosa en folículos grandes (5-7 mm.) de oveja, pero no así en pequeños (1-3 mm.); el estadio folicular tiene una influencia significativa sobre la secreción de progesterona por las células de granulosa (Monniaux and Pisselet, 1992). Las células de granulosa de folículos grandes responden más intensa y rápidamente en la producción de progesterona que las células de folículos pequeños frente a una estimulación con IGF-I, independientemente de la densidad celular inicial (Monniaux and Pisselet, 1992).

El TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor) no parece promover la proliferación de las células de granulosa de rata *in vitro*, pero sí la diferenciación puesto que favorece la estereidogénesis y la aparición/aumento del número de receptores de LH (Knecht *et al.*, 1986). Hernández *et al.* (1987) sugieren que la TGF- $\beta$  ovárica tiene un efecto sinérgico sobre el desarrollo folicular por maximización de las respuestas foliculares a la acción estimulante de la FSH.

El EGF (Epidermal Growth Factor) inhibe la diferenciación de las células de granulosa de rata *in vitro*, si bien estimula la proliferación de las mismas (Carson *et al.*, 1989). La actividad de los receptores de EGF en la granulosa, aumenta con la exposición de las células de granulosa a la FSH. Por otra parte, la EGF es capaz de actuar directa o indirectamente sobre las células de la granulosa para regular su diferenciación; a elevadas concentraciones la EGF inhibe la secreción de inhibina inducida por la FSH y el TGF- $\beta$  (Carson *et al.*, 1989).

El FGF (Fibroblast Growth Factor) muestra una intensa actividad mitogénica sobre las células de granulosa (Gospodarowicz *et al.*, 1978; Hammond and English, 1987). Parece tener un efecto negativo sobre la diferenciación de las células de granulosa, puesto que inhibe la aparición de receptores a LH (Hammond and English, 1987).

El PDGF (Platelet-derived Growth Factor) intensifica la secreción de progesterona FSH inducida en las células de granulosa, la actividad adenil ciclasa (Knecht and Catt, 1983b) y la inducción de receptores de LH (Knecht and Catt, 1983b). En cultivos de granulosa porcina, estimula la proliferación de las células de granulosa (Baranao and Hammond, 1984b).

### 2.2.3. ATRESIA

#### 2.2.3.1. Características

La duración exacta de los cambios degenerativos durante los procesos atrésicos no es conocida. El crecimiento de un folículo es continuo desde el estado primordial al estado terminal, que finaliza con la ovulación. Su crecimiento puede pararse por cambios degenerativos denominados atresia. La atresia es el destino último normal de la mayoría de los folículos, puesto que sólo el 0.1% de los folículos que empiezan a crecer se diferencian al estado preovulatorio y ovularán (Mariana *et al.*, 1991). Tiene lugar en todos los estados de desarrollo folicular, y los mecanismos íntimos son probablemente diferentes entre folículos de diferentes tamaños.

En los folículos preantrales, las características morfológicas anormales se detectan primero en los oocitos, mientras que en los folículos antrales los cambios histológicos más tempranos son la aparición de picnosis en la granulosa conjuntamente con una disminución en la proliferación celular (Mariana *et al.*, 1991). Además, existen diferencias entre especies en el desarrollo de la atresia; en folículos antrales, la degeneración del *cumulus* es un proceso muy tardío en la oveja y muy temprano en el cerdo (Mariana *et al.*, 1991). Una importante dificultad para investigar la atresia es que generalmente se reconoce una vez que sucede, es decir, después de que el folículo ha desarrollado sus cambios morfológicos (Mariana *et al.*, 1991).

La intensidad de la atresia no es la misma a lo largo de toda la vida de la oveja: la mayor proporción de atresia se produce a la edad de 1 a 4 meses. Esta atresia aparece primero en el oocito y luego en la granulosa. Así, la distribución de la población folicular en función de su tamaño se modifica y su número experimenta una drástica reducción antes

de la pubertad. La población folicular, de acuerdo a la edad, difiere en individuos; algunos animales manifiestan un muy precoz desarrollo del ovario, mientras otros, con la misma edad, muestran una importante demora en la población y crecimiento de los folículos (Mariana *et al.*, 1991).

La determinación de la calidad folicular valorada en grado de atresia en pequeños rumiantes se puede realizar atendiendo a criterios morfológicos (Moor *et al.*, 1978), morfométricos (McNatty, 1981, 1982) o histológicos (Monniaux, 1987b; Webb *et al.*, 1989; Batista *et al.*, 1993).

Dentro de las modificaciones morfométricas, un folículo no atrésico se define como aquel que tiene una teca interna altamente vascularizada, ausencia de turbidez en el líquido folicular, presencia de más del 25% del máximo número definido de células de granulosa para un tamaño determinado y la existencia de un oocito de apariencia sana (McNatty *et al.*, 1985).

Los cambios morfológicos e histológicos están estrechamente asociados con la atresia. Entre los cambios histológicos que ocurren durante la atresia, la aparición de los procesos de picnosis en las células de la granulosa y/o la distorsión o fragmentación del oocito son considerados como criterios específicos (Mariana *et al.*, 1991). Las capas tecales parecen que escapan inicialmente a la atresia: su proliferación (Nicosia, 1980) y la esteroidogénesis continúa. En los folículos primordiales resulta más difícil estimar el grado de degeneración. El oocito es el primero que manifiesta dicha degeneración; las sencillas estructuras histológicas que lo rodean, lo hacen posteriormente, y desaparecen de un modo muy rápido (Zuckerman, 1962).

En el ovario del ratón, Faddy *et al.* (1976) observaron que la proporción de folículos en crecimiento que se vuelven atrésicos se incrementa, al aumentar el tamaño de los folículos.

En ovejas, mientras dure gran parte de la foliculogénesis basal, la atresia alcanza el 40-50 % en folículos menores de 0.5-1.0 mm. de diámetro, mientras que entre 1-2 mm. la atresia aumenta hasta un 50-70 %, y para todos aquellos folículos mayores de 2 mm., es decir en un estado dependiente de los niveles no basales de gonadotropinas, la atresia se mantiene o supera ligeramente los niveles anteriores (Brand and De Jong, 1973; Turnbull *et al.*, 1977; McNatty, 1982)., si bien puede llegar a situarse en niveles inferiores al 30-40% (Lahlou-Kassi *et al.*, 1984).

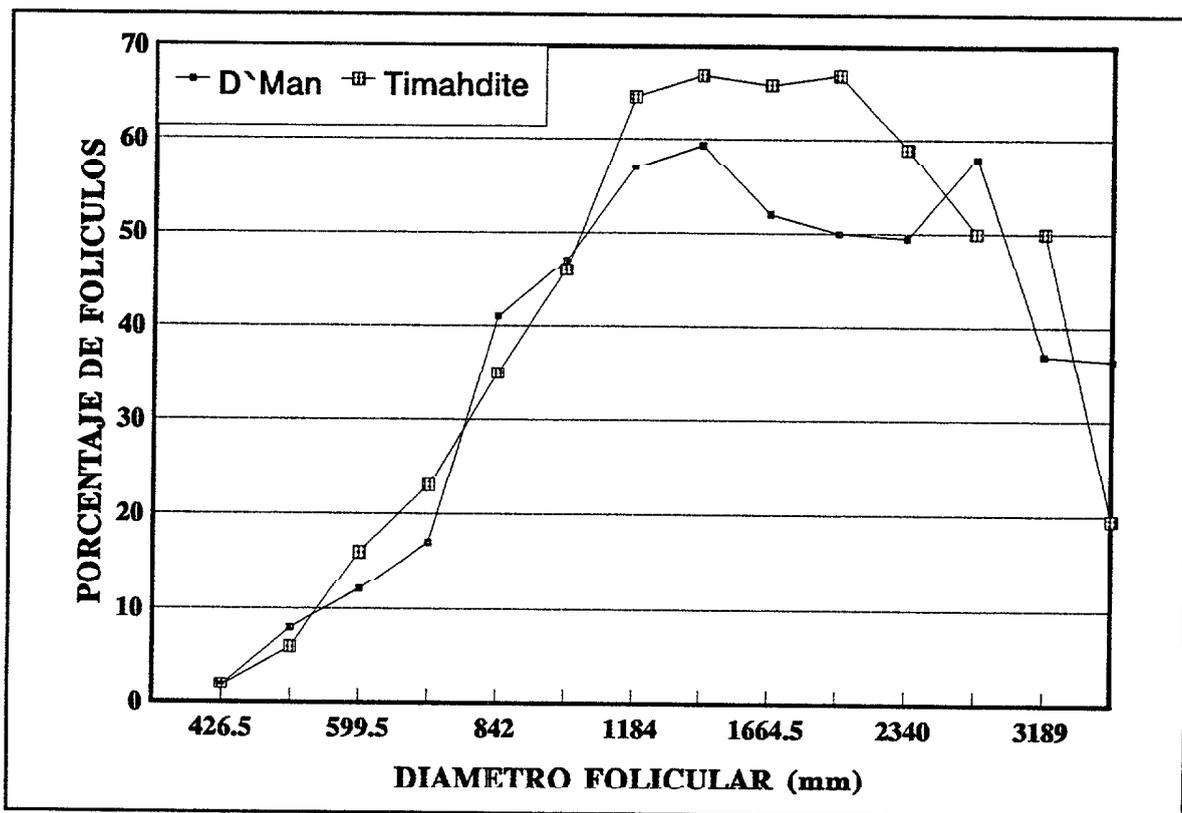


Figura 2.8. Porcentaje de folículos que presentan atresia en función de su tamaño en ovejas D'Man y Timahdite (Lahlou-Kassi and Mariana, 1984)

Al progresar el tamaño folicular, el índice de marcaje de las células de granulosa de folículos normales disminuye; el grado de mitosis de las células de granulosa es menor al incrementarse el tamaño folicular (Monniaux, 1987a). Las células de granulosa ovina de los folículos atrésicos muestran menor capacidad proliferativa *in vitro*, que la de los folículos normales. La FSH no es eficaz en la estimulación de la actividad mitótica de las células de granulosa de folículos atrésicos, hecho que sí ocurre en las células de granulosa de folículos normales (2-6 mm. de diámetro; Monniaux, 1987a).

Desde el punto de vista bioquímico, la atresia se caracteriza por:

1. Pérdida de receptores para las gonadotropinas por las células foliculares. Sin embargo, ésto no es un claro proceso de atresia (Carson *et al.*, 1981), puesto que sólo aparece cuando se incrementa la profundidad de la atresia o en folículos preovulatorios (Ireland and Roche, 1982). Así, la pérdida de receptores de las gonadotropinas sería una consecuencia más que una causa de atresia. Los receptores a LH se han observado en células tecaes de todos los grandes folículos antrales, sanos o atrésicos, en oveja y vaca (McNatty *et al.*, 1985a).

2. Variaciones en el número de receptores de IGF-I. El número de receptores de IGF-I en las células de granulosa de folículos antrales ovinos está influenciado por el grado de atresia folicular, presentándose un menor número de tales receptores en los folículos atrésicos (Monget *et al.*, 1989).

3. Cambios en la esteroidogénesis. Se ha comprobado una menor concentración de estradiol en el líquido folicular de folículos no ovulatorios (atrésicos) que en folículos ovulatorios de la oveja (Webb and England, 1982; Monniaux, 1987). Este descenso puede estar asociado con la pérdida de actividad aromatasas en las células de granulosa, que siempre

es un suceso temprano en la atresia (Moor, 1977; Moor et al., 1978; McNatty, 1981; Carson et al., 1981; McNatty *et al.*, 1984a; Monniaux, 1987b).

Dentro de una misma raza, la concentración de estradiol en el líquido folicular y la actividad aromatasas por célula de granulosa en cultivos *in vitro* procedentes de folículos normales, se incrementa conjuntamente con el tamaño folicular (McNatty, 1982; Monniaux, 1987a). Existe, por tanto, una correlación inversa entre el índice de marcaje de las células de granulosa y las concentraciones de estradiol en el líquido folicular o la actividad aromatasas en las células de granulosa.

La testosterona en el líquido folicular de folículos atrésicos es más elevada que en los folículos ovulatorios en ovejas (Carson *et al.*, 1981; Webb and England, 1982) y en vaca, aun manteniéndose por encima de los niveles de estrógenos, no es tan elevada (Ireland and Roche, 1982). Los resultados pueden ser explicados por la temprana pérdida de secreción de andrógenos por las células tecaes durante la atresia en la vaca (McNatty *et al.*, 1985a) y su mantenimiento en otras especies.

Los niveles de progesterona disminuyen en los folículos atrésicos de la oveja (Carson *et al.*, 1981), mientras en la vaca, los altos niveles de progesterona encontrados en el líquido folicular de los folículos atrésicos (Kruip and Dieleman, 1985) son la consecuencia de la secreción activa de progesterona por las células de granulosa después que pierdan la actividad aromatasas (Henderson *et al.*, 1987a).

Además de estas modificaciones básicamente de carácter bioquímico, podemos mencionar las alteraciones en la vascularización folicular. En la oveja, se ha descrito una reducción en el tamaño de la pared capilar en folículos atrésicos. Además, durante la atresia muchos capilares tecaes quedan bloqueados con células obstructivas. En la oveja no hay una

reducción de los vasos sanguíneos adyacentes al *cumulus*, que permanecen viables durante la atresia, mientras en el cerdo, el *cumulus* degenera y la vascularización íntima teçal se reduce grandemente (Cran *et al.*, 1983). En la teca de folículos atrésicos ovinos, se puede observar la presencia de capilares bajo el *cumulus*, indicativo de la posible existencia de algún factor local de carácter angiogénico (Cran *et al.*, 1983). En la actualidad, todavía se desconoce si los cambios en la microvascularidad inician la atresia o simplemente la acompañan.

### 2.2.3.2. Relaciones endocrinas

La atresia de los folículos antrales es probablemente causada por un medio hormonal inadecuado dentro de los folículos. Un menor aporte de gonadotropinas puede causar atresia.

El período prepuberal y el anoestro estacional están asociados con reducciones significativas en la secreción de LH y FSH. En anoestro, la reducción de la secreción de gonadotropinas durante este período induce dos situaciones: atresia incrementada en folículos preantrales en crecimiento y una reducción significativa en su número (Mariana *et al.*, 1991).

El patrón de secreción y los niveles de gonadotropinas durante los períodos anteriores a la pubertad y anoestro estacional están bien caracterizados (Mariana *et al.*, 1991) y es posible extrapolar un paralelismo entre la disminución del número de folículos a lo largo de la atresia y un grado más lento de crecimiento con el descenso en los niveles de FSH (Mariana *et al.*, 1991).

La atresia folicular podría iniciarse por una menor disposición de FSH por parte de los folículos, ya sea debido a que los niveles plasmáticos de la hormona son demasiado bajos, o bien porque la vascularización del folículo no está bien desarrollada. Este hecho puede

determinar la selección de los folículos preovulatorios en la mitad de la fase folicular del ciclo, cuando los niveles plasmáticos de FSH disminuyen en respuesta al feed-back negativo sobre la hipófisis de los estrógenos y la inhibina (Baird *et al.*, 1981).

#### **2.2.4. DESARROLLO FOLICULAR A LO LARGO DEL CICLO ESTRAL**

##### **2.2.4.1. Control endocrino del ciclo estral**

La importancia de las gonadotropinas en el crecimiento folicular depende del tipo de folículos y de la estructura de la población folicular presente en el ovario.

La retirada total de gonadotropinas como consecuencia de la hipofisectomía se traduce en un fracaso del desarrollo folicular. Dufour *et al.* (1979) obtienen que 4 días tras la hipofisectomía todos los grandes folículos antrales se habían vuelto atrésicos y se determinó que no existía crecimiento folicular a partir de los 0.23 mm. de diámetro. Sin embargo, en estudios más recientes se obtiene que la hipofisectomía, a corto plazo, no tiene efecto sobre la población folicular entre 0.8-2.0 mm. de diámetro, si bien inhibe el crecimiento folicular por encima de los 2 mm. de diámetro (Driancourt *et al.*, 1987). Asimismo, a largo plazo, la hipofisectomía impide el crecimiento folicular por encima 2 mm. de diámetro para las ovejas Booroola FF (seleccionadas para alta tasa de ovulación) y por encima de 3.0 mm. de diámetro en las Booroola F+, pero no modifica el crecimiento folicular desde 0.5 mm. de diámetro hasta las tallas anteriores, para los dos tipos raciales ovinos definidos (McNatty *et al.*, 1990).

También se observa una ausencia de reclutamiento folicular (aparición de folículos < 1 mm. de diámetro), por inmunización contra GnRH (McNeilly *et al.*, 1986). La abolición de la secreción pulsátil de LH, y el mantenimiento de los niveles basales de LH y

FSH de un modo continuado, aun reduciendo las concentraciones de éstos en un 30-50 %, bien como resultado de la inmunoneutralización activa contra la GnRH (McNeilly *et al.*, 1986) o induciendo receptores de baja regulación de la GnRH por tratamiento crónico de ovejas con un antagonista (McNeilly and Fraser, 1987), da como resultado un fracaso del desarrollo folicular por encima de los 2-2.5 mm. de diámetro.

El control endocrino del desarrollo folicular esta modulado por el aporte de sangre que llega a los folículos. Los folículos preantrales menores no tienen un aporte vascular especial, estando constituido por los vasos del estroma. La vascularización del folículo preovulatorio está particularmente bien desarrollada (oveja, Moor *et al.*, 1978) y el flujo sanguíneo es alto durante el estro, particularmente en el ovario ovulatorio (Mariana *et al.*, 1991).

Al principio de la fase folicular del ciclo, cada oveja tiene varios folículos sanos mayores de 2 mm. de diámetro, pero el crecimiento potencial de cada uno de ellos es diferente. Cuando se cauterizan algunos folículos mayores 2 mm. de diámetro, la ovulación se produce en su momento habitual, siempre que permanezcan en el ovario varios folículos mayores de 2 mm. de diámetro. Sin embargo, la destrucción de todos los folículos mayores de 2 mm. retrasa significativamente la ovulación (Tsonis *et al.*, 1984a).

Es ampliamente conocido que la inyección de gonadotropinas tales como PMSG (Robinson, 1959; Allen and Stewart, 1978) y FSH-P (Monniaux *et al.*, 1983; Henderson *et al.*, 1988) pueden elevar la tasa de ovulación.

Las gonadotropinas exógenas actúan reclutando folículos más pequeños y los protegen de la atresia (Monniaux *et al.*, 1983; Driancourt, 1987; Henderson *et al.*, 1988), pero no rescatan folículos atrésicos (Driancourt *et al.*, 1987; Hirshfield, 1989). Como estas

gonadotropinas tienen acción tanto FSH como LH, no está claro si una u otra, o ambas, de estas actividades son las responsables de tales acciones.

La FSH purificada ha mostrado que incrementa el número de folículos no atrésicos, incrementa la actividad aromatasa de los folículos antrales y minimiza los efectos inhibitorios del fluido folicular bovino sobre la atresia (McNatty *et al.*, 1985b). Estas observaciones sugieren que las gonadotropinas de actividad mixta como por ejemplo la PMSG, actúan principalmente a través de su actividad FSH para incrementar la tasa de ovulación (McNeilly *et al.*, 1991).

Parece ser que el modo de acción de la FSH y la PMSG para incrementar la tasa de ovulación se centra en su capacidad para activar los sistemas enzimáticos aromatasa de las células de granulosa y por tanto incrementar la secreción de estradiol (Henderson *et al.*, 1985, 1987; Hsueh *et al.*, 1984). Parece claro que una vez que se haya producido la selección, es decir el ajuste entre el número de folículos reclutados y la tasa de ovulación propia de cada raza (Driancourt, 1991), el gran folículo dominante es marcadamente más sensible a la FSH que los menores (Henderson *et al.*, 1987).

Si bien la FSH exógena puede estimular la superovulación, no parece claro que sea la única responsable del crecimiento y maduración folicular. Al comparar razas de diferente tasa de ovulación, no se observan diferencias en las concentraciones plasmáticas de LH a lo largo del ciclo estral (Scaramuzzi and Radford, 1983), si bien en algunas razas esta LH podría ser mayor en algún momento del ciclo (Lahlou-Kassi *et al.*, 1984; McNatty *et al.*, 1989a). La aplicación de LH no incrementa la tasa de ovulación, si bien es posible que la administración de LH junto con la FSH pueda permitir a un número mayor de folículos alcanzar la madurez ovulatoria, que si se administrase FSH exclusivamente (Henderson *et al.*, 1988).

No existe una clara relación entre las concentraciones plasmáticas de FSH y la tasa de ovulación en razas con diferente prolificidad (Cahill *et al.*, 1981; Driancourt and Fry, 1988). A pesar de ello, existen evidencias que nos permiten establecer algunas conexiones entre las concentraciones plasmáticas de FSH y el crecimiento folicular preovulatorio. Las ovejas Booroola Merino presentan mayores concentraciones plasmáticas de FSH durante los días 1-3 tras la luteolisis en aquellas ovejas que tenían ovulaciones dobles en comparación con las que tenían una ovulación simple (McNatty *et al.*, 1985b).

Por otro lado, las concentraciones plasmáticas reducidas de FSH, durante la fase luteal y folicular en ovejas con peor condición corporal, están asociados con una disminución de los folículos ovulatorios y por consiguiente de la tasa de ovulación (Rhind and McNeilly, 1986; McNeilly *et al.*, 1987).

Se ha determinado claramente que las concentraciones de FSH varían considerablemente durante la fase preovulatoria (Baird and McNeilly, 1981), pero empiezan a acumularse evidencias que existen fluctuaciones en la concentración de FSH a lo largo del ciclo, disminuyendo sobre los días 3-4, incrementándose los días 6-8 y fluctuando a lo largo del resto de la fase luteal hasta la luteolisis y el comienzo de la fase folicular (Bister and Paquay, 1983; Campbell, 1988).

En la oveja, en fase luteal, existe crecimiento folicular por encima de los 2 mm. de diámetro. El tratamiento con bFF (Fluido Folicular bovino) en esta misma fase, reduce los niveles de gonadotropinas, y no se aprecia crecimiento folicular por encima de los 2 mm. de diámetro. Así, el fracaso en el desarrollo de folículos preovulatorios parece estar relacionado con la reducción de FSH, así como con la ausencia de pulsos de LH (Hunter *et al.*, 1988). La aplicación de BFF 24 horas tras el inicio de la luteolisis producen una supresión específica de la FSH durante un tiempo más prolongado, indicando que una adecuada exposición a la

FSH parece ser necesaria para el desarrollo folicular incluso durante los estados finales de maduración (Henderson *et al.*, 1988). Si se aplica BFF en el momento de la luteolisis, se produce un alargamiento del período entre la luteolisis y la aparición del celo, en este caso parece ser debido más a una acción directa de la BFF sobre el ovario, que a una consecuencia de las concentraciones reducidas de FSH (Henderson *et al.*, 1988).

La selección que tiene lugar en la onda de maduración folicular ovulatoria, se localiza principalmente en la fase folicular, diferenciándose el período preovulatorio por la cantidad de FSH disponible. El tratamiento de las ovejas con PMSG (Mauléon and Mariana, 1977) o FSH pura (McNatty *et al.*, 1985b; Henderson *et al.*, 1988) desde el momento del inicio de la luteolisis provoca un aumento variable e incontrolable en el crecimiento folicular y la posterior tasa de ovulación.

La tasa de ovulación es mayor si la FSH se aplica 24 horas antes del comienzo de la luteolisis (McNatty *et al.*, 1985b). Si se aplica la FSH a las 24 horas tras el inicio de la onda preovulatoria de LH, no se manifiesta un incremento en la tasa de ovulación (Henderson *et al.*, 1988).

Sin embargo, recientes estudios han sugerido que la caída de los niveles de la FSH en respuesta a la acción de la inhibina y los estrógenos puede no ser suficiente para la selección del folículo ovulatorio y que la LH puede ser importante en este proceso (Campbell *et al.*, 1990; McNeilly *et al.*, 1991, 1992; Picton and McNeilly, 1991).

El papel que juegan los factores ováricos (autocrinos y paracrinos) en la selección y dominancia folicular no está claro (Fortune *et al.*, 1991). El fluido folicular tiene sustancias estimulantes e inhibitoras de la función folicular *in vitro*. Se desconoce hasta que punto la producción de estas sustancias por los folículos pueden modificar el desarrollo de otros

folículos en uno u otro ovario. Hay evidencias de que la acción de gonadotropinas a nivel ovárico está modulada por factores de crecimiento de origen local (Mori *et al.*, 1989).

#### 2.2.4.2. Ondas de maduración folicular en el ciclo estral

Parece probable que las fluctuaciones de la FSH a lo largo del ciclo estral puedan reflejar el desarrollo y la consecuente regresión de grandes folículos estrogénicos a lo largo de la fase luteal (Campbell *et al.*, 1990). Esto ayuda a comprender la formación de varias ondas de maduración folicular en el ciclo (Noel *et al.*, 1993). En la oveja, hay varios períodos durante un ciclo estral, en los que se incrementan las concentraciones plasmáticas de estradiol (Ireland, 1987) lo cual apoya la idea de que en la oveja tienen lugar ondas de crecimiento de los folículos dominantes. Mediante técnicas de marcaje folicular con tinta, se ha mostrado en la oveja que los folículos mayores de 4 mm. de diámetro se renuevan al menos 2 veces (e incluso 3 veces) durante un ciclo estral normal (Mariana *et al.*, 1991).

En ovejas Texel, tuvieron lugar a lo largo del ciclo estral 2 ondas de crecimiento folicular en los folículos normales con un volumen mayor de 1 mm. cúbico. La primera onda sucede entre los días 1 y 10 del ciclo y la segunda desde el día 6 hasta el día 1 del siguiente ciclo (Brang and De Jong, 1973).

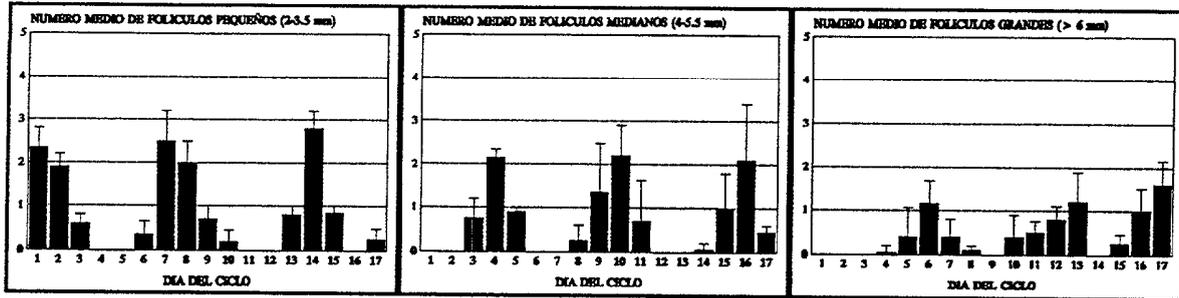


Figura 2.9. Frecuencia media ( $\pm$  e. estándar) de la distribución de folículos pequeños, medianos y grandes en el ovario durante el ciclo estral en ovejas Suffolk (ovulación = día 17).

En la raza Suffolk, mediante la utilización de técnicas endoscópicas, se han descrito tres oleadas de crecimiento folicular en folículos mayores de 2 mm. de diámetro a lo largo del ciclo sexual: dos tienen lugar durante la fase luteal (iniciándose una en los días 1-2 del ciclo, y la otra en los días 7-8) donde todos los folículos sufren atresia y una durante la fase folicular (iniciándose el día 14) donde sólo uno o dos de los folículos llegan a ovular; cada una dura unos 6 días, siendo la que se produce durante la fase folicular algo más breve (Noel *et al.*, 1993). No se observan diferencias en el número medio de folículos pequeños, medianos y grandes en crecimiento a lo largo de las ondas, sin embargo, el tamaño medio alcanzado por los folículos más grandes en la 3ª onda (onda ovulatoria) fue significativamente mayor (Noel *et al.*, 1993). Estos resultados no sustentan la teoría de que la aparición de folículos ováricos es continua e independiente de la fase del ciclo (Turnbull *et al.*, 1977; Lahlou-Kassi and Mariana, 1984; Yenikoye *et al.*, 1989).

Por lo tanto, no se observan diferencias en el número medio de folículos durante la fase folicular y la fase luteal del ciclo estral, a partir de 1 mm. (Brand and De Jong, 1973) o de 2 mm. de diámetro (Yenikoye *et al.*, 1989; Noel *et al.*, 1993; Ravindra *et al.*, 1994). Sin embargo, en la raza Ile de France se ha observado la existencia de un mayor número de folículos en crecimiento durante la fase folicular que durante la fase luteal del ciclo (Driancourt *et al.*, 1988).

Por lo general, no se aprecian diferencias en el número total de folículos antrales entre razas con diferentes tasas de ovulación (Lahlou-Kassi and Mariana, 1984; Driancourt *et al.*, 1985; Castonguay *et al.*, 1990). Sin embargo, se ha descrito un menor número de folículos  $> 1$  mm. de diámetro en la raza Finnish Landrace que en la menos prolífica Merino x Scottish Blackface (Webb *et al.*, 1989), mientras que en Romanov la población folicular creciendo es mayor que en Ile de France (Cahill *et al.*, 1979).

Por otro lado, Scrick *et al.* (1993) mediante la utilización de la ecografía concluyen que la aparición de folículos por encima de los 2 mm. de diámetro era continua e independiente a lo largo del ciclo estral pero con un pico que acontecía tras la luteolisis. Ravindra *et al.* (1994) utilizando técnicas ecográficas en ovejas Western White-Face, sugieren que el crecimiento folicular antral ( $> 2$  mm. de diámetro) y la regresión folicular ocurre en la mayoría de los días del ciclo estral, si bien existen dos picos significativos en la aparición de los folículos alrededor de los días 2 y 11 del ciclo.

Fortune *et al.* (1991) trabajando en novillas, observan que cuando los ovarios están expuestos a concentraciones basales de gonadotropinas, se produce una onda de maduración folicular aproximadamente cada 7 días. Las novillas con ciclos más cortos, o con ciclos en los que la 2ª onda de desarrollo folicular comienza varios días más tarde que la media, tendrán dos, en lugar de tres ondas de desarrollo folicular. Los animales que presentan dos ondas, tienen ciclos y fases luteales significativamente más cortos. Ginther *et al.* (1989a) también encuentra que la fase luteal es significativamente más corta en las novillas con 2 ondas de desarrollo folicular. Entre ciclos con 2 y 3 ondas, no existen diferencias en el intervalo entre la regresión del cuerpo lúteo y la ovulación.

Si se alarga experimentalmente la fase luteal del ciclo, colocando intravaginalmente dispositivos liberadores de progesterona (Sirois and Fortune, 1989; Fortune *et al.*, 1991), y

de esta forma se consiguen niveles de progesterona típicos de la fase luteal, se observa que la mayoría de los animales presentan más de tres ondas de maduración folicular.

Webb *et al.* (1989) trabajando con razas ovinas prolíficas, observan que la selección folicular de la onda de maduración folicular acontece fundamentalmente en la fase folicular. En razas menos prolíficas, esta fase de selección, aun produciéndose también fundamentalmente en fase folicular, hay un mayor porcentaje de selección coincidiendo con el final de la fase luteal. Por tanto, parece probable que en razas ovinas prolíficas, el mecanismo(s) que regula los procesos de maduración folicular, difiere del mecanismo presente en razas menos prolíficas y que este mecanismo guarde relación con la presencia de cuerpo lúteo.

### **2.2.4.3. Diferencias en el crecimiento folicular terminal en razas de diferente prolificidad a lo largo del ciclo estral**

El número de folículos reclutados y que están presentes en la fase luteal tardía es similar tanto para razas de alto nivel prolífico como de bajo nivel prolífico. En la primera parte de la fase folicular que se inicia a continuación sigue siendo similar, y es durante el estro cuando se nota diferencia entre el número de folículos preovulatorios de ambos tipos raciales (Webb *et al.*, 1989). Así, es durante la fase folicular cuando se realiza la selección definitiva de los folículos que van a completar su maduración y que por lo tanto van a ovular. En las razas poco prolíficas, es pues, una vez iniciada la fase folicular cuando un número considerable de folículos sufren atresia, quedando tan sólo uno, o en todo caso dos folículos, aptos para la ovulación.

En las razas muy prolíficas la fase proliferativa de las células de granulosa es más corta, de modo que los folículos que completan su maduración son folículos más pequeños que los de razas poco prolíficas, con menor número de células de granulosa, pero teniendo éstas una mayor capacidad aromatizante (Webb *et al.*, 1989).

En las ovejas de alta tasa de ovulación hay diferencias en la diferenciación morfológica y funcional de los folículos ovulatorios, así tenemos que comparando razas de elevada tasa de ovulación con otras de menor tasa ovulatoria se observa:

### a) Un amplio período de selección:

En las razas prolíficas (Finesa, Booroola) se aprecia que hay mayor proporción de folículos seleccionados durante la fase folicular que en razas poco prolíficas, siendo en este caso seleccionados los folículos, en su casi totalidad, durante la fase luteal (Driancourt *et al.*, 1985; Bindon and Piper, 1986; Webb *et al.*, 1989). La selección durante la fase folicular que se observa en los genotipos prolíficos Booroola puede ser muy tardía: hasta varias horas después del comienzo del celo (Castonguay *et al.*, 1990).

La capacidad para seleccionar folículos en estado tardío de la fase folicular se relaciona con un diámetro folicular menor (Driancourt *et al.*, 1985; McNatty *et al.*, 1985; Webb and Gauld, 1985; Webb *et al.*, 1989; Castonguay *et al.*, 1990).

Este menor diámetro folicular de las ovejas prolíficas, se relaciona con un menor número de células de granulosa por folículo (Baird *et al.*, 1982; Scaramuzzi and Radford, 1983; Driancourt *et al.*, 1985, 1986; McNatty *et al.*, 1985; Webb *et al.*, 1989). No obstante, en Romanov no se ha encontrado un menor número de células de granulosa por folículo preovulatorio respecto a las razas no prolíficas (Driancourt and Fry, 1988).

**b) Capacidad incrementada de las células de granulosa para secretar estradiol**

La producción *in vitro* de estrógenos por célula de granulosa es mayor en la oveja Finnish Landrace que en otras razas de menor tasa de ovulación (Webb *et al.*, 1989). Sin embargo, esta mayor eficacia en la producción de estrógenos no se aprecia en otras razas prolíficas, como la Booroola (McNatty *et al.*, 1986a). De hecho, la mayor tasa de ovulación de la oveja Booroola homocigótica del gen F (FF) respecto a la no portadora (++) no se debe a diferencias genéticas en la sensibilidad del eje hipotálamo-hipofisario a las hormonas ováricas. Es decir, no hay diferencias genotípicas en los efectos de feed-back positivo y/o negativo de los esteroides ováricos como sí ocurre entre las razas Finnish Landrace y Scottish Blackface (Webb *et al.*, 1985; McNatty *et al.*, 1989). Esto indica que los mecanismos que controlan la diferenciación celular pueden ser diferentes incluso entre razas de alta tasa ovulatoria.

Esta capacidad incrementada para secretar estradiol de cada célula de granulosa compensa el menor número de células presentes, lo cual hace que la producción global de estradiol por folículo no manifieste diferencias inter-raciales (Webb *et al.*, 1989; Driancourt and Hanrahan, 1991).

**c) Índice mitótico reducido**

El bajo número de células de granulosa en ovejas Finesa-Landrace puede estar relacionado con un índice mitótico reducido (Webb *et al.*, 1989).

El crecimiento de los folículos pequeños (0.15-1 mm. de diámetro) se estimula por la aplicación exógena de FSH, independientemente del genotipo. Sin embargo, cuando está presente el gen Booroola, estos mismos folículos manifiestan mayor sensibilidad a la FSH

en lo que respecta a la producción de estradiol (Boulton *et al.*, 1992). Estos resultados plantean la hipótesis de que en razas no prolíficas la fase proliferativa es más larga que en las prolíficas (ovejas con gen Booroola); al ser más larga tardan más en aparecer las características diferenciadoras, tales como la adquisición de una sensibilidad aromatizante. En las ovejas con gen Booroola, al presentar una actividad mitótica más corta, las células de granulosa pronto empiezan a diferenciarse, y por ello, ya en un estado de folículo pequeño (< 1 mm. de diámetro) encontramos capacidad aromatizante estimulada por la FSH.

**d) Mayor sensibilidad a las gonadotropinas**

La diferencia de niveles de FSH entre la fase luteal y folicular es menor en la oveja Romanov que en razas no prolíficas, Ile-de-France (Driancourt *et al.*, 1988). Las diferencias en las concentraciones de gonadotropinas entre ambas razas, durante la fase folicular, no juegan un papel importante en la alta tasa de ovulación de la Romanov, atribuyéndose esta mayor capacidad ovulatoria a la existencia de una mayor sensibilidad ovárica a la FSH, y a posibles diferencias en los mecanismos de feed-back (Driancourt *et al.*, 1988; Fortune *et al.*, 1991).

**e) Mayor flujo capilar**

En la oveja Romanov hay un mayor flujo capilar en folículos de 1-3 mm. de diámetro en comparación con la Pre-Alpes, raza con tasa de ovulación menor (Brown and Driancourt, 1989). Este mayor flujo capilar puede ser importante para facilitar el reclutamiento de un mayor número de folículos (Driancourt *et al.*, 1986). Posiblemente una mayor producción de sustancias angiogénicas, tales como el FGF (Fibroblast Growth Factor) o una mayor sensibilidad de los folículos ováricos de la Romanov a estas sustancias puede explicar el mayor flujo capilar en los folículos menores de esta raza (Brown and Driancourt, 1989).

### 2.2.5. DESARROLLO FOLICULAR DURANTE EL ANOESTRO

El patrón de secreción y los niveles de gonadotropinas durante los períodos anteriores a la pubertad y durante el anoestro estacional están bien caracterizados en ovino (Mariana *et al.*, 1991).

Durante el anoestro estacional profundo, el crecimiento folicular se desacelera y el grado de atresia en folículos esta incrementado considerablemente. La reducción de la secreción de gonadotropinas durante el anoestro induce dos situaciones: atresia incrementada en folículos preantrales en crecimiento y una reducción significativa en su número (Mariana *et al.*, 1991).

En anoestro, la ovulación de folículos puede ser activada bien con una única inyección de LH, a la dosis adecuada para generar unos niveles plasmáticos similares a los propios del pico preovulatorio de LH (McNeilly *et al.*, 1982) o con una frecuencia constante de GnRH (McLeod *et al.*, 1982a, b), si bien en el primer caso no se observan cambios importantes sobre la dinámica folicular. El tratamiento con GnRH mantuvo las concentraciones plasmáticas de FSH por encima de los niveles basales, lo que sostiene la idea de que el crecimiento del folículo ovulatorio en anoestro es dependiente de la FSH (McNeilly *et al.*, 1991).

La tasa de ovulación y la formación de un cuerpo lúteo normal en ovejas en anoestro, es mayor cuando además de la inyección única de LH, existe un tratamiento conjunto con FSH (McNeilly *et al.*, 1985; Wallace and McNeilly, 1986). La supresión de FSH por la administración de fluido folicular bovino (BFF) durante el tratamiento de ovejas anoéstricas con GnRH pulsátil, previene la ovulación en ovejas (McLeod and McNeilly, 1987) o la retrasa en novillas (Fortune *et al.*, 1991), siendo claramente indicativo de la necesidad de

FSH para el crecimiento normal del folículo durante el anoestro (McNatty *et al.*, 1985b; Hunter *et al.*, 1988).

Parece probable que la secreción pulsátil de LH actúa básicamente sobre los folículos que ya estaban presentes y no induce la formación de nuevos folículos ovulatorios (McNeilly *et al.*, 1991). De ahí el hecho del bajo porcentaje de ovejas que ovulan cuando sólo se les administra LH, en comparación al resultado que se obtiene al administrar pulsos de GnRH o un tratamiento conjunto LH/FSH (McNeilly *et al.*, 1985; Wallace and McNeilly, 1986; Driancourt and Fry, 1988).

El modelo cíclico de crecimiento folicular y atresia observado durante la estación reproductiva también se encuentra presente durante el período del anoestro. En ovejas Suffolk se ha comprobado la existencia de ondas de maduración folicular con una duración media de 6 días y los folículos llegaban a alcanzar un tamaño de 5 mm. de diámetro (Noel *et al.*, 1993).

Las diferencias genéticas en el crecimiento folicular que controlan la tasa de ovulación son todavía funcionales durante el anoestro estacional (Webb *et al.*, 1992). Este hecho se encuentra sustentado por los siguientes puntos:

1. Durante el anoestro estacional, las ovejas de razas más prolíficas tienen un mayor número de folículos estrógenos-activos que las ovejas de más baja tasa de ovulación (Webb *et al.*, 1992).

2. Los folículos estrógeno-activos de las razas más prolíficas tienen un menor diámetro folicular que el de las razas menos prolíficas (Webb *et al.*, 1992), sugiriendo que

los folículos ovulatorios de las razas con mayor tasa de ovulación, se seleccionan con un diámetro menor, como ocurre en la estación reproductiva (Webb *et al.*, 1989).

3. Los folículos estrógeno-activos de ambas razas poseen más células de granulosa, mayores concentraciones de estradiol en el líquido folicular y más receptores de LH en las células tecales y de granulosa que los folículos estrógeno-inactivos (Webb *et al.*, 1992).

4. Las células de granulosa de los folículos estrógeno-activos de ovejas prolíficas producen más estradiol, a pesar de que tenían menor producción de testosterona *in vitro* que la raza con tasa de ovulación inferior (Webb *et al.*, 1992).

5. El mecanismo que controla el número de folículos estrógeno-activos es sensible a la ovariectomía unilateral; se produce una duplicación del número de folículos en el ovario remanente (Webb *et al.*, 1992). Este mecanismo parece ser independiente de incrementos en las concentraciones de gonadotropinas, tanto en época reproductiva (Fry *et al.*, 1987), como en anoestro estacional (Findlay and Cummmnig, 1977; Webb *et al.*, 1992).

|                             |                               | ESTRADIOL (pg/ml/h) |           |           |                        |
|-----------------------------|-------------------------------|---------------------|-----------|-----------|------------------------|
|                             |                               | < 20                | 20-100    | 100-500   | > 500                  |
| Finnish Landrace<br>(n=9)   | Nº total de folículos         | 16                  | 10        | 13        | 31                     |
|                             | Nº medio de folículos/oveja   | 1.8 ± 0.5           | 1.1 ± 0.4 | 1.4 ± 0.3 | 3.4 ± 0.6 <sup>a</sup> |
|                             | Diámetro folicular medio (mm) | 3.2 ± 0.2           | 3.1 ± 0.4 | 4.0 ± 0.4 | 3.7 ± 0.2 <sup>a</sup> |
| Scottish Blackface<br>(n=7) | Nº total de folículos         | 14                  | 22        | 10        | 14                     |
|                             | Nº medio de folículos/oveja   | 2.0 ± 0.5           | 3.1 ± 0.4 | 1.4 ± 0.4 | 2.0 ± 0.4 <sup>b</sup> |
|                             | Diámetro folicular medio (mm) | 3.2 ± 0.3           | 3.6 ± 0.3 | 3.9 ± 0.4 | 4.7 ± 0.3 <sup>b</sup> |

<sup>a,b</sup> Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Los números entre paréntesis representan el total de ovejas de cada raza

Tabla 2.1. Distribución de la población folicular en dos razas ovinas, durante el anoestro estacional, basado en la producción *in vitro* de estradiol (Webb *et al.*, 1992).

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

### 3.1. CARACTERIZACIÓN DEL CICLO SEXUAL

#### 3.1.1. ANIMALES

En el presente estudio, se utilizaron animales de la especie ovina (n=8), pertenecientes a la raza Canaria. Las hembras eran adultas, multíparas y con un peso que oscilaba entre 35-45 kg, y en un buen estado de nutrición. Los animales se estabularon en alojamientos situados en las instalaciones de la Granja Agrícola Experimental del Cabildo Insular de Gran Canaria (latitud 28° N, longitud 15° O), situados en el término municipal de Arucas (Las Palmas). La dieta alimentaria consistió en una ración diaria de maíz (400 g), salvado de trigo (300 g), así como una ración de volumen (forraje) y agua *ad libitum*.

Antes del inicio de la experiencia, los animales se examinaron para comprobar su estado sanitario, observándose que se encontraban en un buen estado de salud y fueron desparasitados (Bayverm Armadose®, BAYER).

La experiencia se llevó a cabo durante los meses de Octubre y Noviembre de 1993, en plena estación reproductiva. Previamente se había comprobado la ciclicidad de estos animales, determinando la aparición de celos y ovulaciones.

#### 3.1.2. SINCRONIZACIÓN DE CELOS

Las ovejas se sincronizaron mediante la colocación de esponjas intravaginales impregnadas con acetato de fluorogestona (30 mg FGA, Chrono-gest®, INTERVET) durante 14 días; trascurrido este tiempo se retiraron las esponjas y se procedió a la aplicación vía intramuscular, de 1 ml de análogo de prostaglandina (Luprostiol, Prosolvin®, INTERVET).

### **3.1.3. EXTRACCIÓN DE SANGRE**

Las extracciones de sangre se realizaron mediante punción de la vena yugular y se recogieron en tubos heparinizados con vacío de 5 ml. (Venoject®, TERUMO); en un periodo de tiempo inferior a 45 minutos desde la extracción, los tubos se centrifugaron a 2000xg durante 15 minutos en una centrífuga programable Kubota 5100 provista de rotor con cabeza basculante. El plasma obtenido de cada muestra se depositó mediante pipetas Pasteur desechables en tubos Eppendorf de 1,5 ml. convenientemente etiquetados; inmediatamente se almacenaron a -12 °C en un congelador Sidex T-1415B hasta el final de la experiencia y después a -70 °C en un arcón congelador JOUAN VX-350 hasta el momento de las determinaciones hormonales.

### **3.1.4. DETERMINACIONES HORMONALES**

Para determinar la duración de las fases progesterónica y no progesterónica, se realizaron extracciones diarias de sangre desde el día de la retirada de las esponjas intravaginales hasta la ovulación del ciclo siguiente al sincronizado.

Los niveles de progesterona en las muestras de plasma se determinaron en el laboratorio de Reproducción del Departamento de Producción Animal del Servicio de Investigación Agraria de la Diputación General de Aragón, mediante radioinmunoanálisis de doble anticuerpo, previa extracción con éter petróleo según el método descrito por Beckers *et al.* (1975) modificado posteriormente en su laboratorio. La curva estándar se realizó en plasma libre de esteroides a partir de una disolución concentrada (756 ng/ml) de progesterona (MERCK, 3735) en agua destilada.

Para separar las fases acuosa y orgánica, se añadieron 3 ml de éter petróleo 60-80° (PANREAC, PA 1322701) a cada 200  $\mu$ l de estándares, muestras y plasma libre de esteroides y se agitaron durante 15 minutos en agitador multivortex (SMI VORTEXER 2601, American Dade). La fase acuosa se congeló por inmersión en nitrógeno líquido durante 10 segundos. La fase orgánica, que contiene la progesterona, se decantó en tubos de cristal; el residuo orgánico se evaporó (Evaporador BIOMERIEUX, 66560) bajo corriente de aire (Bomba MILLIPORE) dentro de un baño a 37° C. A continuación el extracto de progesterona se disolvió mediante adición de 300  $\mu$ l de una disolución de progesterona marcada con Iodo-125 (27205  $\pm$  293 CPM) a 37° C y se agitó durante 5 minutos en agitador multivortex. A continuación se añadieron 100  $\mu$ l de una disolución de anticuerpo desarrollado en conejo contra P4-11- $\beta$ -hemisuccinato-BSA. La mezcla se incubó durante unas horas a temperatura ambiente y durante toda la noche a 4° C. A la mañana siguiente se añadieron 100  $\mu$ l de una disolución de 25 mg/ml de un segundo anticuerpo, previamente acoplado a celulosa activada (CAL: *Cellulose Anti-Lapin*); se dejó incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos y se añadieron 2 ml de suero fisiológico (CINa, 9 g/l). Se centrifugaron los tubos a 4° C y 1500 x g durante 15 minutos. Tras retirar el sobrenadante, el precipitado se analizó en contador de centelleo para radiación gamma (LKB-WALLAC, Compugamma 1282). El tampón utilizado durante el análisis fue tampón fosfato (0,1 M, pH=7) en CINa 0,15 M y gelatina (1 g/l). Los coeficientes de variación intra e interanálisis para una muestra de 7, 12 ng/ml fueron 23,47 y 32,30% respectivamente. La sensibilidad fue de 0,46 ng/ml.

Para la determinación del momento y magnitud del pico preovulatorio de LH, se realizaron extracciones de sangre cada 4 horas, desde 26 h. después de la retirada de las esponjas intravaginales y hasta constatar la ovulación mediante laparoscopias diarias.

La determinación de LH por radioinmunoanálisis se realizó en el Servicio de Dosificación de la Estación de Fisiología de la Reproducción del INRA-Tours, utilizando el

método descrito por Pelletier *et al.* (1968). El momento del pico de LH fue asignado a la concentración máxima de LH detectada por radioinmunoanálisis. El antisuero anti-LH se obtuvo a partir de cobayas inyectadas con LH-M<sub>1</sub>. El segundo anticuerpo fue suero anti-cobaya obtenido por inmunización de una yegua. La separación del complejo antígeno-anticuerpo se realizó por inmunosupresión. Las reacciones cruzadas con otras hormonas hipofisarias siempre fue menor al 1% de la actividad LH. El coeficiente de variación intraanálisis fue del 14.4, 3.6 y 11.9%, en los niveles bajo, medio y alto, respectivamente. La sensibilidad fue de 0.1 ng/ml.

El área del pico preovulatorio de LH fue calculado como el sumatorio de los trapecios que constituyen dicho área bajo la curva. El nivel basal se determinó tomando como referencia los valores máximos de LH no incluidos en la estimación del área, de tal forma que consideramos que la onda de LH comenzaba cuando los niveles se encontraban por encima de 5 ng/ml (Baird and McNeilly, 1981).

### **3.1.5. DETECCIÓN DE CELOS**

La detección de los celos se realizó mediante la utilización de un carnero adulto, provisto de mandil para evitar la fecundación accidental de las ovejas. Durante las detecciones de celo, el carnero se colocó en un local independiente y se introdujeron de forma individual las hembras durante un periodo de tiempo suficiente para poder valorar adecuadamente el comportamiento tanto del macho como de la hembra.

Para determinar el momento de aparición y la duración de los celos, se efectuaba un chequeo cada 12 horas, desde las 24 horas de la retirada de las esponjas intravaginales hasta que hubieron transcurrido 24 horas desde el último chequeo negativo. Se consideró el comienzo de la receptividad sexual 6 horas antes del primer chequeo en que el carnero

efectuó al menos un salto con movimientos coitales, permaneciendo la oveja inmóvil, y el final 6 horas antes del primer chequeo en que la hembra ya no permanecía inmóvil ante el salto del macho.

En cada chequeo se valoraron los aspectos del comportamiento (tanto del macho como de la hembra) reflejados en el Cuadro I.

| CUADRO I. ASPECTOS VALORADOS EN EL COMPORTAMIENTO SEXUAL |                        |
|--|------------------------|
| COMPORTAMIENTO ♂   | COMPORTAMIENTO ♀       |
| ATRACCIÓN  | BÚSQUEDA DEL MACHO     |
| OLFATEO  | COLETEO                |
| LAMETONES  | MICCIÓN                |
| MANOTAZOS  | BALIDOS                |
| <i>FLEHMEN</i>   | INMOVILIDAD AL CORTEJO |
| SALTO  | INMOVILIDAD AL SALTO   |

### **3.1.6. OBSERVACIÓN LAPAROSCÓPICA**

Para detectar el momento de ovulación y para definir la tasa de ovulación se realizaron series de exploraciones laparoscopias diarias, desde 24 horas tras la retirada de las esponjas hasta constatar la ovulación.

La observación laparoscópica se realizó mediante un equipo Storz con telescopio recto Hopkins de °0 con visión ampliada, de 5 mm. de diámetro, transmisión de luz por fibra óptica incorporada, fuente de luz fría de 250 W., insuflador automático de CO<sub>2</sub> para pneumoperitoneo, sistema para endovisión TV-video modelo 2010 P/N con cámara miniaturizada CCD y monitor PECONIC de 14".

Las hembras mantuvieron una dieta de unas 12 horas previa a la intervención.

Las ovejas se colocaron en posición de decúbito dorsal sobre una camilla de intervención laparoscópica, y fueron inmovilizadas. La preparación quirúrgica consistió en el afeitado de las regiones umbilical y púbica, seguido del lavado con jabón quirúrgico, aplicación de solución yodada desinfectante y colocación de paños quirúrgicos sobre el campo operatorio. A continuación se inclinó la camilla 20-30 °, situando a la hembra en la posición de Trendelenberg, con el objeto de desplazar los órganos abdominales en dirección craneal y facilitar la localización de los ovarios. A continuación, se determinaron los lugares para las punciones, con el criterio de eludir la cercanía de las venas mamarias y otros vasos importantes de la zona. Posteriormente, se procedió a la anestesia local por infiltración subcutánea de 1 ml. de lidocaína clorhidrato 2 % (Xilocaina Ovejero®) en cada lugar de punción.

En primer término se introdujo la aguja de Veress, en la zona craneal de la región púbica izquierda, con el objeto de realizar el pneumoperitoneo inicial. Previamente se realizó una palpación de la pared abdominal para valorar la profundidad necesaria para la inserción de la aguja. Al penetrar la aguja se percibe un claro *click* al atravesar la pared muscular; para determinar la posición correcta de la aguja dentro de la cavidad peritoneal y evitar el riesgo de que el peritoneo se distienda en forma de *tienda de campaña* al ser empujado por el extremo de la aguja, antes de comenzar la insuflación de CO<sub>2</sub>, la aguja se debe mover desde su mango haciendo que describa un amplio círculo dentro de la cavidad peritoneal.

Después se realiza aspiración con una jeringa de 10 ml., cuyo émbolo debe retornar como consecuencia de la presión negativa; si se aspira sangre o contenido intestinal, se rectifica la posición incorrecta de la aguja. Una vez asegurada la correcta colocación, se comenzaba la insuflación de CO<sub>2</sub>, inicialmente con un flujo equivalente a 15 mm. de Hg y una vez alcanzada una presión intraabdominal cercana a 10 mm. de Hg, se regulaba a la

posición de flujo constante (10 mm. de Hg). Si al comenzar la insuflación la presión era muy superior a 15 mm. de Hg, era indicativo de que el extremo de la aguja no estaba libre. Una vez estabilizada la presión intraabdominal a 10 mm. de Hg, se procedió a la inserción de los trócares de punción. Los trócares de punción tienen un extremo cónico biselado que permite una penetración más controlada de los tejidos parietales; son huecos y tienen un orificio cercano a su extremo cónico y otro en el mango; en el de trocar de primera punción, la vaina posee sistema valvular de trompeta y una entrada para introducir CO<sub>2</sub>, mientras que en la vaina del trocar de segunda punción el sistema es de válvula automática.

El trocar y vaina de primera punción (para el laparoscopio) se introdujeron tras realizar la correspondiente incisión de unos 10 mm. de longitud afectando a piel y tejido subcutáneo, a unos 5 cm. de la ubre en dirección craneal y a 3-6 cm. a la izquierda de la línea media, según la situación de las venas mamarias. El trocar con su vaina se coge con la mano derecha con su extremo proximal firmemente presionado contra la palma de la mano. Para introducirlo a través de la pared abdominal, se efectúa presión con la muñeca y movimientos rotatorios sucesivos en dirección ligeramente caudal; la presión ejercida por la palma de la mano impide que el trocar se deslice por la vaina al encontrar resistencia a la penetración; los agujeros del trocar permiten la salida inmediata de CO<sub>2</sub> tan pronto como se alcanza la cavidad peritoneal, produciéndose un silbido característico; en ese momento se retiraba el trocar antes de introducir un poco más la vaina. La vaina de segunda punción (para la varilla palpadora) posee válvula automática y se introducía en el lado derecho, con su trocar correspondiente, de forma análoga al de primera punción, visualizando este procedimiento con la óptica introducida por la vaina del trocar de primera punción.

Se comenzó la endoscopia por observación directa; una vez localizados los ovarios, se adaptó la cabeza de la cámara a la óptica, visualizando el campo a través del monitor. Mediante el uso de la varilla palpadora se realizó el volteo y cuidadosa observación de toda

la superficie en ambos ovarios, para la detección de cuerpos hemorrágicos (en la determinación del momento de ovulación) o de cuerpos lúteos (en la determinación de la tasa de ovulación).

Finalizada la exploración laparoscópica, se procedió a la extracción de la óptica, varilla palpadora, vainas de los trócares y aguja de Veress; tras colocar la camilla en posición horizontal se efectuó la sutura de la piel con seda trenzada (n.2 USP, PALEX®) aplicando un punto en cada lugar de punción con trócar. Por último, se aplicaron sulfamidas en polvo sobre las incisiones y un spray de solución yodada, así como un preparado antibiótico (Bencilpenicilina-Dihidroestreptomicina: Dipenisol Retard®, BAYER) por vía intramuscular profunda a dosis terapéuticas para prevenir infecciones post-operatorias. Tras colocar a la hembra en el suelo, se aseguró que presentara un estado general satisfactorio tras la intervención.

### **3.1.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Las variables cualitativas se compararon utilizando el método de Chi-cuadrado, aplicando si era preciso la corrección de Yates o el test exacto de Fisher. Las variables cuantitativas (de tipo continuo), se analizaron mediante la comparación de medias *t* de Student.

### 3.2. DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD FOLICULAR

#### 3.2.1. ANIMALES

En el presente estudio, se utilizaron animales de la especie ovina (n=9), pertenecientes a la Raza Canaria. Las hembras eran adultas y multíparas, con un peso que oscilaba entre 35-50 kg, y en un buen estado de nutrición. Los animales se estabularon en alojamientos situados en las instalaciones de la Granja Agrícola Experimental del Cabildo Insular de Gran Canaria (latitud 28° N, longitud 15° O), situados en el término municipal de Arucas (Gran Canaria). La ración alimentaria diaria consistió en una ración de maíz (400 g), salvado de trigo (300 g), así como una ración de volumen (forraje) y agua *ad libitum*.

Antes del inicio de la experiencia, los animales se examinaron para comprobar su estado sanitario, observándose que se encontraban en un buen estado de salud y fueron desparasitados (Bayverm Armadose®, BAYER).

La experiencia se llevó a cabo durante el mes de Diciembre de 1993, en plena estación reproductiva. Por otro lado, otras experiencias previas habían demostrado que estos animales estaban cíclicos, comprobándose la aparición de celos y ovulaciones.

#### 3.2.2. SINCRONIZACIÓN DE CELOS

Las ovejas se sincronizaron mediante la colocación de esponjas intravaginales impregnadas con acetato de fluorogestona (30 mg FGA, Chrono-gest-R®, INTERVET) durante 14 días; transcurrido este tiempo se retiraron las esponjas y se procedió a la aplicación vía intramuscular, de 1 ml de análogo de prostaglandina (Luprostiol, Prosolvin®, INTERVET).

### **3.2.3. DETECCIÓN DE CELOS**

La detección de los celos se realizó mediante la utilización de un carnero adulto, provisto de mandil para evitar la fecundación accidental de las ovejas. Durante las detecciones de celo, el carnero se colocó en un local independiente y se introdujeron de forma individual las hembras durante un período de tiempo suficiente para poder valorar adecuadamente el comportamiento tanto del macho como de la hembra.

Se determinó la presencia o ausencia de celo, mediante chequeos cada 24 horas desde el momento de la retirada de las esponjas intravaginales, hasta la ovariectomía.

### **3.2.4. OVARIECTOMÍAS**

Considerando el día de la retirada de las esponjas como día 0, se realizaron ovariectomías bilaterales sucesivas los días 1 (n=3), 2 (n=3) y 3 (n=3). Los animales sometidos a ovariectomía cada día fueron elegidos al azar. Las hembras mantuvieron una dieta de 12 horas previa a la intervención.

El modelo anestésico consistió en una sedación y analgesia previa mediante xilazina clorhidrato (Rompum® 2%, BAYER), a dosis de 0.2-0.3 ml/animal vía intramuscular; posteriormente se realizó una anestesia paravertebral, infiltrando 1 ml. de lidocaína clorhidrato al 2% (Xilocaína Ovejero®) en los espacios intervertebrales L-1, L-2, L-3, L-4 y L-5 de ambos lados. Por último, se realizó una anestesia local de la zona a incidir (línea media) con el mismo preparado, por infiltración subcutánea en tres puntos diferentes a cada lado de la línea media, inmediatamente cranial a la inscripción mamaria y con una distancia de 2-3 cm entre sí. También se administró 1 mg de atropina (Atropina Braun®) vía intramuscular.

Los animales se colocaron en decúbito dorsal sobre una camilla de intervención quirúrgica y fueron inmovilizadas. La preparación quirúrgica consistió en el afeitado de las regiones umbilical y púbica, seguido del lavado con jabón quirúrgico, aplicación de solución yodada desinfectante y se colocaron paños quirúrgicos sobre el campo operatorio.

Mediante bisturí, se incidió la piel en la línea media, inmediatamente craneal a la inserción mamaria y con una longitud de 8-12 cm. Se realizó disección del tejido subcutáneo hasta que se alcanzó la línea alba, utilizando tijeras de punta roma. Se abrió la cavidad abdominal utilizando unas tijeras de disección cerradas para hacer una pequeña incisión en la línea alba. A continuación, se utilizaron unas tijeras rectas, con la hoja inferior apoyada en la cara interna de la línea media e inclinada hacia arriba, para la apertura de la línea alba, previniendo posibles traumatismos. En ese momento, se inclinaba la camilla de 20 a 30°, situando a la hembra en la posición de Trendelenberg, con el objeto de desplazar los órganos abdominales en dirección craneal y facilitar la localización de los ovarios.

Una vez localizados los ovarios, se desgarró el ligamento propio del ovario y se practicó un ojal en el mesovario con tijera roma junto a la arteria y vena ováricas. Se colocaron tres pinzas de hemostasia curvas (*Pean*) sobre el pedículo que contenía la arteria y vena ováricas, situando las pinzas con las puntas dirigidas hacia arriba. Se seccionó la parte del pedículo que contenía la arteria y vena ováricas entre la pinza media y la superior, extrayendo el ovario que se sumergió inmediatamente en una solución de formaldehído al 10%. A continuación, se practicó una ligadura trasfixante de material de sutura absorbible (Catgut crómico n. 2 USP, PALEX®) proximalmente a la pinza inferior. La primera lazada se anudó hasta sentir la resistencia a la deformación del pedículo; entonces se liberó la pinza inferior manteniendo la tracción sobre la ligadura, con lo que se consiguió anudar la ligadura al máximo. Se terminó de fijar en la forma habitual con dos nudos más, manteniendo el pedículo en la misma posición con la pinza media. El resto del pedículo, que no incluye la

arteria y vena ováricas, se ligó mediante un punto en masa o trasfixante en función de su tamaño, o del número de vasos que contuviera.

Para evitar que la ligadura del muñón se deslizara, al seccionar el pedículo se dejaba una cantidad de tejido suficiente por encima de la ligadura. Una vez comprobado que ningún punto del muñón sangraba se cortaron los cabos de las ligaduras y se extrajeron las pinzas, con lo que el muñón se retrae hacia el interior de la cavidad abdominal. La pared abdominal y el tejido subcutáneo se suturaron con puntos sueltos, utilizando sutura reabsorbible (Catgut crómico n. 2 USP, PALEX®). La piel se suturó con puntos sueltos de seda (n. 2 USP, PALEX®).

Por último, se aplicaron sulfamidas en polvo y solución yodada sobre las incisiones, y se administró un preparado antibiótico por vía intramuscular profunda, a base de Bencilpenicilina y Dihidroestreptomicina (Dipenisol Retard®, BAYER).

### **3.2.5. PREPARACIÓN HISTOLÓGICA**

Una vez extraídos, los ovarios se fijaron por inmersión en formol tamponado al 10 %. Las muestras en formaldehído permanecieron un mínimo de 18-24 horas antes de su procesado histológico, si bien durante este período se realizó la disección individualizada de todos aquellos folículos con un tamaño superior a 1 mm. de diámetro.

#### **3.2.5.1 Disección folicular**

Se disecaron todos aquellos folículos mayores de 1 mm. de diámetro utilizando material de microcirugía, liberándolos del estroma ovárico de manera similar a lo realizado

por otros autores (Webb *et al.*, 1989; McNatty *et al.*, 1985, 1990). Todas las operaciones se realizaban con los ovarios sumergidos en una solución de formaldehído al 10 %.

Tras la disección, se estableció el número total de folículos y los folículos obtenidos se clasificaron en tres categorías: folículos pequeños (1-2 mm. de diámetro), medianos (2-4 mm. de diámetro) y grandes (> 4 mm. de diámetro).

### 3.2.5.2. Técnicas histológicas empleadas

Una vez fijados, los folículos se procesaron según el método habitual de inclusión para microscopía óptica en la Unidad de Histología y Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinaria de Las Palmas de Gran Canaria. Los folículos se procesaron en un procesador de tejidos (Histokinette 2000, Reichert-Jung, Alemania), se incluyeron en parafina y se cortaron de manera seriada a 3-4  $\mu$  de grosor. Dichos cortes se recogieron en un baño termostático (Selecta, modelo 101932) y se fijaron al portaobjetos en estufa (Selecta, modelo 210) a 60° C. Finalmente, se tiñeron con Hematoxilina-Eosina y se montaron para su observación.

### 3.2.5.3. Valoración de los folículos

La observación de las preparaciones histológicas se realizó con un microscopio Olympus BHS 313/E. La calidad de los folículos estudiados se determinó en función del estado de desarrollo o regresión en que se encontrasen. Con este objetivo se ha seguido básicamente la clasificación realizada por Webb *et al.* (1989):

**CLASE 1. Normal:** menos de 5 cuerpos picnóticos en la capa de células de granulosa de la sección estudiada.

**CLASE 2. Atresia temprana I:** de 5 a 100 cuerpos picnóticos en la capa de células de granulosa de la sección estudiada.

**CLASE 3. Atresia temprana II:** de 100 a 200 cuerpos picnóticos en la capa de células de granulosa de la sección estudiada.

**CLASE 4. Atresia avanzada I:** numerosos cuerpos picnóticos, pero todavía se distingue una capa de células de granulosa.

**CLASE 5. Atresia avanzada II:** numerosos cuerpos picnóticos, pero ya no se distingue la capa de células de granulosa.

La determinación de la calidad folicular se realizó utilizando un mínimo de 2 o 3 preparaciones diferentes para cada folículo, que se correspondían con la zona central del folículo. Para ello se contaba el número de cuerpos picnóticos en cada preparación y se hallaba la media que resulta de la suma del total de los cuerpos picnóticos observados dividido entre el número de preparaciones utilizadas.

### **3.2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Las variables cualitativas se compararon utilizando el método de Chi-cuadrado, aplicando si era preciso la corrección de Yates o el test exacto de Fisher. Las variables cuantitativas (de tipo continuo), se analizaron mediante la comparación de medias *t* de Student.

### 3.3. CULTIVOS CELULARES

#### 3.3.1. ANIMALES

Los animales empleados en esta experiencia fueron las hembras adultas de la especie ovina sacrificadas en el Matadero Municipal de Las Palmas de Gran Canaria, durante los meses de Junio y Julio de 1994.

Del conjunto de animales sacrificados, se realizó una selección atendiendo tanto a criterios generales como a criterios específicos:

#### I. Criterios generales

Se excluyeron aquellos animales que presentaran alguna o varias de las siguientes características:

1. Animales gestantes, se examinó el interior de los cuernos uterinos en los casos en que el tamaño uterino podía ser indicativo de gestación.
2. Animales con patología localizada en el aparato genital. Se excluyeron los animales con alteraciones a nivel ovárico (hipoplasia, tumores,..), o a nivel uterino (endometritis, piometra, hidrometra, etc,..).
3. Animales que presentasen signos de enfermedades sistémicas o neoplasias.

## II. Criterios específicos

Sólo se utilizaron los ovarios de aquellos animales cíclicos en fase folicular. Para ello nos basamos en los siguientes criterios:

1. Exclusión de animales con cuerpo lúteo o cuerpo hemorrágico.
2. Exclusión de animales que sin presentar cuerpo lúteo o cuerpo hemorrágico tuviesen una población folicular tan escasa que fuera indicativa de anoestro estacional, debido a que en anoestro estacional existe un menor número de folículos en crecimiento (Mariana *et al.*, 1991).

En función de todos los criterios anteriores, se utilizaron un total de 14 ovarios procedentes de 7 hembras, siendo descartados un total de 20 animales.

### **3.3.2. RECOGIDA DE OVARIOS**

Los ovarios se recogieron de las canales una vez sacrificado el animal, en un plazo de 10-30 minutos desde el sacrificio del animal. Tras la disección del resto del aparato genital, utilizando material quirúrgico estéril, los ovarios se sometieron a inmersiones repetidas en una solución acuosa de alcohol etílico al 50% para controlar la contaminación ambiental.

A continuación se introdujeron en un recipiente estéril que contenía un medio de recogida específico para cultivo celular MEM (Minimum essential medium®, SIGMA, con sales EARLE, Ph 7.3), adicionado con enrofloxacina (200µg/l), penicilina (500000 UI/l),

dihidroestreptomicina (1,25 g/l), fungizona (1 mg/l) y bicarbonato sódico (1.1 gr/l). Los ovarios se mantuvieron en condiciones de refrigeración hasta su llegada a la pre-sala de cultivos celulares.

### **3.3.3. DISECCIÓN FOLICULAR**

Una vez en la pre-sala de cultivos celulares de la Unidad de Reproducción y Obstetricia de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, los ovarios se sometieron a una batería de lavados; solución acuosa de alcohol al 50%, 3 pases por recipientes distintos con medio MEM y de nuevo solución acuosa de alcohol al 50%. A continuación los ovarios se depositaron en placas de Petri de 6 cm, con medio MEM y en condiciones de refrigeración.

En primer lugar se realizó una disección grosera del ovario, eliminando todas las estructuras adyacentes. Posteriormente y tras cambiar el ovario a una nueva placa con MEM, se disecaron todos aquellos folículos mayores de 1 mm. de diámetro, liberándolos del estroma ovárico, mediante la utilización de material quirúrgico (McNatty *et al.*, 1985; Webb *et al.*, 1989).

### **3.3.4. VALORACIÓN FOLICULAR**

Una vez realizada la disección folicular, se determinó el número y tamaño de los folículos obtenidos. Los folículos se clasificaron en función de su tamaño como pequeños (1-2 mm. de diámetro), medianos (2-4 mm. de diámetro) y grandes (> 4 mm. de diámetro). El número total de folículos empleados en la experiencia fue de 96, 46 y 12 para folículos pequeños, medianos y grandes, respectivamente.

### 3.3.5. OBTENCIÓN DE CÉLULAS Y RECuento CELULAR

Una vez disecados, los folículos se trasladaron a la sala de cultivos celulares y se sometieron a inmersiones en una nueva batería de lavado, integrada por tres recipientes de medio de cultivo M-199 (MEDIUM 199®, SIGMA, con sales EARLE, L-glutamina, 25 Mm HEPES, Ph 6.8), adicionado con penicilina (50000 UI/l), dihidroestreptomicina (125 mg/l), fungizona (250 µg/l) y bicarbonato sódico (1.1 gr/l), y un recipiente con solución acuosa de alcohol etílico al 50%.

A continuación los folículos se colocaron en el interior de la cabina de flujo laminar, dentro de una placa de Petrí de 6 cm de diámetro, con medio M-199 y colocada sobre una bandeja de hielo. En condiciones de esterilidad se procedió a la sección de cada folículo mediante una hoja de bisturí, y se continuó con un cuidadoso raspado de las paredes interiores del folículo con una pinzas de microcirugía, con el fin de obtener el máximo número posible de células de granulosa (Monniaux, 1987).

Una vez en el medio de recogida, la suspensión celular se centrifugó a 500 x g durante 10 minutos. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 2 ml de M-199, centrifugándose dos veces más, y resuspendiendo en un volumen final de 1-2 ml de M-199.

Para determinar la concentración y vitalidad celular presente en la suspensión final de células de granulosa, se homogeneizaron cantidades alícuotas (100 µl) de la suspensión celular y de un colorante vital (Trypan blue 0.4%, SIGMA, CELL CULTURE REAGENTS®), transcurridos de 5-10 minutos se realizó el contaje utilizando una cámara cuenta-glóbulos de Neubauer.

### 3.3.6. CULTIVO Y TRATAMIENTOS

Una vez conocida la concentración y vitalidad celular se realizó la siembra de células de granulosa. Se utilizaron placas Multiwell de 96 pocillos de un diámetro de 6.4 mm. (COSTAR®, Cell Culture Cluster) tratadas para cultivos celulares. La concentración celular de siembra osciló entre las 70000-75000 células vivas/pocillo, en un volumen de suspensión celular de 200  $\mu$ l de MEDIUM 199, adicionado con un 5% de suero fetal bovino (BIO WITAKER®)

El número medio de pocillos fue de 12 para cada talla folicular (pequeños, 1-2 mm.; medianos, 2-4 mm.; grandes, > 4 mm.), estableciéndose además 4 pocillos control sin células. A continuación las placas Multiwell se introdujeron en el incubador de CO<sub>2</sub>, a 37 °C y una concentración del 5 % de CO<sub>2</sub>.

Durante las primeras 24 horas de cultivo las células en suspensión descienden y se adhieren al fondo del pocillo, y no se aplicó ningún tratamiento durante este período de acondicionamiento. A las 24 y 48 horas del cultivo se renovó el medio de cultivo y se administró el tratamiento a base de insulina (HUMULINA NHP 40 UI/ml; LILLY®). El tratamiento dentro de cada tamaño folicular estaba integrado por:

- 3 pocillos control (0.0 UI/ml)
- 3 pocillos con 0.05 UI/ml (tratamiento bajo)
- 3 pocillos con 0.5 UI/ml (tratamiento medio)
- 3 pocillos con 1.0 UI/ml (tratamiento alto)

A las 24 horas de cultivo se recogió el medio de cultivo de los pocillos y se almacenó a - 80 °C a la espera de las determinaciones hormonales. Inmediatamente se añadió 200  $\mu$ l

de M-199 por pocillo, continuando con la misma pauta de tratamiento. Antes de cada cambio de medio, los pocillos fueron examinados minuciosamente con el microscopio invertido para comprobar la ausencia de contaminación bacteriana o fúngica. Asimismo, se realizó un seguimiento diario para valorar las variaciones de la población celular.

### **3.3.7. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ESTEROIDOGENICA**

En todos los medios recogidos a las 24 horas de cultivo, se determinó la capacidad esteroideogénica de las células de granulosa, valorando la cantidad de progesterona presente mediante radioinmunoanálisis (RIA), utilizando un *kit* comercial ( $^{125}\text{I}$ -PROGESTERONE COATRIA, bio-Mérieux). Dicho *kit* utiliza el método directo (sin extracción previa), sobre tubos recubiertos con el anticuerpo específico. Se siguió el procedimiento descrito por el fabricante con la excepción de que no se utilizaron los estándares incluidos en el *kit*, que están realizados en plasma humano. En su lugar, se prepararon estándares de 0.1, 0.27, 0.9, 2.7 y 13.5 ng/ml en el mismo medio utilizado para los cultivos celulares, a partir de una disolución acuosa de progesterona (756 ng/ml). En cada tubo se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de muestra y 500  $\mu\text{l}$  de reactivo con progesterona marcada con  $^{125}\text{I}$ . Se agitaron los tubos en agitador multivortex (SMI VORTEXER 2601, American Dade) y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se decantaron los tubos y se lavaron 2 veces con 2 ml de agua destilada. La radioactividad ligada a los tubos se midió en un contador gamma (LKB-WALLAC, Compugamma 1282). La sensibilidad fue de 0,05 ng/ml. Todas las muestras se realizaron en un mismo análisis; los coeficientes de variación intraanálisis fueron de 15.3% para una muestra de 1,4 ng/ml y de 26.6% para una muestra de 0,23 ng/ml (Garbayo, 1990).

### **3.3.8. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD PROLIFERATIVA**

A las 72 horas de iniciado el cultivo, una vez recogido el medio, se procedió a la determinación de la concentración celular presente en cada pocillo, con el objetivo de comprobar la evolución de la población folicular presente en relación con el número de células sembradas. Para conseguir levantar las células que se encontraban adheridas al suelo del pocillo, se procedió a la *tripsinización* de las mismas.

El proceso de *tripsinización* consistió en añadir a cada pocillo 200  $\mu$ l de tripsina (0.25%) en PBS precalentado a 37 °C, dejándola actuar durante 1 minuto a temperatura ambiente. Posteriormente, se retiró la tripsina dejando unas gotas y se incubó a 37 °C durante 5-10 minutos hasta comprobar que las células se habían soltado; luego se añadió M-199 y se realizaron múltiples lavados de cada pocillo, obteniendo una suspensión celular homogénea.

La suspensión celular de cada 3 pocillos de una misma talla folicular y de un mismo tratamiento se centrifugó a 500 x g durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en un volumen conocido. La concentración celular se determinó por contaje de alícuota de la suspensión celular final en la cámara cuenta-glóbulos de Neubauer.

Esta experiencia descrita en los apartados 3.3.6, 3.3.7. y 3.3.8. se realizó por triplicado.

### **3.3.9. MATERIALES DE LA SALA DE CULTIVOS CELULARES**

- Incubador de CO<sub>2</sub> REVCO modelo RCO500T, con un sistema inflarrojo de control de gases.
- Cabina de flujo laminar TELSTAR, modelo BV-100, presenta filtros HEPA, con flujo laminar vertical parcialmente reciclado que permite operar en condiciones de esterilidad y ausencia de partículas.
- Microscopio invertido OLYMPUS, modelo IMT-2, con observación de interferencia diferencial Nomarsky y contraste de fases.
- Centrífuga programable Kubota 5100, con rotor basculante.
- Baño termostático Selecta modelo TECTRON 3473100.
- Balanza de precisión COBOS modelo CM-360-SX.1.

### **3.3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Las variables cualitativas se compararon utilizando el método de Chi-cuadrado, aplicando cuando era preciso la corrección de Yates o el test exacto de Fisher. Las variables cuantitativas (de tipo continuo), se analizaron mediante la comparación de medias *t* de Student.

## **4. RESULTADOS**

## 4.1. CARACTERIZACIÓN DEL CICLO ESTRAL

### 4.1.1. ESTRO

A la hora de cuantificar los distintos parámetros del celo, hemos definido celo como la tendencia de la oveja a permanecer inmóvil cuando el macho realiza movimientos de monta.

#### 4.1.1.1. Comportamiento estral

##### 4.1.1.1.1. Comportamiento de la hembra

No existen diferencias en la sintomatología entre el celo sincronizado y el celo natural, de ahí que la presentación de los resultados se realice de manera conjunta.

Si consideramos la inmovilidad al salto como el signo definitorio de celo, podemos distinguir unos síntomas previos al celo, los síntomas coincidentes al celo y los síntomas posteriores al celo. La inmovilidad al cortejo no tiene representación gráfica por ser prácticamente coincidente con la inmovilidad al salto.

En los *síntomas previos al celo*, además de la inmovilidad al salto, cabe destacar la ausencia total de inmovilidad al cortejo, así como que sólo un 7.7% de los animales mostraron síntomas de búsqueda del macho y coleteo. Estos últimos síntomas aparecieron en aquellas ovejas que 12 horas después ya manifestaban inmovilidad al salto (figuras 4.1., 4.2., tabla 4.1.).

Por otro lado, el porcentaje de ovejas que realizan micción una vez entran en contacto con el macho es muy elevado, situándose alrededor del 80% a las 24 horas antes del inicio

del celo, para descender hasta un 23%, 12 horas antes del inicio del celo. Los balidos previos al celo se encuentran cerca del 40% en las 24 horas anteriores al celo, para descender a un 15% a las 12 horas antes del celo (figuras 4.3., 4.4., tabla 4.1.).

*Durante el período de inmovilidad al salto*, el 100% de las ovejas que entraron en celo mostraron síntomas de inmovilidad al cortejo y búsqueda del macho en algún momento del celo, llegando a sus valores más altos entre las 0 y 24 horas desde el inicio del celo. Un 92.3% de las ovejas mostraron coleteo en algún momento del celo, alcanzando los valores más altos entre las 0 y 12 horas de inicio del celo (figuras 4.1., 4.2., tabla 4.1.).

El porcentaje de ovejas que en algún momento durante el celo miccionan en respuesta a la presencia del macho es del 46.15%, si bien durante las primeras 24 horas este porcentaje es inferior al 30%, para incrementarse posteriormente conforme nos acercamos al final del celo. De la misma manera, durante el período de celo, sólo un 15.4% de las ovejas emiten balidos, siendo el porcentaje de balidos mínimo entre las 12 y 36 horas tras el comienzo del celo (figuras 4.3. 4.4, tabla 4.1.).

Una vez finalizada la inmovilidad al salto, comienzan los *struomas posteriores al celo* que se caracterizan por unos niveles muy bajos de búsqueda, inmovilidad al cortejo y coleteo, con unos valores de 21.4%, 15.38% y 15.38% respectivamente. La inmovilidad al cortejo y la búsqueda del macho finalizan unas 6 horas después del final del celo, mientras el coleteo finaliza casi al mismo tiempo que acaba el celo.

Cuando finaliza el celo, la micción en respuesta al macho aparece al menos una vez en el 100% de las ovejas, alcanzando valores cercanos al 70% a las 6 horas tras el final del celo. Los balidos se sitúan por encima del 30% de las ovejas, una vez finalizado el período de celo (figuras 4.3., 4.4., tabla 4.1.).

Si estudiamos los datos de manera conjunta, observamos que la búsqueda del macho, inmovilidad al cortejo y el coleteo se encuadran casi exclusivamente en el período de celo, estando prácticamente ausentes antes del inicio del celo y siendo residuales una vez acabado el mismo. El modelo de la micción y los balidos en respuesta al macho es inversa, puesto que es durante el período de celo, sobre todo en las primeras 30 horas, cuando estos síntomas alcanzan sus valores más bajos, mientras que en los períodos anterior y posterior al celo, muestran unos valores bastante altos (tabla 4.1., figuras 4.1., 4.2., 4.3. y 4.4.).

En el período previo al celo, el 100% de las ovejas realizan micción al menos una vez. Este porcentaje desciende al 46.15% durante el período de celo y vuelve a incrementarse hasta el 100% una vez finalizado el celo.

La duración media tanto de la inmovilidad al cortejo como de la búsqueda del macho fue ligeramente superior a la inmovilidad al salto, situándose alrededor de  $44.61 \pm 2.28$  horas (media  $\pm$  e.e.). El coleteo no sigue un patrón definido durante el período de celo, sino que aparece y desaparece a lo largo del mismo.

### 4.1.1.1.2. Comportamiento del macho testador

Los síntomas de olfateo, lametones y balidos son inespecíficos en el cortejo que realiza el macho, puesto que aparecen casi en la misma magnitud antes, durante y tras el celo (figuras 4.5., 4.6., 4.7., tabla 4.2.).

Durante el período previo al celo, los manotazos del macho en respuesta al contacto con la hembra presentan un porcentaje bajo, encontrándose por debajo del 15%. Durante el período de celo, existe un incremento en la intensidad del cortejo quedando manifestado por un aumento en el porcentaje de manotazos que alcanza casi un 40% a las 24 tras el inicio del

celo. Una vez finalizado la inmovilidad al salto, el porcentaje de manotazos vuelve a disminuir (figura 4.8., tabla 4.2.).

En un 46.15% de las detecciones realizadas en el período previo al celo, se provoca el salto del macho. El 66.6% de las ovejas que le provocaron al macho el salto durante el periodo previo al reflejo de inmovilidad, entraron en celo en las siguientes 12-24 horas. Durante el celo el macho realiza intento de monta en todas las ovejas, mientras que una vez finalizado el celo, los intentos de salto son muy bajos (15.38%). Los intentos de salto del macho posteriores al celo se corresponden con ovejas que presentaban atracción e inmovilidad al cortejo tras el celo (figura 4.9., tabla 4.2.).

El *flehmen* del macho en respuesta al olfateo de la orina de la hembra presenta unos valores entre el 40 y el 60 % hasta las 24 horas antes del inicio del celo, presentando sus valores más bajos entre 12 horas antes del celo y 24 horas tras el comienzo del mismo. A partir de este momento comienza de nuevo a incrementarse hasta alcanzar los mismos valores anteriores al celo (50-60%); estos valores se obtienen cerca del final del celo y una vez finalizado éste (figura 4.10., tabla 4.2.).

Existe una correlación inversa ( $p < 0.01$ ) entre el porcentaje de manotazos y el *flehmen* tanto antes como al final del celo, mientras que durante el celo no es tan manifiesta.

Existe una correlación positiva entre la micción de las ovejas y el *flehmen* en respuesta al olfateo de la orina ( $p < 0.02$ ). Antes y tras el celo, ambos signos muestran sus valores más altos, mientras que durante el período de celo, concretamente entre 12 horas antes del inicio del celo y 24 horas tras el inicio del mismo, sus niveles son los más bajos.

| HORAS ANTES/DESPUÉS DE LA APARICIÓN<br>DEL REFLEJO DE INMOVILIDAD<br>(Entre paréntesis, número de celos valorados) |             |             |              |              |           |            |            |            |            |
|--|-------------|-------------|--------------|--------------|-----------|------------|------------|------------|------------|
| SIGNO DEL<br>CELO  | - 48<br>(7) | - 36<br>(7) | - 24<br>(10) | - 12<br>(13) | 0<br>(13) | 12<br>(13) | 24<br>(13) | 36<br>(12) | 48<br>(12) |
| BÚSQUEDA ♂   | 0           | 0           | 0            | 7.7          | 100       | 100        | 92.3       | 61.5       | 33.3       |
| COLETEO  | 0           | 0           | 0            | 7.7          | 61.5      | 53.8       | 30.8       | 23.1       | 0          |
| MICCIÓN  | 85.6        | 57.2        | 80           | 23.1         | 15.4      | 15.4       | 30.8       | 38.5       | 75         |
| BALIDOS  | 42.8        | 42.8        | 40           | 15.4         | 15.4      | 0          | 0          | 7.69       | 33.8       |

Tabla 4.1. Porcentaje de signos del comportamiento estral de la oveja en relación con el momento del comienzo del celo

| HORAS ANTES/DESPUÉS DE LA APARICIÓN<br>DEL REFLEJO DE INMOVILIDAD<br>(Entre paréntesis, número de celos valorados) |             |             |              |              |           |            |            |            |            |
|--|-------------|-------------|--------------|--------------|-----------|------------|------------|------------|------------|
| SIGNO DEL<br>CORTEJO   | - 48<br>(7) | - 36<br>(7) | - 24<br>(10) | - 12<br>(13) | 0<br>(13) | 12<br>(13) | 24<br>(13) | 36<br>(12) | 48<br>(12) |
| OLFATEO  | 57.2        | 57.2        | 90           | 23.1         | 53.8      | 77.0       | 92.2       | 100        | 83.3       |
| LAMETONES  | 57.2        | 57.2        | 70           | 46.1         | 69.2      | 61.5       | 69.2       | 76.9       | 83.3       |
| BALIDOS  | 85.7        | 100         | 80           | 69.2         | 100       | 84.6       | 92.3       | 92.3       | 83.3       |
| MANOTAZOS  | 14.3        | 0           | 0            | 14.3         | 23.1      | 23.1       | 38.5       | 23.1       | 16.7       |
| SALTO  | 0           | 14.3        | 10           | 23.1         | 100       | 100        | 76.9       | 46.1       | 30         |
| FLEHMEN  | 42.8        | 57.1        | 40           | 15.4         | 15.4      | 30.8       | 38.4       | 53.8       | 58         |

Tabla 4.2. Porcentaje de signos presentes en el cortejo del macho en relación con el momento del comienzo del celo

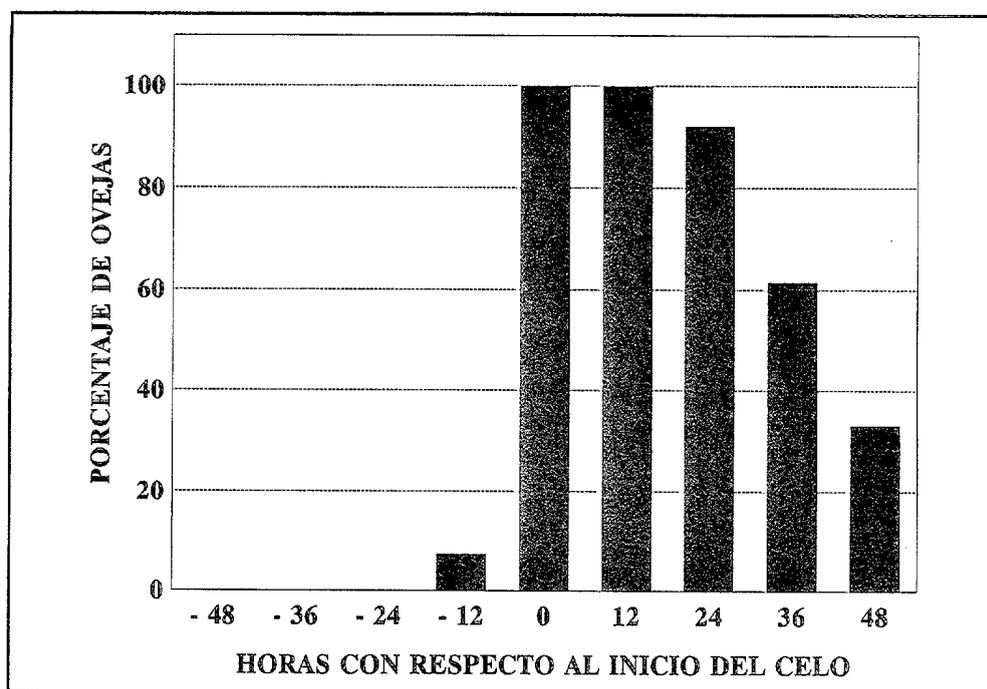


Figura 4. 1. Porcentaje de búsqueda del macho

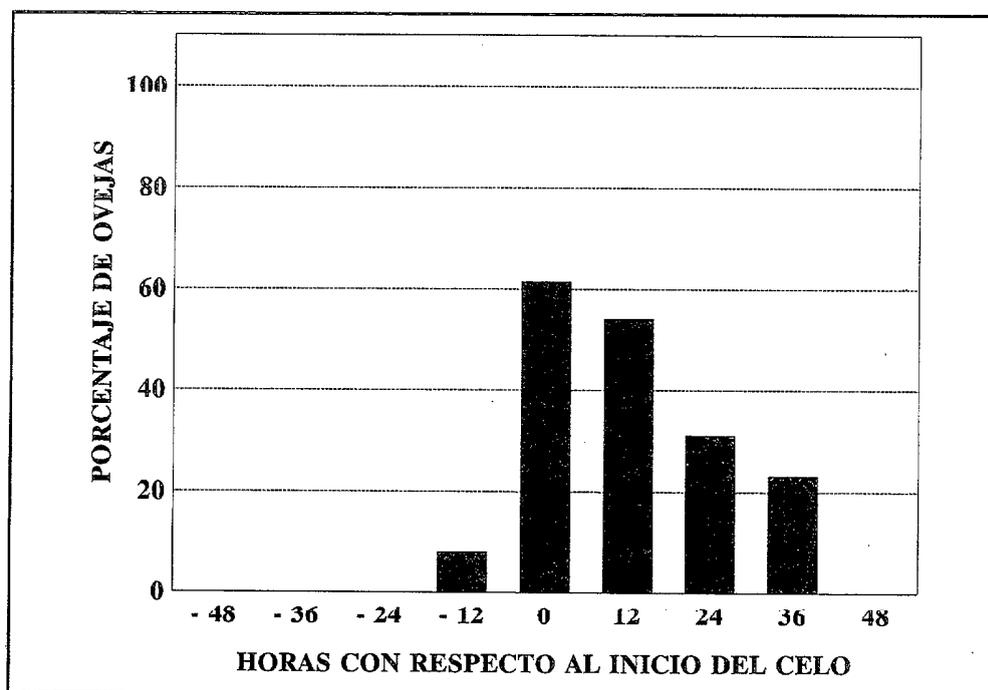


Figura 4. 2. Porcentaje de coiteo

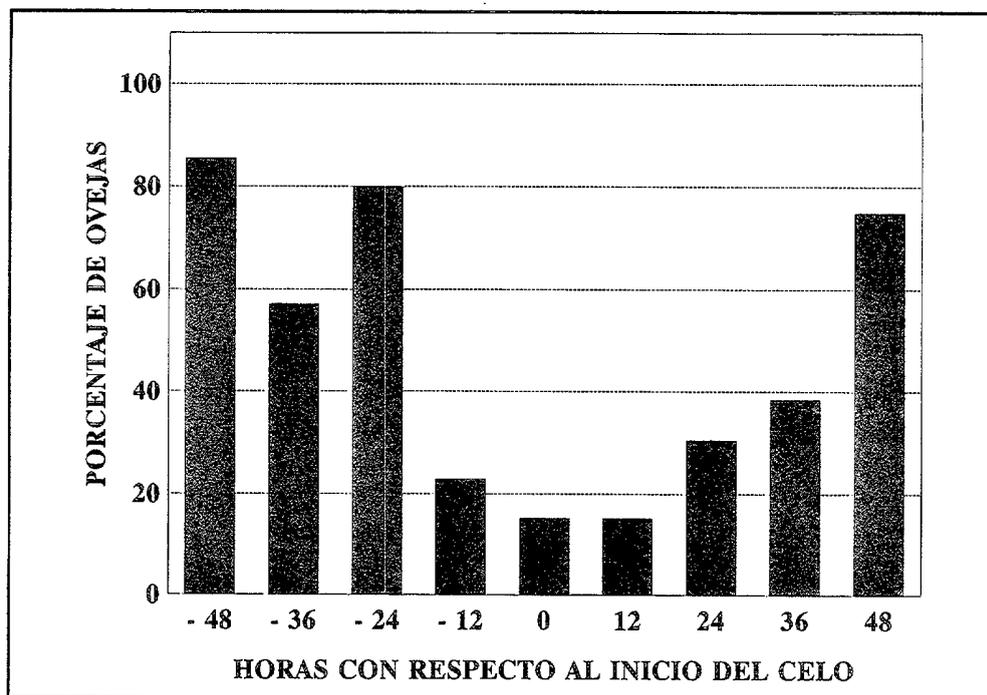


Figura 4. 3. Porcentaje de micción

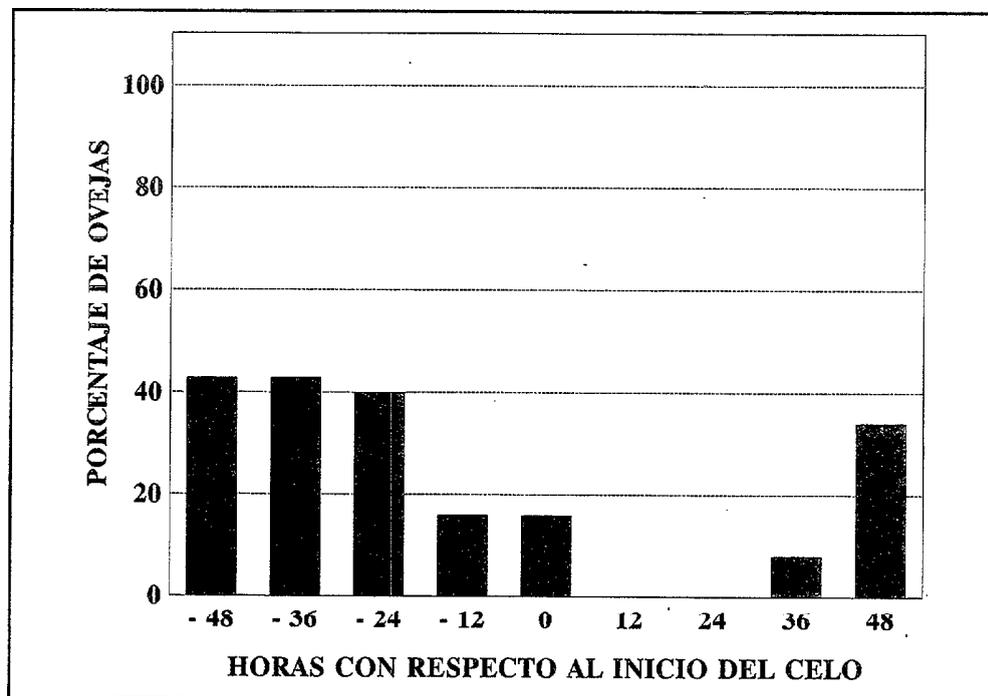


Figura 4. 4. Porcentaje de balidos

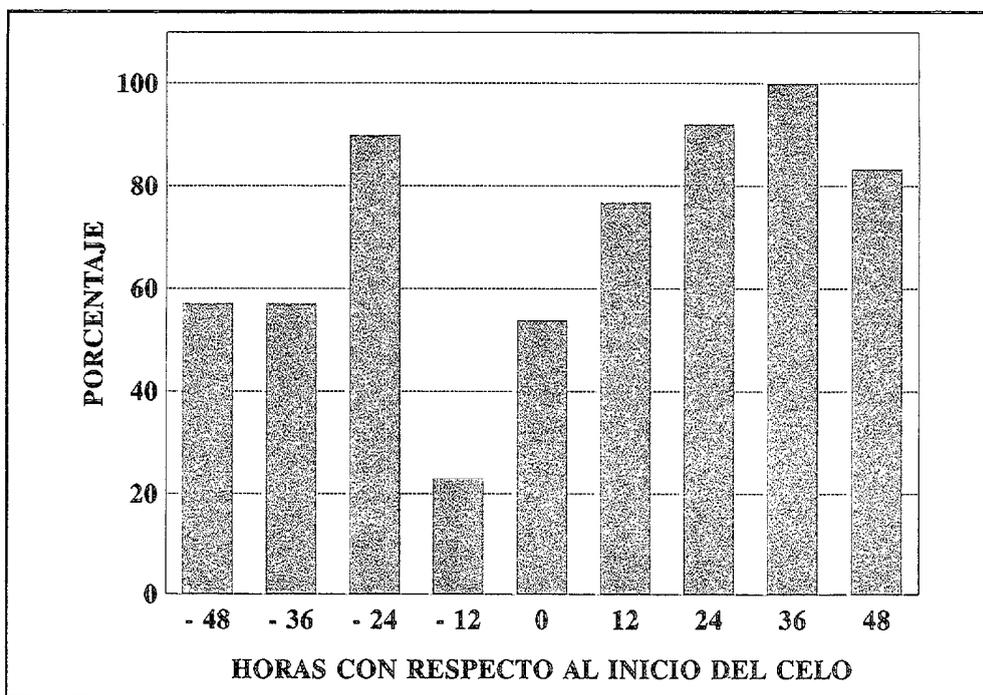


Figura 4. 5. Porcentaje de olfateo del macho

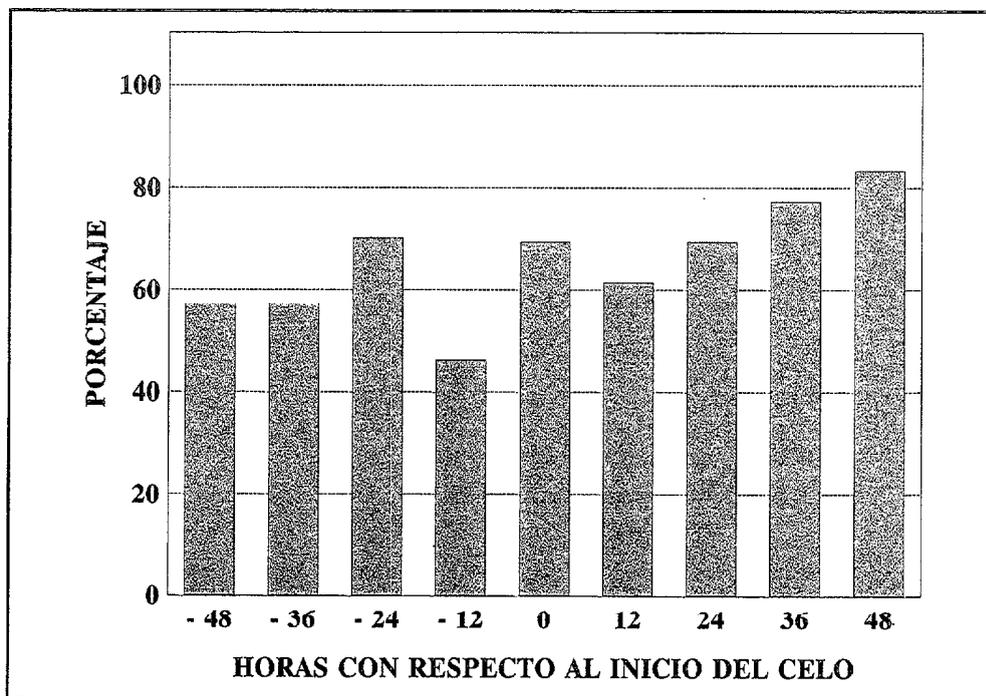


Figura 4. 6. Porcentaje de lametones del macho

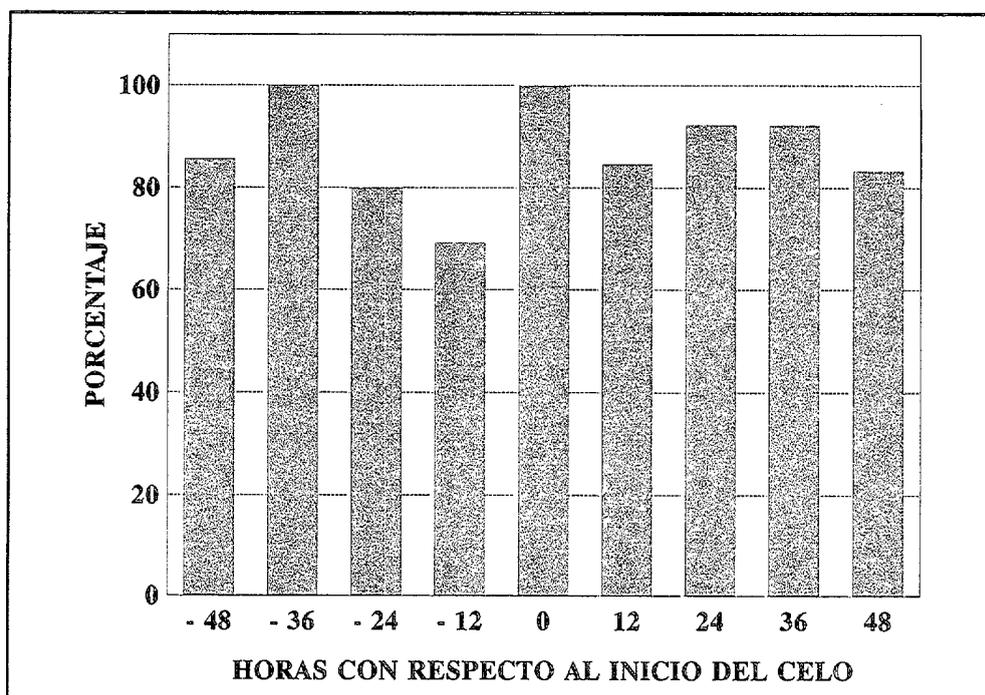


Figura 4. 7. Porcentaje de balidos del macho

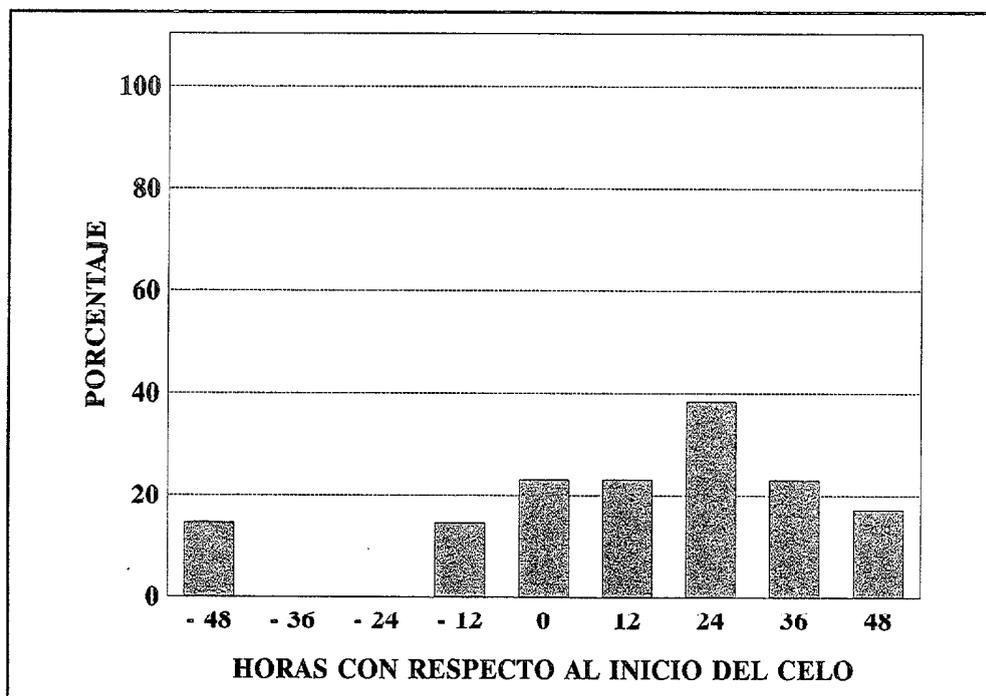


Figura 4. 8. Porcentaje de manotazos del macho

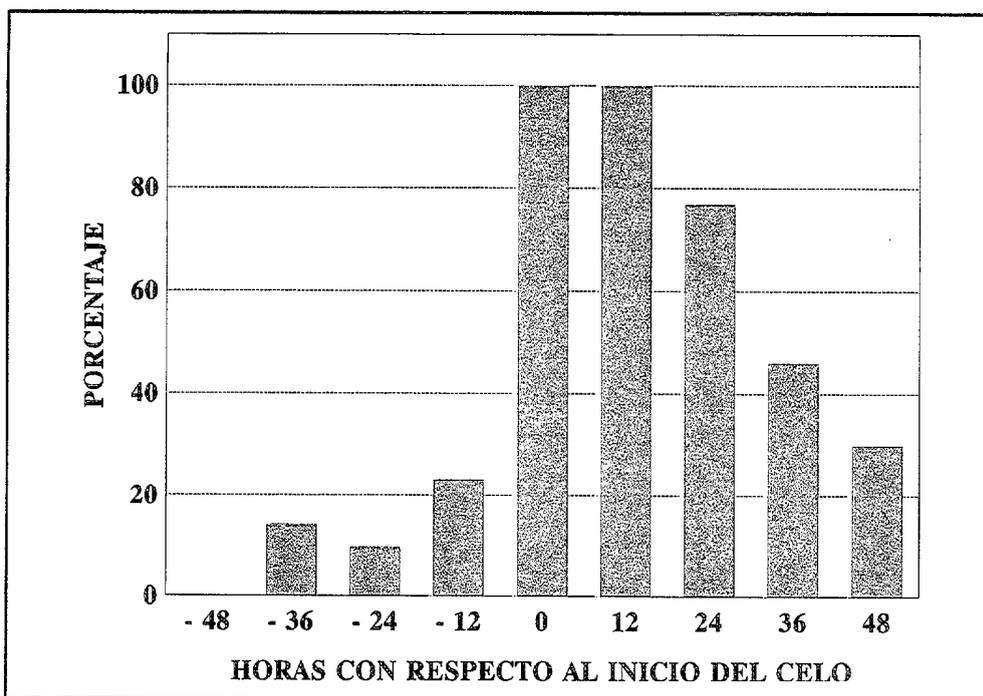


Figura 4. 9. Porcentaje de saltos del macho

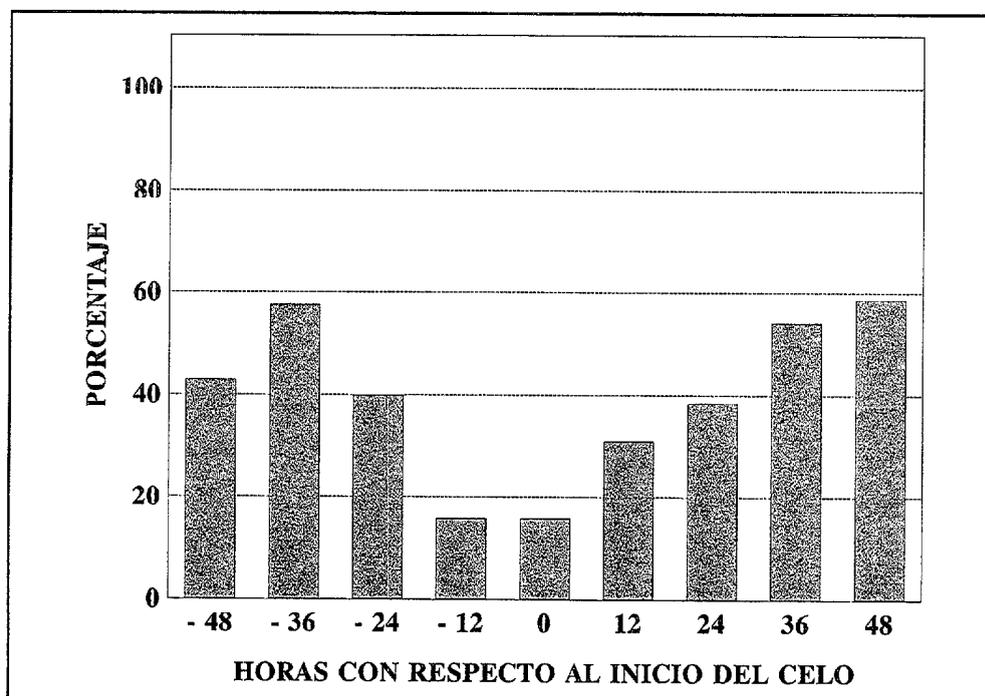


Figura 4. 10. Porcentaje de flehmen del macho

#### 4.1.1.2. Intervalos fisiológicos

En la tabla 4.3. se muestran los valores medios ( $\pm$  error estándar) de cada uno de los intervalos fisiológicos valorados en el ciclo estral de la oveja canaria

##### 4.1.1.2.1. Intervalo retirada de las esponjas-inicio del celo

El empleo de un progestágeno, en la forma de esponja intravaginal de acetato de fluorogestona (30 mg FGA), durante 14 días y a su retirada la aplicación de un análogo de prostaglandina (Luprostiol), se muestra como un método válido para la sincronización de celos en la oveja canaria. El 87.5% (7/8) de las ovejas sincronizadas mostraron manifestaciones de comportamiento estral, mientras el 12.5% (1/8) restante no presentaron signos de celo pero sí una ovulación silenciosa detectada por laparoscopia dentro de los márgenes normales. En la fase folicular natural del ciclo siguiente, un 75% (6/8) de las ovejas mostraba comportamiento estral, un 12.5% (1/8) presentó ovulación silenciosa y el restante 12.5% (1/8) no exhibió ni comportamiento estral ni ovulación.

El comportamiento estral de la oveja canaria empieza a manifestarse a las  $40.85 \pm 4.84$  horas (tabla 4.3.) tras la retirada de las esponjas, con un rango entre 30 y 66 horas. A las 30 horas de la retirada de las esponjas, un 42.85% (3/7) de las ovejas mostraban síntomas de celo; este porcentaje se incrementaba a un 85.71% (6/7) a las 42 horas tras la retirada de las esponjas, hasta completarse un 100% a las 70 horas (figura 4.11.).

##### 4.1.1.2.2. Intervalo retirada de las esponjas-final del celo

El período entre la retirada de las esponjas y el final del celo se sitúa en  $83.14 \pm 6.33$  horas (tabla 4.3.), con rangos entre 66 y 102 horas. Un 42.85% (3/7) de las ovejas que mostraron

celo, presentaron un intervalo entre retirada de las esponjas y el final del celo de 66 horas, en un 28.57% (2/7) se incrementaba hasta las 90 horas y en el 28.57% (2/7) restante de las ovejas, este intervalo se situó sobre las 102 horas (**figura 4.12**).

### 4.1.1.2.3. Duración del celo

La duración media de celo se situaba en  $42.85 \pm 3.56$  horas en el celo consecutivo a la retirada de las esponjas y de  $42.0 \pm 5.13$  en el celo correspondiente a la fase folicular natural del ciclo siguiente.

En el celo *sincronizado*, la duración del celo oscilaba entre 36 y 60 horas. Un 57.14% (4/7) de las ovejas tuvieron una duración media del celo de 36 horas, en un 28.57% (2/7) de las ovejas la duración del celo se prolongaba hasta las 48 horas y el 14.28% (1/7) restante presentaron un comportamiento estral relativamente largo, alrededor de 60 horas (**figura 4.13**).

En el celo *natural*, la duración del celo oscila entre unos extremos de 24 y 60 horas. Con una duración media de hasta 36 horas, el 50.0% (3/6) de las ovejas mostraron comportamiento estral; en un 33.3% (2/6) de las ovejas, la duración del celo se extendía hasta las 48 horas y el restante 16.66% (1/6) de las ovejas que mostraron celo, tuvieron una duración total de 60 horas (**figura 4.14**).

No existen diferencias apreciables ( $p > 0.05$ ) entre celo natural y sincronizado tanto en la duración media del celo como en la distribución del mismo; considerando ambos tipos de celo en un mismo grupo, la duración media del celo se sitúa en  $42.46 \pm 2.91$  horas (**tabla 4.3**). Si englobamos ambos celos el 76.92% (10/13) de las ovejas muestran una

duración del celo entre 36 y 48 horas, mientras en un 7.69% (1/13) la duración del celo es inferior (24 h.) y en un 15.38% (2/13) la duración del celo es de 60 horas (figura 4.15.).

#### 4.1.1.2.4. Intervalo retirada esponjas-ovulación

El período entre la retirada de las esponjas y la ovulación fue de  $82.85 \pm 6.29$  horas, con unos extremos entre 61 y 109 horas (tabla 4.3.).

El 28.56 (2/7) de las ovejas ovularon entre las 60-65 horas tras la retirada de las esponjas, incrementándose hasta un 85.7% (6/7) a las 88 horas y completándose al 100% a las 109 horas tras la retirada de las esponjas (figura 4.16.).

#### 4.1.1.2.5. Intervalo inicio del celo-ovulación

El período desde el inicio del celo hasta la ovulación fue de  $39.28 \pm 6.53$  horas en el celo *sincronizado*, con unos márgenes entre 20 y 57 horas. No existe relación entre una mayor o menor duración del celo y el momento de ovulación. En las ovejas donde el comportamiento estral duraba 36 horas, el intervalo inicio de celo/ovulación era de  $41.0 \pm 11.88$  horas, mientras que en las ovejas con duraciones de celo entre 48 y 60 horas, este intervalo se situaba sobre las  $37.0 \pm 10.75$  horas. La longitud del intervalo retirada de las esponjas-inicio de celo no afecta a la longitud del intervalo inicio de celo-ovulación (figura 4.17.).

En el celo *natural*, el período entre el inicio de celo y la ovulación es de  $43.16 \pm 10.40$  horas, con unos extremos entre 20 y 102 horas, si bien el 83.33% (6/7) de las ovejas se mueven en unos márgenes entre 20 y 46 horas, muy similares a los del celo sincronizado. En este caso, las ovejas con un duración del celo de hasta 36 horas, tienen un intervalo inicio de celo/ovulación de  $21.33 \pm 1.15$  horas, mientras que en las ovejas con una duración del

celo entre 48 y 60 horas, el intervalo entre inicio de celo-ovulación se incrementa hasta un  $65.0 \pm 18.29$  horas (figura 4.18.).

No existen diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre celo natural y celo sincronizado con respecto al momento de ovulación estimado; considerando ambos tipos de celo en un mismo grupo, la duración media del intervalo inicio del celo-momento de ovulación estimada se sitúa en  $41.07 \pm 6.94$  horas (tabla 4.3.).

Para el intervalo inicio del celo-momento de ovulación, observamos que para aquellos celos de duración igual o inferior a 36 horas, existe diferencia significativa entre celo natural y sincronizado (21.3% vs 41.0%, respectivamente;  $p < 0.05$ ). En celos superiores a 36 horas, el intervalo inicio de celo-ovulación es mayor (n.s.) para el caso del celo natural frente al sincronizado (65.0% vs 37.0%, respectivamente;  $p > 0.05$ ). En los celos sincronizados, el intervalo es similar ya sea el celo corto o largo (41.0% vs 37.0%, respectivamente).

#### 4.1.1.2.6. Intervalo ovulación-final del celo

El período entre el final del celo y la ovulación no difiere entre el celo natural y el celo sincronizado, y en el conjunto de ambos celos se viene a situar sobre  $-0.5 \pm 5.80$  horas (tabla 4.3.).

Un 33.33% de las ovejas presentan una ovulación entre las 14-28 horas antes de que finalice el celo; un porcentaje similar presenta la ovulación estimada poco antes de que finalice el celo (alrededor de 4 horas antes). El restante 33% de las ovejas presentan ovulaciones después del celo (figura 4.19.).

#### 4.1.2. TASA DE OVULACIÓN

No existen diferencias significativas entre la tasa de ovulación de la fase folicular del ciclo sincronizado y la tasa de ovulación del ciclo natural, con valores de  $1.62 \pm 0.26$  vs  $1.42 \pm 0.20$ . La tasa de ovulación media tiene un valor de  $1.53 \pm 0.16$  (tabla 4.3.).

El 53.3% (8/15) de las ovejas tuvieron una ovulación simple; con una ovulación doble aparecen el 40.0% (6/15) del total de animales y con tres ovulaciones nos encontramos el 6.6% (1/15) de las ovejas.

El 69.56% de las ovulaciones tuvieron lugar en el ovario izquierdo frente a un 30.43% de ovulaciones en el ovario derecho. Considerando los dos ciclos en su conjunto, un 53.33% (8/15) de las ovejas no tuvieron ovulación en el ovario derecho, mientras que en un 13.33% (2/15) de ovejas sin ovulaciones en el ovario izquierdo. La tasa media de ovulación por ovario es de  $0.46 \pm 0.16$  y de  $1.06 \pm 0.12$  para ovario derecho e izquierdo respectivamente.

De las ovejas con ovulación simple, sólo en un 25% (1/8) esta ovulación tuvo lugar en el ovario derecho frente a un 75% (7/8) en el ovario izquierdo. En aquellas ovejas con más de una ovulación, el 71.42% (5/7) de los animales presenta ovulación en ambos ovarios y un 28.57% (2/7) presenta ovulaciones sólo en el ovario izquierdo.

No existe relación entre la presentación, longitud o finalización del celo con diferencias en la tasa de ovulación.

### **4.1.3. LONGITUD DEL CICLO ESTRAL**

A la hora de determinar la longitud del ciclo tomamos como referencia la aparición de celos, así como el momento de ovulación estimada. La longitud del ciclo estral de la oveja canaria entre manifestaciones estrales (inmovilidad al salto) es de  $18.9 \pm 0.93$  días ( $n=6$ ), mientras que si tomamos como referencia el momento de ovulación ( $n=6$ ) estimado es de  $19.16 \pm 1.07$  días (tabla 4.3.).

|  |                     |
|--|---------------------|
| RETIRADA DE LAS ESPONJAS-INICIO DEL CELO | 40.85 ± 4.84 horas  |
| RETIRADA DE LAS ESPONJAS-FIN DE CELO     | 83.14 ± 6.33 horas  |
| DURACIÓN MEDIA DEL CELO                  | 42.46 ± 2.91 horas  |
| RETIRADA DE LAS ESPONJAS-OVULACIÓN       | 82.85 ± 6.29 horas  |
| INICIO DEL CELO-OVULACIÓN                | 41.07 ± 6.94 horas  |
| OVULACIÓN-FINAL DEL CELO                 | -0.5 ± 5.80 horas   |
| TASA DE OVULACIÓN                        | 1.53 ± 0.16         |
| DURACIÓN DEL CICLO (entre celos)         | 18.91 ± 0.93 días   |
| DURACIÓN DEL CICLO (entre ovulaciones)   | 19.16 ± 1.07 días   |
| RETIRADA DE LAS ESPONJAS-PICO DE LH      | 63.42 ± 10.34 horas |
| INICIO DEL CELO-PICO DE LH               | 25.33 ± 9.20 horas  |
| PICO DE LH-FINAL DEL CELO                | 17.33 ± 9.37 horas  |
| PICO DE LH-OVULACIÓN                     | 19.66 ± 3.65 horas  |

**Tabla 4.3. Intervalos fisiológicos (media ± error estándar) del ciclo estral de la oveja de la raza Canaria**

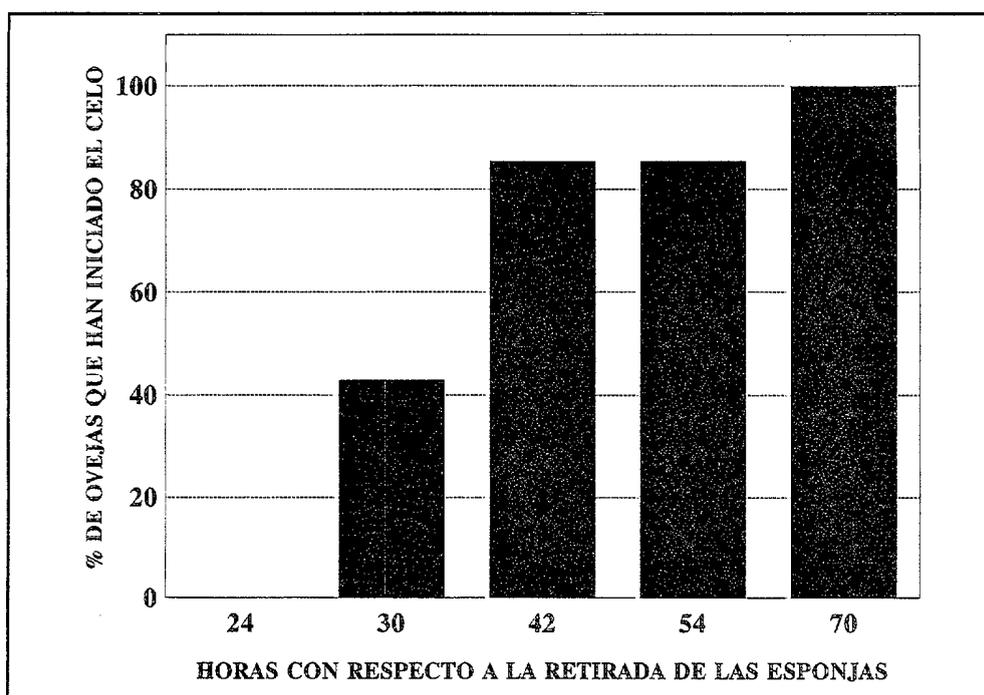


Figura 4. 11. Porcentaje de ovejas que inician el celo

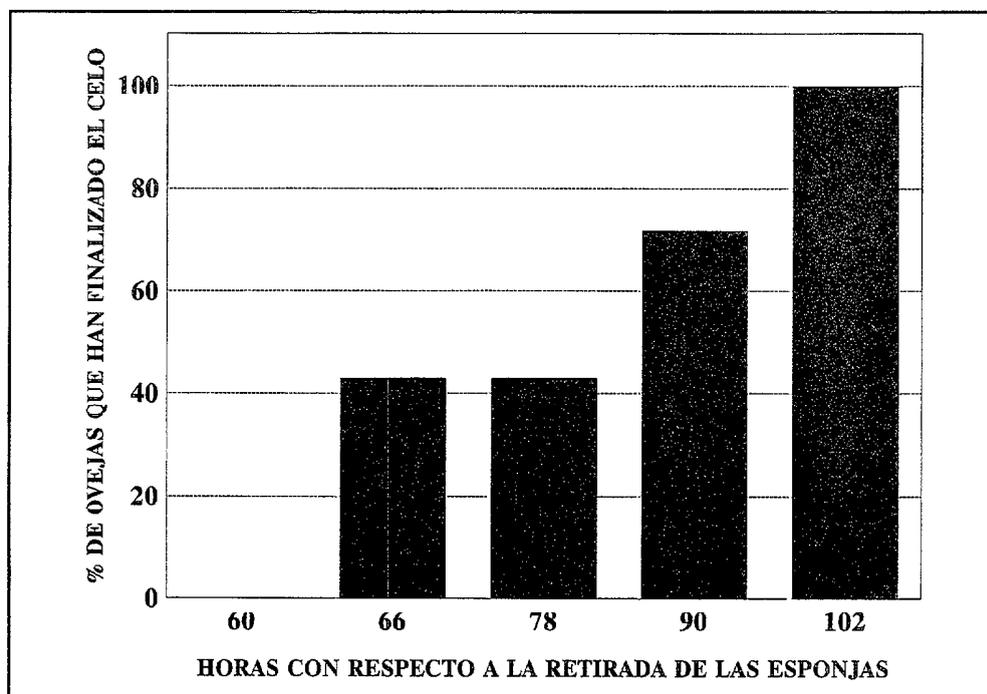


Figura 4. 12. Porcentaje de ovejas que finalizan el celo

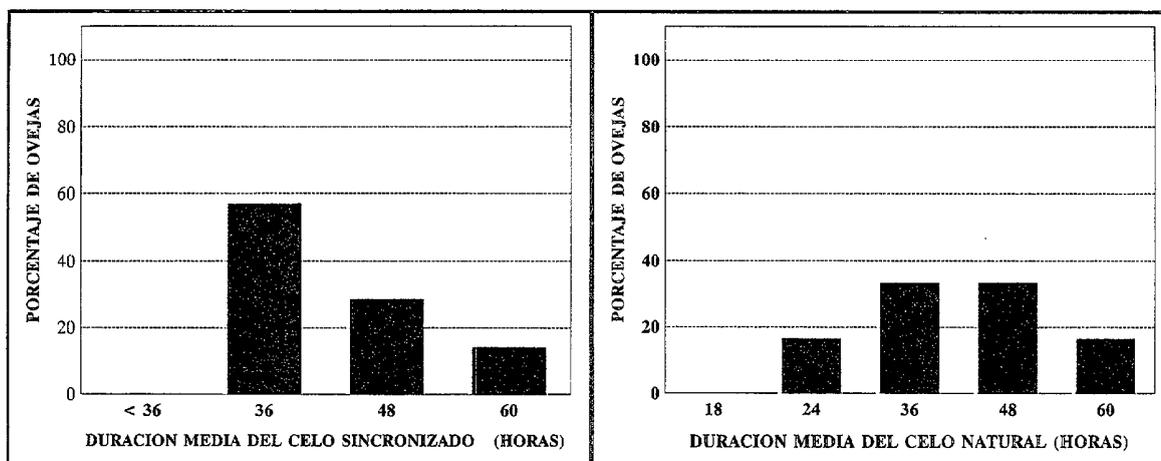


Figura 4. 13. Duración media del celo sincronizado

Figura 4. 14. Duración media del celo natural

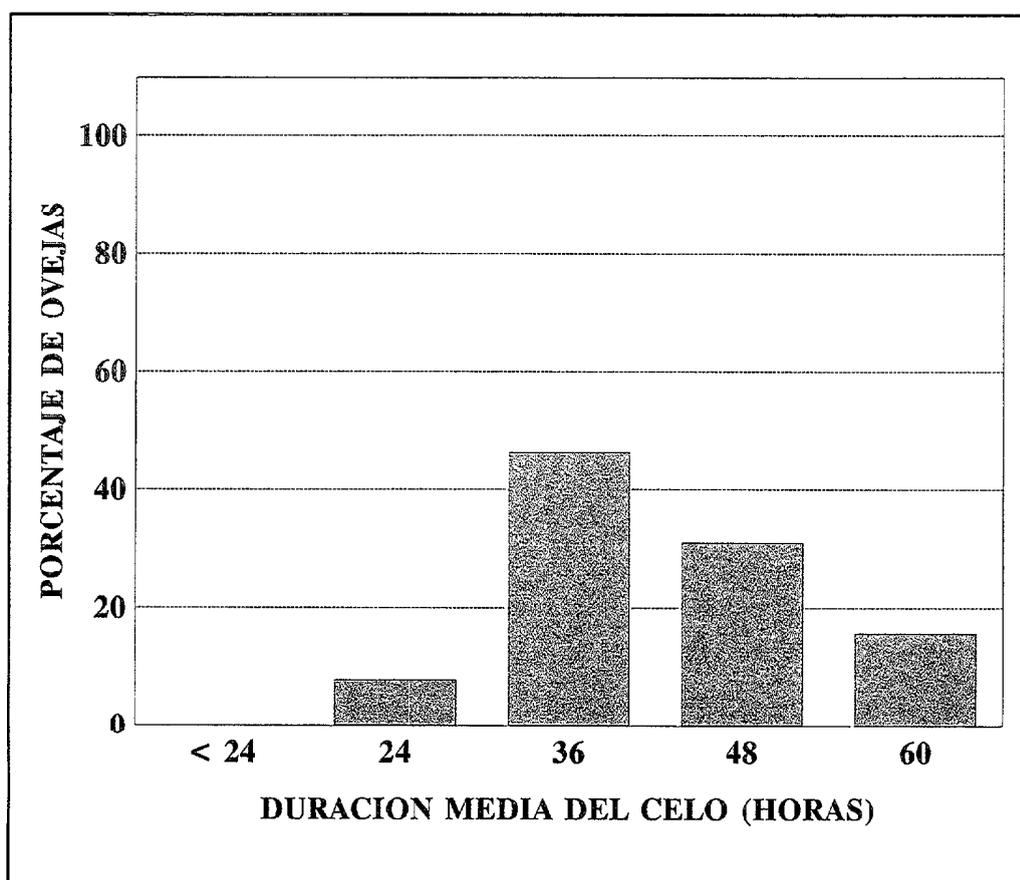


Figura 4. 15. Duración media del celo

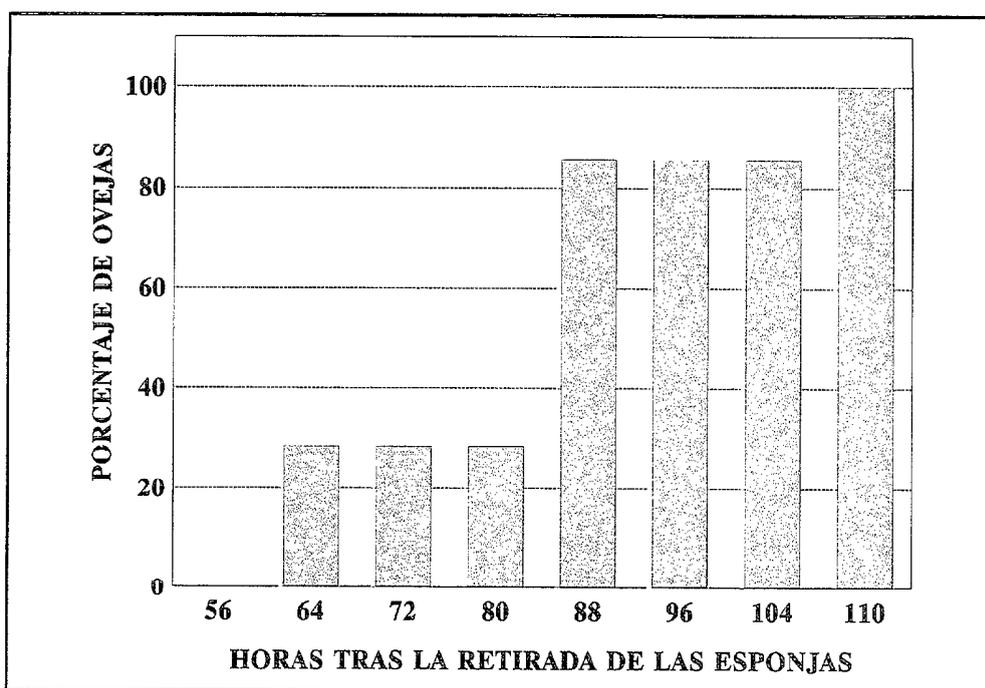


Figura 4. 16. Porcentaje de ovejas que ovulan con respecto a la retirada de las esponjas

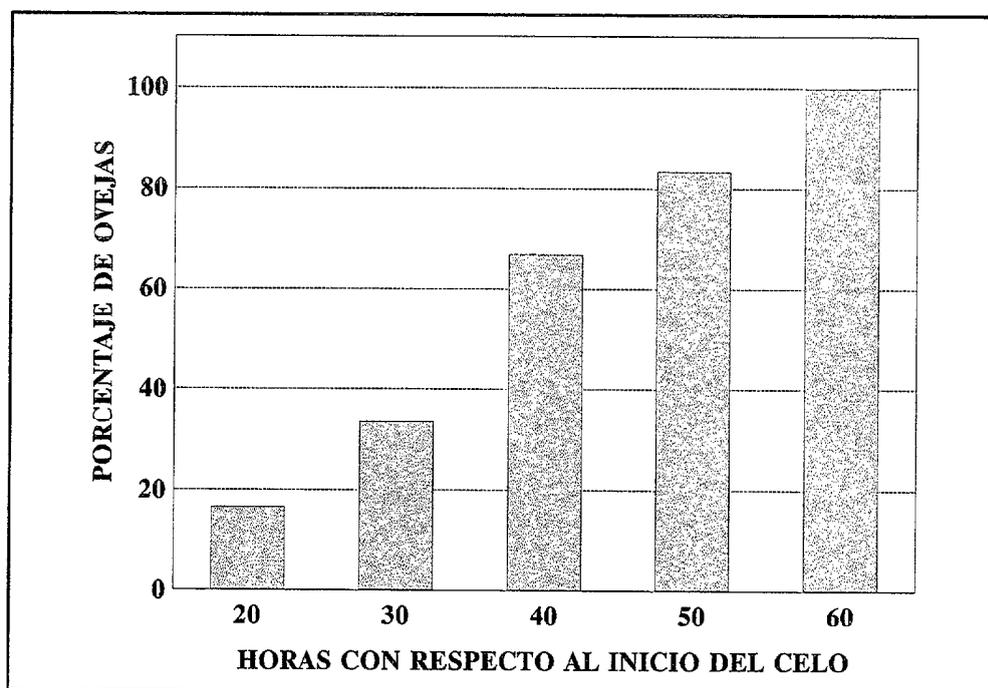


Figura 4. 17. Porcentaje de ovejas que ovulan con respecto al inicio del celo sincronizado

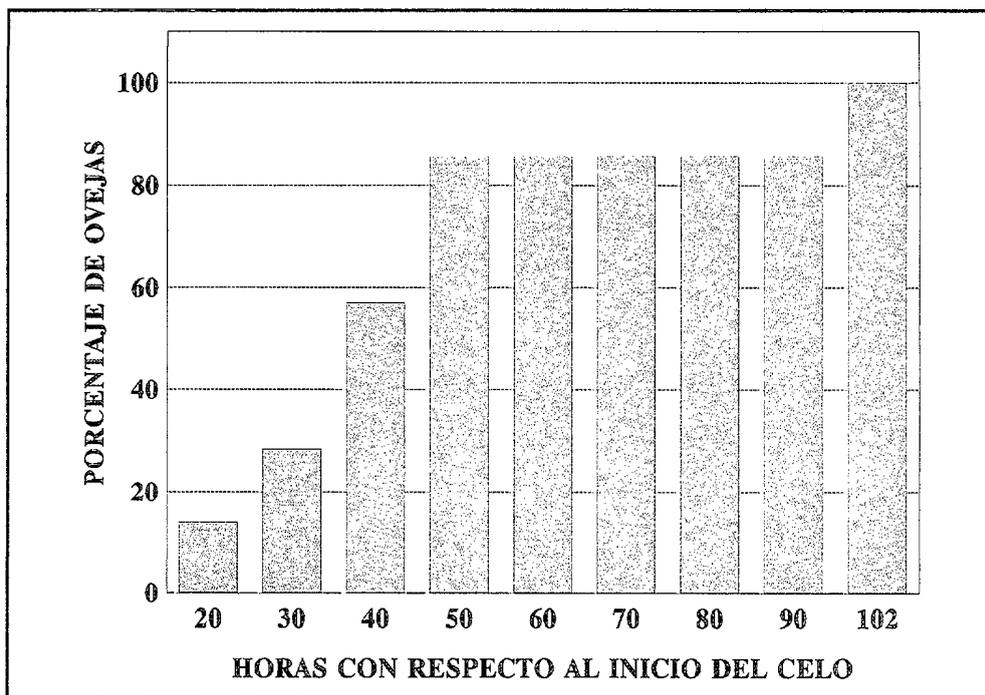


Figura 4. 18. Porcentaje de ovejas que ovulan con respecto al inicio del celo natural

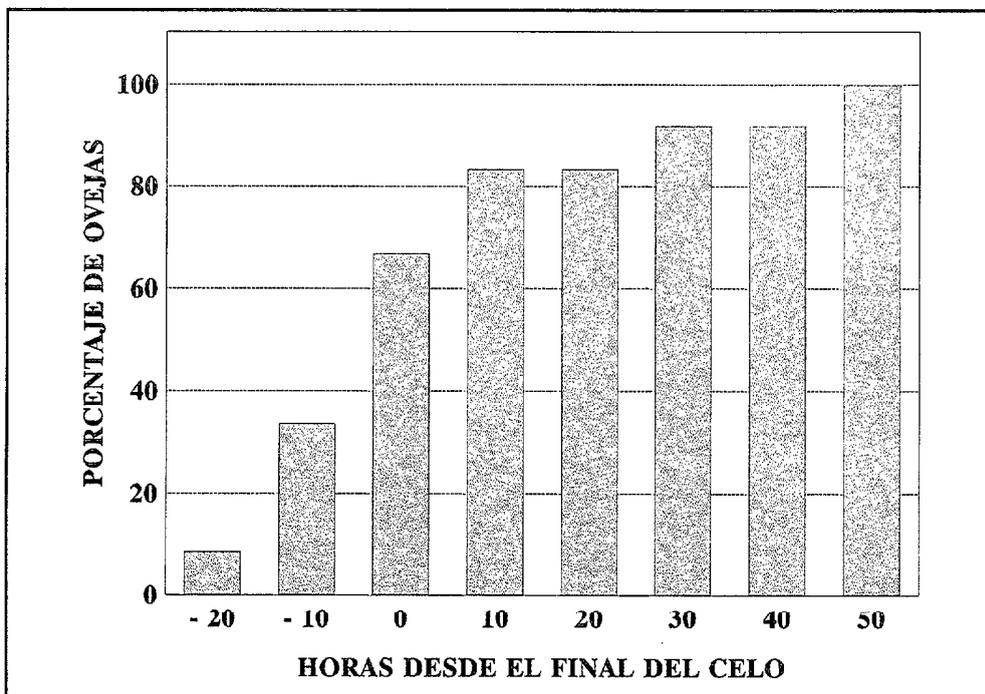


Figura 4. 19. Porcentaje de ovejas que ovulan con respecto al final del celo

#### **4.1.4. NIVELES PLASMÁTICOS DE LH**

##### **4.1.4.1. Intervalo retirada de las esponjas-pico de LH**

El período comprendido entre la retirada de las esponjas y el pico de LH es de  $63.42 \pm 10.34$  horas (rango: 28-96). A las 44 horas tras la retirada de las esponjas, un 42.85% (3/7) de las ovejas habían presentado el pico de LH, aumentando al 71.42% (5/7) a las 84 horas y completando el 100%, 96 horas tras la retirada de las esponjas (tabla 4.3., figura 4.20.).

##### **4.1.4.2. Intervalo inicio del celo-pico de LH**

El período comprendido entre el inicio del celo y el pico de LH tiene un valor de  $25.33 \pm 9.20$  horas (rango: -2/54). Dos horas tras el inicio del celo, un 33.33% (2/6) de las ovejas presentan el pico de LH, mientras que a las 30 horas tras el inicio del celo, el porcentaje aumenta hasta un 66.7%, completándose al 100% a las 54 horas (tabla 4.3., figura 4.21.).

##### **4.1.4.3. Intervalo pico de LH-final del celo**

Entre el pico de LH y el final del celo, tenemos un valor de  $17.33 \pm 9.37$  horas (rango: -18/46). El 66.7% (4/6) de las ovejas finalizaron el celo 18 h. tras el pico de LH, incrementándose al 100% a las 46 horas tras el pico (tabla 4.3., figura 4.22.).

##### **4.1.4.4. Intervalo pico de LH-ovulación**

El intervalo entre el pico de LH y la ovulación se sitúa en  $19.66 \pm 3.65$  horas (rango: 8-33). A las 20 horas del momento de ovulación estimado, un 66.7% (4/6) de las ovejas habían ovulado; este porcentaje se completaba al 100%, a las 33 horas del pico de LH (tabla 4.3., figura 4.23.).

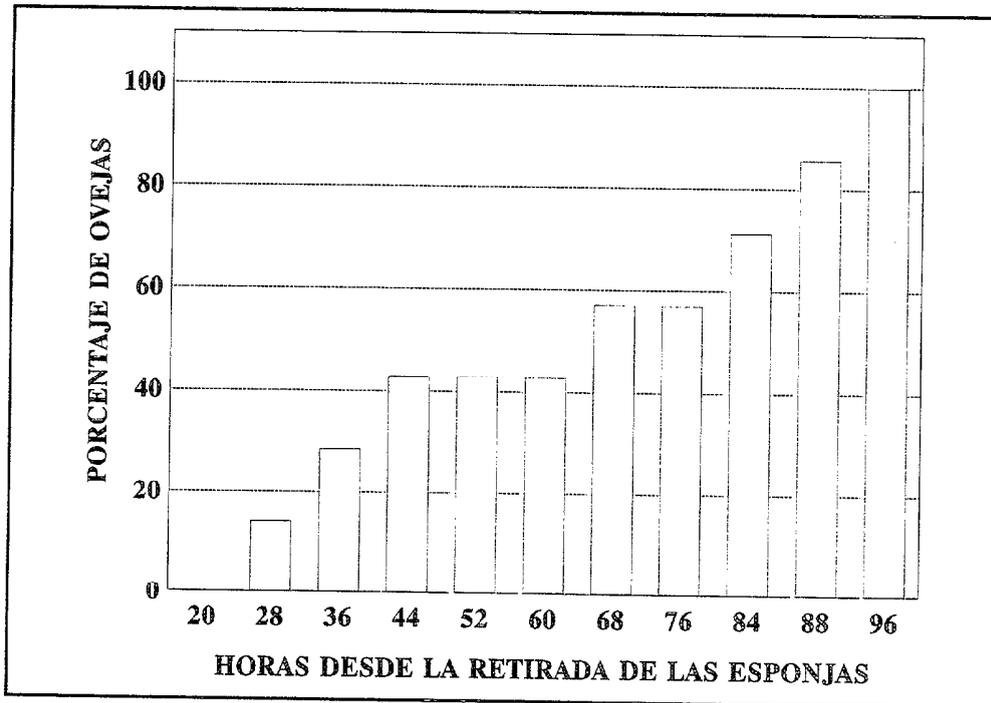


Figura 4. 20. Porcentaje de ovejas que presentan pico de LH tras la retirada de las esponjas

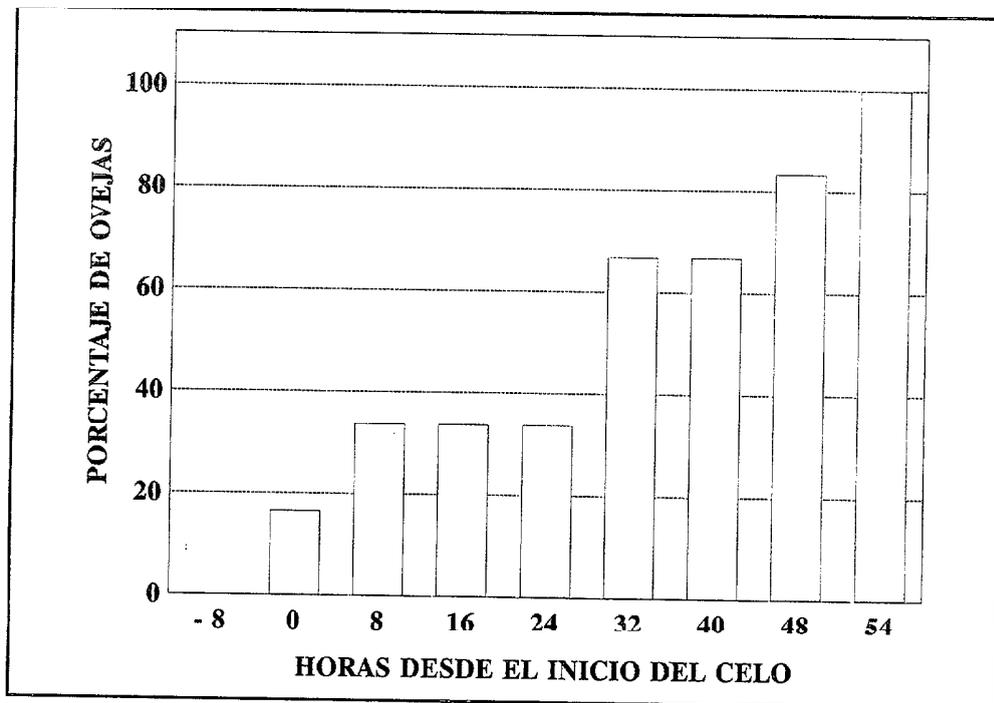


Figura 4. 21. Porcentaje de ovejas que presentan pico de LH con respecto al inicio del celo

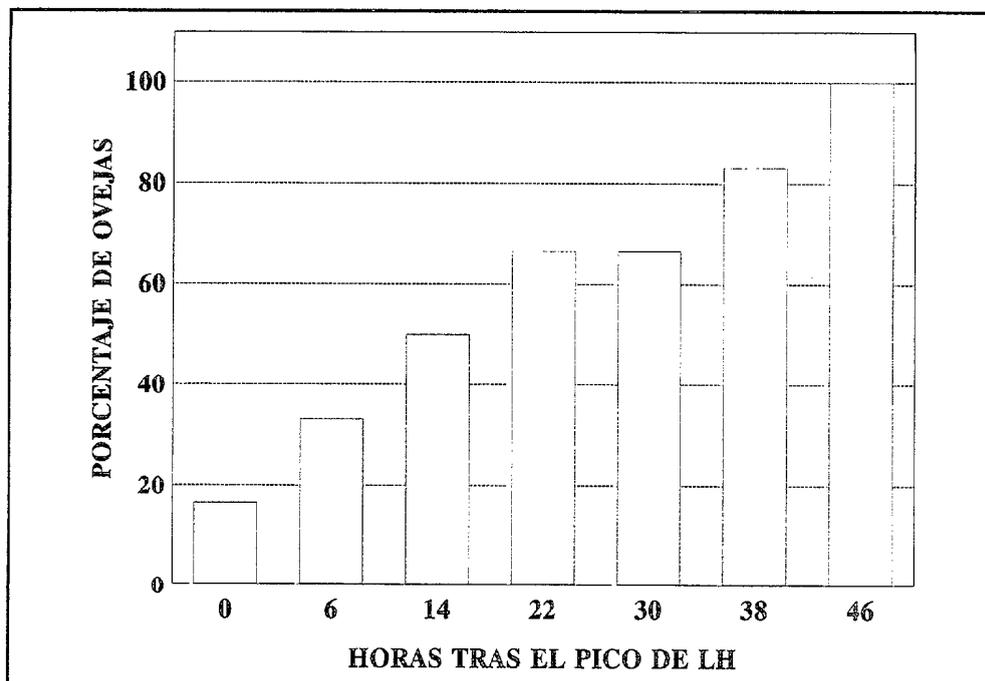


Figura 4. 22. Porcentaje de ovejas que finalizan el celo con respecto al pico de LH

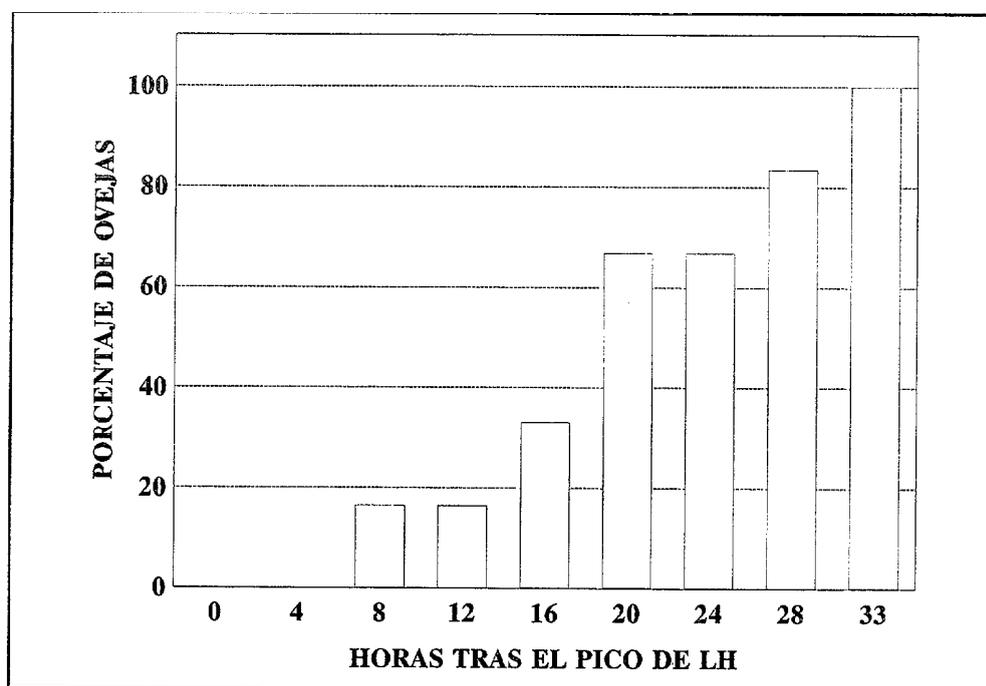


Figura 4. 23. Porcentaje de ovejas que ovulan con respecto al pico de LH

## 4.1.4.5. Onda preovulatoria de LH

## 4.1.4.5.1. Niveles de LH

Los niveles basales de LH oscilan entre 2-5 ng/ml y por lo general se mantienen hasta 8 horas antes y 8 horas después del pico preovulatorio de LH. A partir de estos niveles basales se produce una ascenso, alcanzando 4 horas antes de la máxima concentración de LH un valor medio de  $18.88 \pm 5.55$  ng/ml (6.7-44.4), para posteriormente alcanzarse el pico de LH con un valor de  $56.28 \pm 1.91$  ng/ml (48.5-61.2). Tras el pico de LH se produce el descenso, presentando 4 horas tras el pico un nivel medio de  $10.73 \pm 1.32$  ng/ml (7.5-15.5), para finalmente alcanzar de nuevo los niveles basales (tabla 4.4.).

Los perfiles individuales de la onda preovulatoria de LH de cada oveja estudiada se representan en la figura 4.24. La figura 4.25. muestra el perfil de los niveles medios de la onda preovulatoria de LH.

|                | MEDIDAS DE LH CADA 4 HORAS (ng/ml) |             |              |              |              |             |             |
|----------------|------------------------------------|-------------|--------------|--------------|--------------|-------------|-------------|
|                | - 12 h.                            | - 8 h.      | -4 h.        | 0 h.         | + 4 h.       | + 8 h.      | + 12 h.     |
| <b>OVEJA 1</b> | -----                              | -----       | 6.7          | 56.4         | 10.9         | 1.9         | 2.5         |
| <b>OVEJA 2</b> | 1.5                                | 1.8         | 9.4          | 56.0         | 15.5         | 1.9         | 2.4         |
| <b>OVEJA 3</b> | 2.6                                | 2.6         | 22.1         | 61.0         | 7.5          | 2.6         | 2.5         |
| <b>OVEJA 4</b> | 2.2                                | 3.1         | 15.1         | 48.5         | 9.1          | 2.0         | 1.7         |
| <b>OVEJA 6</b> | 2.2                                | 2.8         | 15.6         | 61.2         | 13.6         | 3.4         | 1.8         |
| <b>OVEJA 8</b> | 3.3                                | 5.6         | 44.4         | 54.6         | 7.8          | 2.8         | 2.6         |
| <b>MEDIA</b>   | <b>2.36</b>                        | <b>3.18</b> | <b>18.88</b> | <b>56.28</b> | <b>10.73</b> | <b>2.71</b> | <b>2.25</b> |
| <b>E. E.</b>   | <b>0.29</b>                        | <b>0.64</b> | <b>5.55</b>  | <b>1.91</b>  | <b>1.32</b>  | <b>0.28</b> | <b>0.16</b> |

Tabla 4.4. Niveles de LH (ng/ml) cada 4 horas, ajustados con respecto al pico máximo

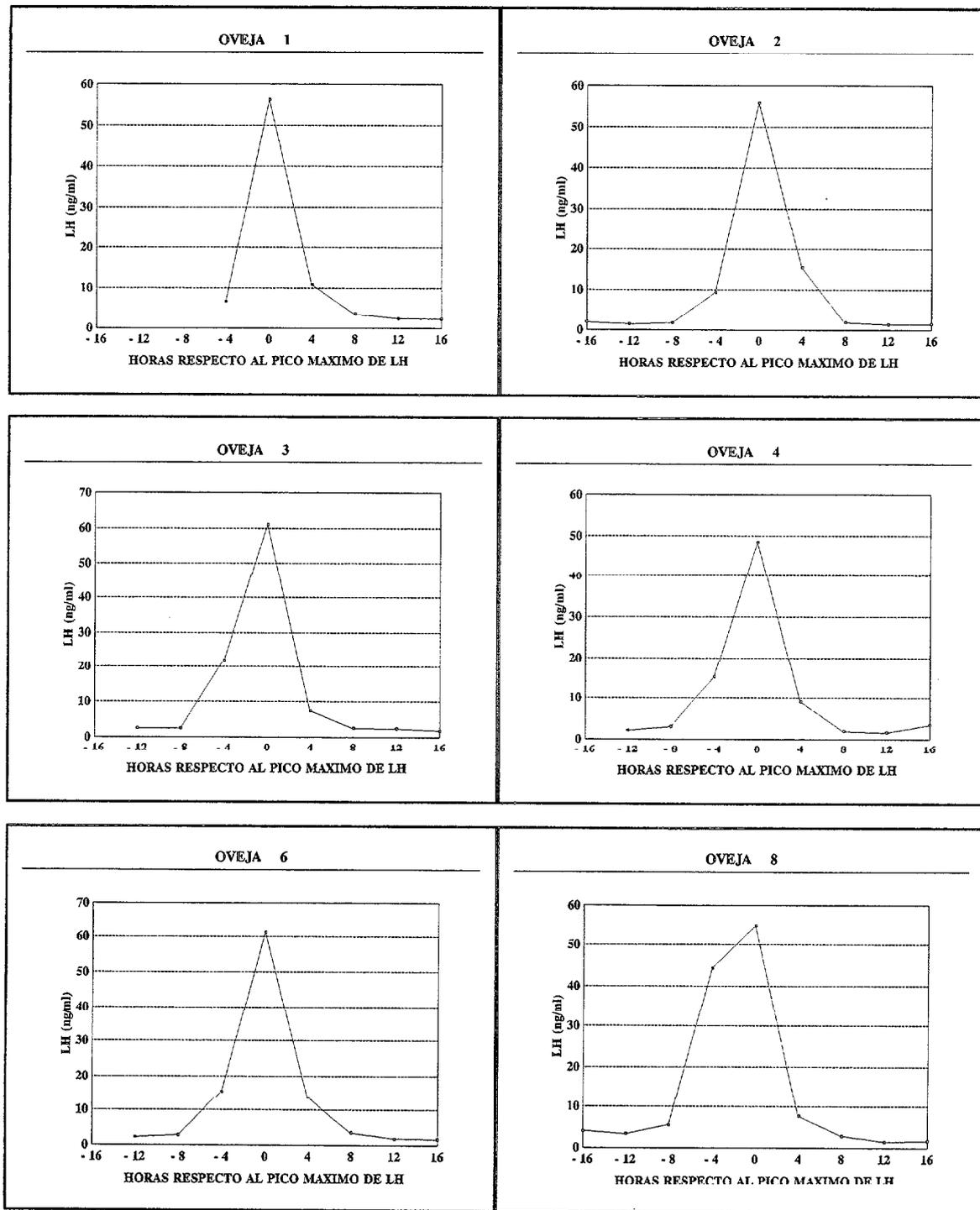


Figura 4. 24. Perfiles individuales (ng/ml) de la onda preovulatoria de LH

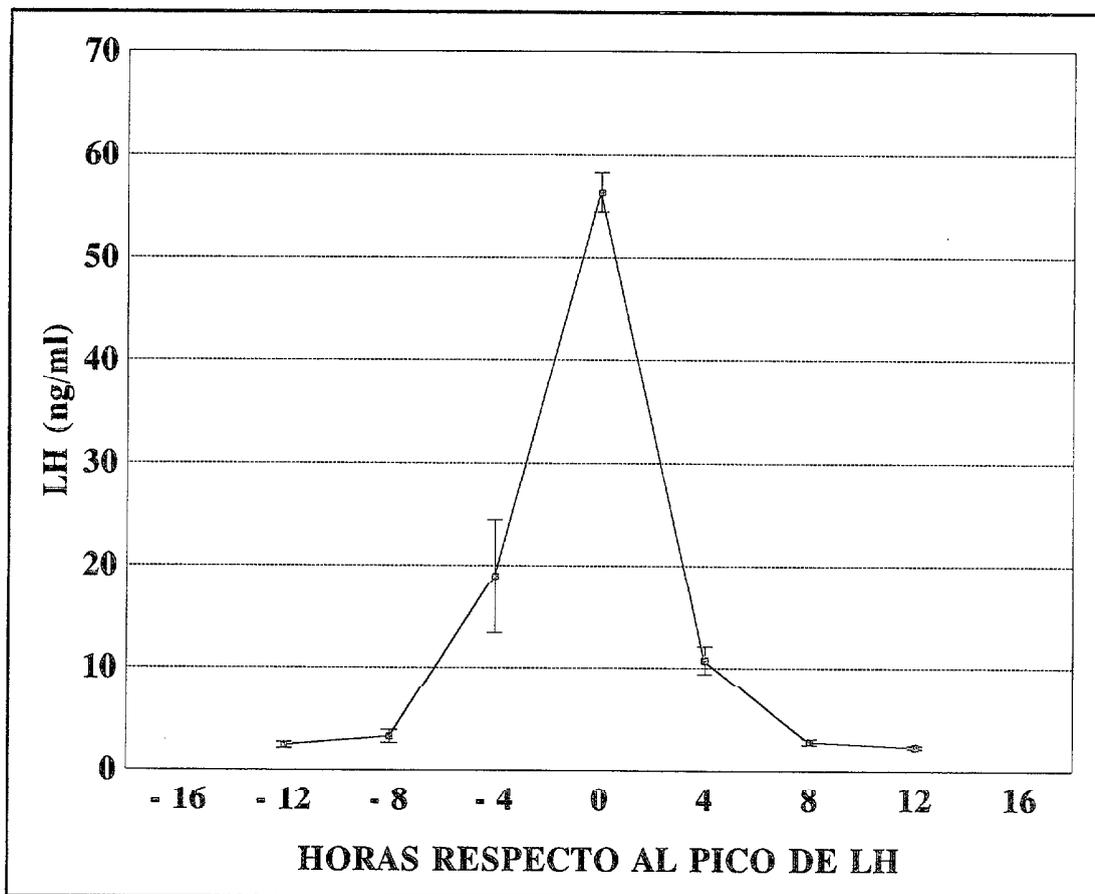


Figura 4. 25. Niveles medios ( $\pm$  error estándar) de la onda preovulatoria de LH

### 4.1.4.5.2. Duración de la onda de LH

La duración de la onda de LH se ha definido como el tiempo durante el cual los valores de LH son superiores a 5 ng/ml (horas); el momento en que se alcanzan los niveles de 5 ng/ml se ha determinado mediante cálculo proporcional a partir de los valores inmediatamente inferior y superior al nivel de 5 ng/ml. La duración de la onda preovulatoria de LH tiene un valor medio de  $14.12 \pm 0.36$  h., con un rango entre 13.4 y 15.3 horas. La duración del período de ascenso de la onda es superior a la duración del período de descenso ( $7.51 \pm 0.50$  vs  $6.61 \pm 0.26$ , respectivamente; tabla 4.5.), si bien las diferencias no llegan a ser significativas ( $p:0.11$ ).

### 4.1.4.5.3. Área bajo la onda de LH

El área bajo la onda preovulatoria de LH, definido como el conjunto de áreas de los trapecios que la constituyen, tiene un valor medio de  $357.88 \pm 25.38$  ng/ml, con unos extremos entre 292.50 y 442.66 ng/ml. El área de la fase de ascenso tiene un valor de 202.68 ng/ml frente a los 155.19 ng/ml del área de la fase descendente ( $p > 0.05$ , tabla 4.6.).

Existe una buena correlación ( $r=0.83$ ;  $p < 0.08$ ) entre la duración total de la onda preovulatoria de LH y la concentración de LH obtenida en el área bajo la curva de la onda. En la fase ascendente de la onda se observa una elevada correlación ( $r=0.94$ ), siendo además significativa ( $p < 0.02$ ), mientras que en fase descendente también existe una intensa correlación ( $r=0.88$ ), pero con un grado de significación menor ( $p < 0.05$ ). Por otra parte, el nivel de correlación entre el nivel máximo de LH y el área bajo el pico de LH tiene un valor inferior ( $r=0.38$ ,  $p > 0.1$ ).

### 4.1.4.5.4. Velocidad de la onda preovulatoria

A la hora de estudiar la velocidad de la onda preovulatoria, tanto de ascenso como de descenso, quedará definida como la pendiente en cada tramo (medida en ng), dividida por la duración del tramo (medido en horas).

La velocidad de la pendiente de ascenso de la onda es diferente entre el inicio de la onda preovulatoria hasta 4 horas antes del pico y entre 4 horas antes del pico hasta el valor máximo de LH (4.65 ng/hora vs 8.73 ng/hora, respectivamente), existiendo una diferencia tendente a la significación ( $p=0.08$ ); la velocidad de la pendiente total de ascenso desde el inicio de la onda hasta el momento de máxima concentración de LH tiene un valor medio de 6.82 ng/hora. Asimismo, la velocidad de la pendiente de descenso de la onda es significativamente ( $p<0.001$ ) más pronunciada entre 0 y 4 horas tras el pico de LH que entre 4 y 8 horas después del máximo nivel de LH (11.39 ng/h vs 2.18 ng/hora, respectivamente); la pendiente total de descenso desde el momento de máxima concentración de LH hasta el final de la onda tiene un valor medio de 7.75 ng/hora (tabla 4.6.).

Existe una correlación negativa entre la duración de la fase ascendente de la onda y la pendiente de ascenso ( $r=-0.79$ ), así como entre la pendiente de descenso y la fase descendente de la duración de la onda ( $r=-0.48$ ). La mayor duración de la fase ascendente de la onda se relaciona con una pendiente de ascenso más suave; la pendiente de descenso cae más bruscamente y en consecuencia, la duración de la fase de descenso es menor.

| DURACIÓN DE LA ONDA (HORAS) |                 |              |              |               |                |             |               |
|-----------------------------|-----------------|--------------|--------------|---------------|----------------|-------------|---------------|
| OVEJA                       | ASCENSO         |              |              | DESCENSO      |                |             | TOTAL         |
|                             | Inicio a - 4 h. | -4 h. a 0 h. | TOTAL        | 0 h. a + 4 h. | + 4 h. a Final | TOTAL       |               |
| 2                           | 2.315           | 4            | 6.315        | 4             | 3.088          | 7.088       | 13.403        |
| 3                           | 3.507           | 4            | 7.507        | 4             | 2.040          | 6.040       | 13.547        |
| 4                           | 3.366           | 4            | 7.366        | 4             | 2.310          | 6.310       | 13.676        |
| 6                           | 3.312           | 4            | 7.312        | 4             | 3.372          | 7.372       | 14.684        |
| 8                           | 5.043           | 4            | 9.043        | 4             | 6.240          | 6.240       | 15.283        |
| <b>MEDIA</b>                | <b>3.508</b>    | <b>4</b>     | <b>7.508</b> | <b>4</b>      | <b>2.61</b>    | <b>6.61</b> | <b>14.118</b> |
| <b>E. E.</b>                | <b>0.43</b>     | <b>0</b>     | <b>0.50</b>  | <b>0</b>      | <b>0.26</b>    | <b>0.26</b> | <b>0.36</b>   |

Tabla 4.5. Duración de los periodos de ascenso, descenso y total de la onda de LH.

| OVEJA        | VELOCIDAD DE LA PENDIENTE (ng/hora) |               |              |               |                |              | ÁREA BAJO LA CURVA |                |               |
|--------------|-------------------------------------|---------------|--------------|---------------|----------------|--------------|--------------------|----------------|---------------|
|              | ASCENSO                             |               |              | DESCENSO      |                |              | Ascenso            | Descenso       | TOTAL         |
|              | Inicio a - 4 h.                     | - 4 h. a 0 h. | TOTAL        | 0 h. a + 4 h. | + 4 h. a Final | TOTAL        |                    |                |               |
| 2            | 1.900                               | 11.650        | 8.706        | 10.125        | 3.400          | 7.195        | 147.468            | 174.652        | 322.12        |
| 3            | 4.876                               | 9.720         | 7.460        | 13.375        | 1.225          | 9.271        | 213.719            | 149.750        | 363.46        |
| 4            | 3.000                               | 8.350         | 5.910        | 9.850         | 1.774          | 6.893        | 161.025            | 131.470        | 292.50        |
| 6            | 3.200                               | 11.400        | 7.685        | 11.900        | 2.550          | 7.623        | 187.710            | 180.960        | 368.67        |
| 8            | 7.812                               | 2.550         | 5.484        | 11.700        | 1.250          | 7.984        | 305.533            | 139.130        | 442.66        |
| <b>MEDIA</b> | <b>4.651</b>                        | <b>8.734</b>  | <b>6.827</b> | <b>11.39</b>  | <b>2.183</b>   | <b>7.754</b> | <b>202.691</b>     | <b>155.190</b> | <b>357.88</b> |
| <b>E.E.</b>  | <b>1.74</b>                         | <b>1.65</b>   | <b>0.31</b>  | <b>0.64</b>   | <b>0.62</b>    | <b>0.35</b>  | <b>27.66</b>       | <b>9.73</b>    | <b>25.38</b>  |

Tabla 4.6. Pendiente y área bajo la curva de los periodos de ascenso, descenso y total de la onda de LH

#### **4.1.5. NIVELES PLASMÁTICOS DE PROGESTERONA**

La curva de progesterona ( $P_4$ ) con respecto al pico de LH la presentamos según el siguiente modelo: una fase de niveles basales ( $< 0.5$  ng/ml) posteriores al pico, fase de ascenso (0.5-4 ng/ml), fase de meseta ( $> 4$  ng/ml) y fase de descenso (4-0.5 ng/ml), hasta alcanzar de nuevo los niveles basales ( $< 0.5$  ng/ml) de la fase folicular del ciclo natural consecutivo. En conjunto, distinguimos una fase progesterónica ( $> 0.5$  ng/ml) y una fase no progesterónica ( $< 0.5$  ng/ml). Adams *et al.* (1988) presenta un modelo de curva de similar al anteriormente descrito.

En la **tabla 4.7.** se muestran los valores diarios de los niveles plasmáticos de  $P_4$  (ng/ml) de cada oveja y el valor medio ( $\pm$  error estándar), comenzando el día del pico de LH (día 0) y finalizando el día que se constata la ovulación del ciclo natural consecutivo al sincronizado. En la **tabla 4.8.** se presentan los valores medios ( $\pm$  error estándar) de cada una de las fases del perfil medio de  $P_4$  (ng/ml), así como la duración (días) de cada una de ellas.

La **fase de niveles basales** posterior al pico de LH, tiene una duración media próxima a 3 días de duración, con un valor de  $0.13 \pm 0.02$  ng/ml (**tabla 4.8.**). El 33.33% (2/6) de las ovejas presentan niveles basales de  $P_4$  sólo durante 24 horas tras el pico de LH; otro 33.3% (2/6) presenta niveles basales de  $P_4$  durante dos días tras el pico de LH y el restante 33.33% (2/6) de las ovejas presenta niveles basales de  $P_4$  durante más de tres días.

La **fase de ascenso** se instaura de manera rápida, con una duración de alrededor de 4 días, al final de la cual ya nos encontramos con valores por encima de 4 ng/ml (**tabla 4.8.**). La duración del periodo de ascenso de  $P_4$  se sitúa en la mayoría de las ovejas (4/6) alrededor de 4 días, independientemente de la duración del período de niveles basales y del

| DÍA | Nº 1        | Nº 2        | Nº 4        | Nº 5         | Nº 6         | Nº 8        | MEDIA | E.E. |
|-----|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|-------------|-------|------|
| 0   | 0.28        | 0.07        | 0.09        | 0.05         | 0.20         | 0.02        | 0.12  | 0.04 |
| 1   | 0.30        | 0.05        | 0.07        | 0.16         | 0.12         | 0.01        | 0.12  | 0.04 |
| 2   | 0.11        | 0.08        | 0.12        | <b>0.84</b>  | <b>0.56</b>  | 0.01        | 0.29  | 0.13 |
| 3   | 0.35        | 0.06        | <b>1.19</b> | <b>0.89</b>  | <b>0.73</b>  | <b>1.67</b> | 0.81  | 0.23 |
| 4   | 0.39        | 0.01        | <b>0.97</b> | <b>1.87</b>  | <b>1.42</b>  | <b>1.57</b> | 1.03  | 0.29 |
| 5   | <b>1.11</b> | 0.08        | <b>2.04</b> | <b>1.92</b>  | <b>3.17</b>  | <b>2.03</b> | 1.72  | 0.42 |
| 6   | <b>1.33</b> | 0.34        | <b>2.90</b> | <b>3.08</b>  | <i>6.69</i>  | <b>3.55</b> | 2.94  | 0.88 |
| 7   | <b>1.22</b> | <b>1.11</b> | <i>5.72</i> | <i>6.65</i>  | <i>9.72</i>  | <i>6.4</i>  | 5.14  | 1.37 |
| 8   | <b>2.49</b> | <b>2.37</b> | <i>4.59</i> | <i>7.87</i>  | <i>11.18</i> | <i>7.70</i> | 6.03  | 1.42 |
| 9   | <i>5.66</i> | <b>3.87</b> | <i>7.95</i> | <i>11.61</i> | <i>13.35</i> | <i>7.54</i> | 8.33  | 1.45 |
| 10  | <i>8.00</i> | <i>4.02</i> | <i>7.19</i> | <i>11.71</i> | <i>13.92</i> | <i>6.98</i> | 8.47  | 1.3  |
| 11  | <i>9.44</i> | <i>5.65</i> | <i>7.69</i> | <i>8.18</i>  | <i>8.98</i>  | <i>5.17</i> | 7.51  | 0.71 |
| 12  | <i>7.93</i> | <i>5.84</i> | <i>6.56</i> | <i>9.24</i>  | <i>6.43</i>  | <i>4.55</i> | 6.75  | 0.66 |
| 13  | <i>8.51</i> | <i>5.49</i> | <i>5.80</i> | <i>6.87</i>  | <i>5.75</i>  | <i>4.79</i> | 6.20  | 0.53 |
| 14  | <i>5.04</i> | <i>4.93</i> | <i>5.63</i> | <i>6.17</i>  | <i>8.96</i>  | <b>3.55</b> | 5.71  | 0.74 |
| 15  | <b>3.97</b> | <i>5.82</i> | <b>2.69</b> | <b>1.60</b>  | <i>8.81</i>  | 0.33        | 3.87  | 1.25 |
| 16  | <b>1.89</b> | <i>6.14</i> | <b>1.27</b> | 0.10         | <i>7.29</i>  | 0.10        | 2.79  | 1.27 |
| 17  | 0.10        | <i>5.29</i> | <b>1.38</b> | 0.10         | <i>4.37</i>  | 0.24        | 1.91  | 0.95 |
| 18  | 0.10        | <i>5.36</i> | 0.37        | 0.10         | <b>1.20</b>  | 0.10        | 1.20  | 0.84 |
| 19  | 0.10        | <i>4.88</i> | 0.42        | 0.47         | 0.32         |             | 1.24  | 0.91 |
| 20  | 0.10        | <b>3.03</b> |             | 0.49         | 0.41         |             | 1.31  | 0.85 |
| 21  |             | <b>3.14</b> |             | 0.70         |              |             | 1.92  | 1.22 |
| 22  |             | 0.28        |             |              |              |             | 0.28  | ---  |
| 23  |             | 0.10        |             |              |              |             | 0.10  | ---  |
| 24  |             | 0.10        |             |              |              |             | 0.10  | ---  |
| 25  |             | 0.10        |             |              |              |             | 0.10  | ---  |

En **negrita** los valores de la fase de ascenso y descenso. En *cursiva*, los valores de la fase de meseta.

Tabla 4.7. Valores diarios y media ( $\pm$  error estándar) de los niveles de progesterona (ng/ml) (día 0 = día del pico de LH)

| FASE              | NIVEL MEDIO<br>(ng/ml) | DURACIÓN<br>(días) |
|-------------------|------------------------|--------------------|
| Basal post-pico   | 0.13 ± 0.02            | 2.90 ± 0.79        |
| Ascenso           | 1.82 ± 0.19            | 3.87 ± 0.27        |
| Meseta            | 7.17 ± 0.31            | 8.77 ± 0.81        |
| Descenso          | 2.32 ± 0.32            | 1.97 ± 0.32        |
| Basal pre-pico    | 0.24 ± 0.04            | 1.66 ± 0.62        |
| PROGESTERÓNICA    | 5.02 ± 0.30            | 14.63 ± 0.71       |
| NO PROGESTERÓNICA | 0.19 ± 0.02            | 4.56 ± 0.94        |
| TOTAL CICLO       | 3.55 ± 0.28            | 19.19 ± 1.07       |

Tabla 4.8. Media ( ± error estándar) del nivel medio y duración de las fases del perfil de progesterona (n = 6)

pico de LH. No existe relación entre una mayor o menor duración del comportamiento estral con unos niveles basales de  $P_4$  más prolongados ni de un ascenso más rápido de  $P_4$  con un mayor número de ovulaciones.

La fase de meseta aparece como media a los 8 días del pico de LH y esta meseta se mantiene hasta los días 15-16 con respecto al pico de LH (14 días respecto a la ovulación estimada). Los valores medios de  $P_4$  durante este período se hallan entre  $7.17 \pm 0.31$  ng/ml y la duración media de la meseta es cercana a los 9 días (tabla 4.8.). No existe una relación entre la longitud de la meseta y el momento en que se produce el ascenso de  $P_4$ , es decir, la duración de la meseta de  $P_4$  es independiente del momento en que se produce la subida de  $P_4$ . No aparecen diferencias significativas en los valores de  $P_4$  durante la fase de meseta para animales que difieren en tasa de ovulación. Asimismo, el número de cuerpos lúteos no tiene influencia sobre la duración de la meseta de  $P_4$ .

La fase de descenso comienza como media el día 16 con respecto al pico de LH y finaliza sobre el día 17-18, con una duración media alrededor de dos días. Los niveles plasmáticos medios de  $P_4$  durante esta fase de descenso se sitúan en  $2.32 \pm 0.32$  ng/ml (tabla 4.8.). El 50% (3/6) de las ovejas tienen una brusca caída de  $P_4$  puesto que apenas transcurre un día hasta alcanzar niveles basales, mientras el restante 50% (3/6) de las ovejas presentan una fase de descenso más suave de una duración de 2 a 3 días.

La duración de la fase de descenso de  $P_4$  es independiente de la duración de la fase de ascenso y de la meseta de  $P_4$ , así como del número de cuerpos lúteos presentes y de los niveles de  $P_4$ .

Los niveles basales de  $P_4$  se constatan una vez finalizada la fase de descenso y continúan hasta la finalización de la experiencia (coincidente con la ovulación del ciclo

natural consecutivo). La duración media de la fase basal pre-pico es ligeramente superior al día y medio, con unos niveles medios de  $0.24 \pm 0.04$  ng/ml (tabla 4.8.).

En conjunto se puede afirmar que tras el pico de LH, existen 3 días con niveles basales, se produce una fase de ascenso cercana a 4 días, una fase de meseta de casi 9 días de duración y una fase de descenso de 2 días de duración, comenzando de nuevo los niveles basales durante 1 día y medio hasta el pico de LH del ciclo consecutivo. Por lo tanto, la oveja canaria presenta una fase no progesterónica (valores  $< 0.5$  ng/ml), superior a los 4 días y medio de duración, y una fase progesterónica de 14.6 días de duración (tabla 4.8.).

En las figura 4.26. se representan los perfiles de progesterona (ng/ml) de cada una de las ovejas, comenzando 48 horas antes del pico de LH y finalizando el día que se constata la ovulación del ciclo natural consecutivo al sincronizado.

En la figura 4.27. se representa el perfil de la media aritmética ( $\pm$  error estándar) diaria de los niveles plasmáticos de progesterona de cada oveja. Estos valores muestran un patrón desajustado como consecuencia de que en las diversas hembras no coincide la duración de cada fase.

En la figura 4.28. se representa el perfil de la media de los niveles de progesterona, obtenidos tras la normalización de los perfiles individuales a la duración media de cada fase, por interpolación cúbica realizada mediante el programa MATLAB™ (MathWorks, Inc.). El coeficiente de correlación entre la media aritmética de las áreas bajo la curva en cada fase y el área de cada fase bajo la curva obtenida por interpolación cúbica es altamente significativo ( $p < 0.01$ ), lo cual valida este perfil como expresión gráfica adecuada de la media de los perfiles medios.

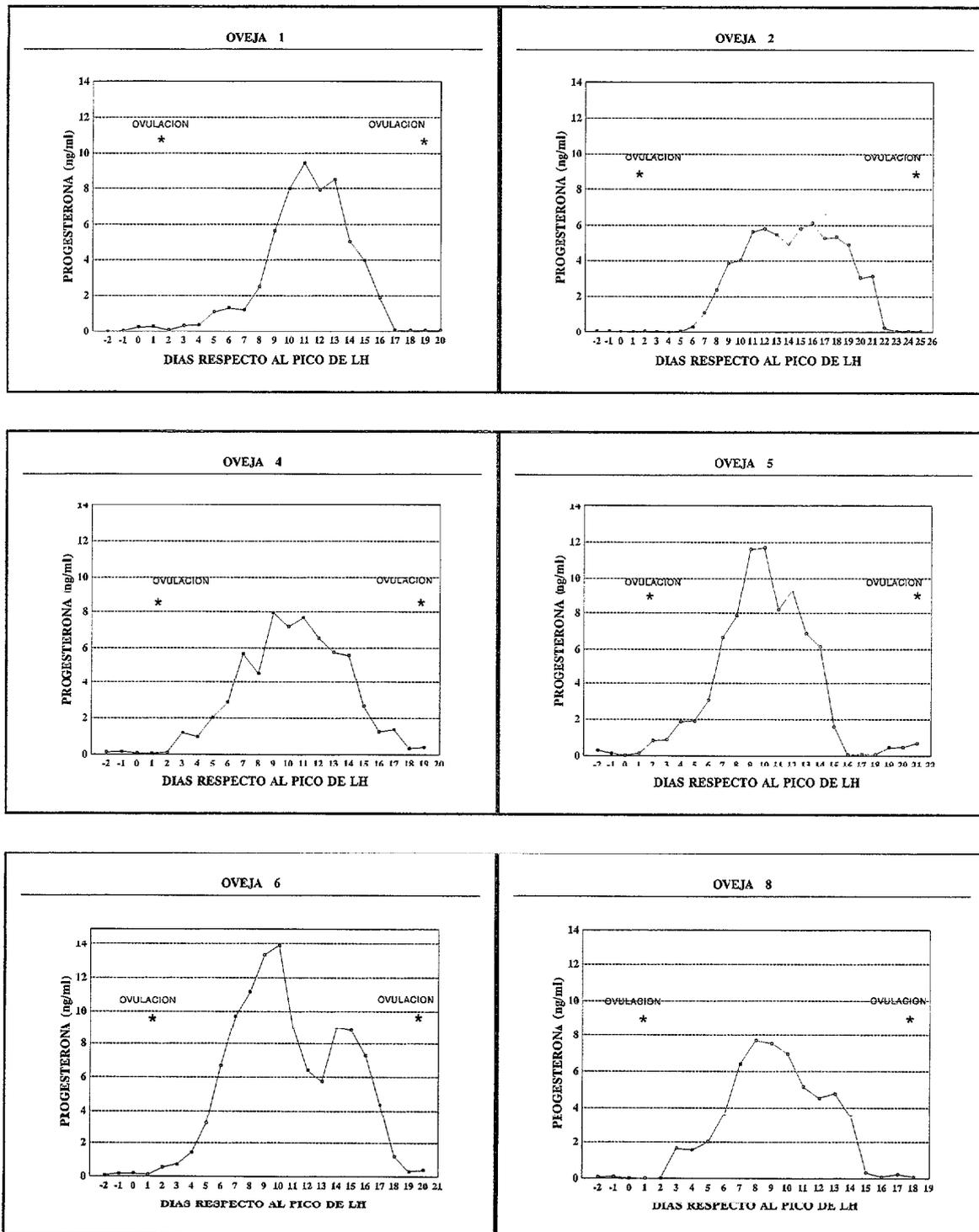


Figura 4. 26. Perfiles de progesterona (ng/ml) de cada oveja (comenzando 2 días antes del pico de LH y finalizando el día de la ovulación del ciclo consecutivo)

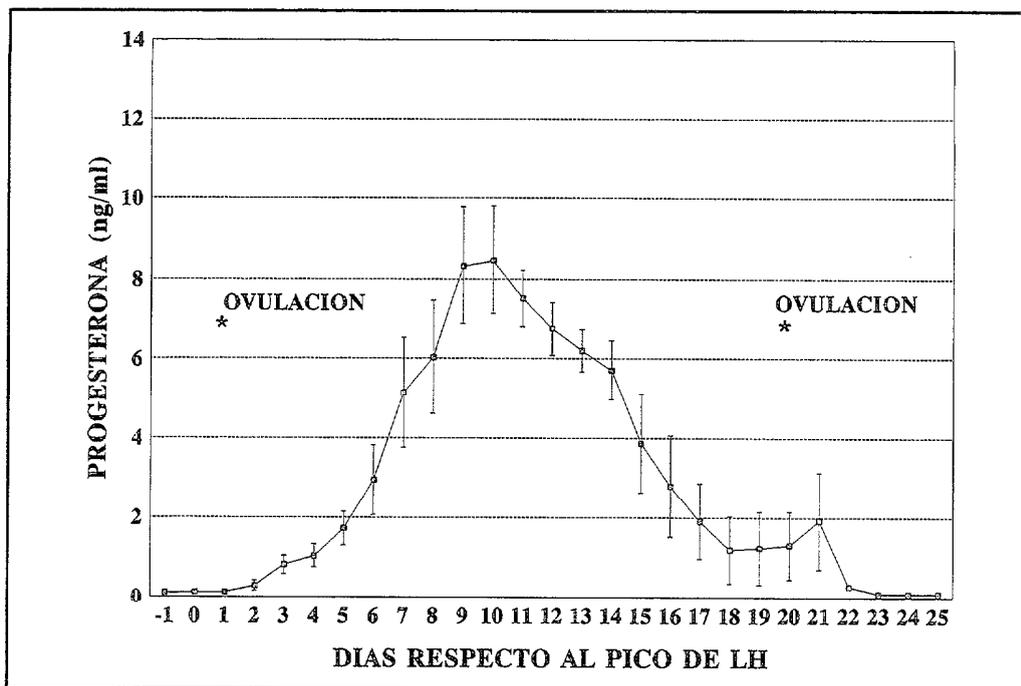


Figura 4. 27. Perfil de valores medios diarios de progesterona ( $\pm$  error estándar)

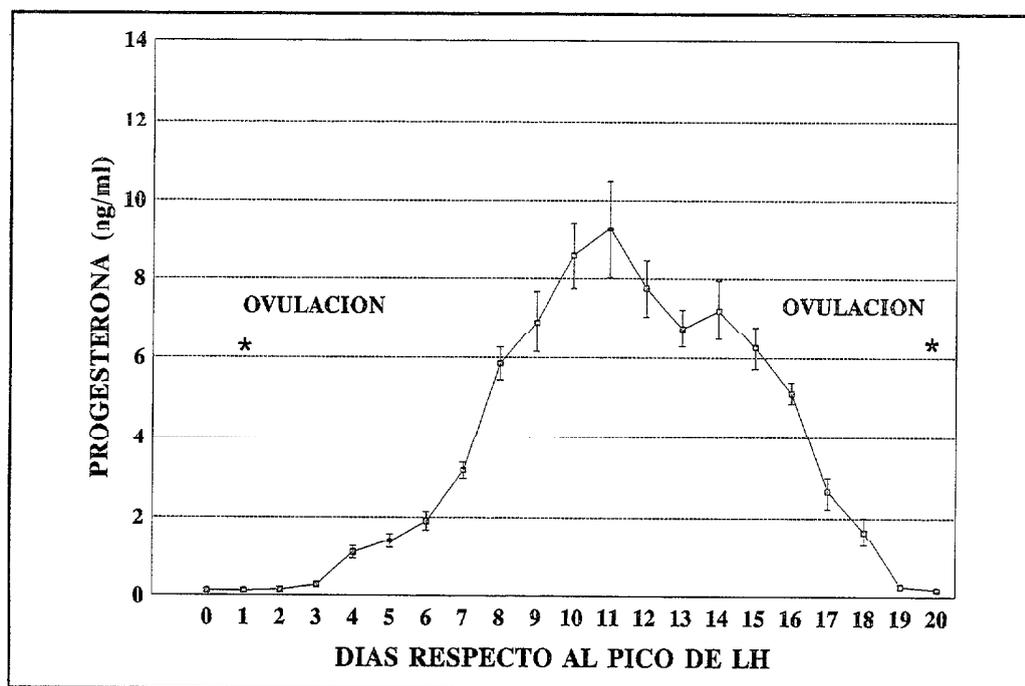


Figura 4. 28. Perfil de progesterona ajustado a la duración media de las fases ( $\pm$  error estándar)

#### **4.1.6. RELACIONES ENTRE NIVELES HORMONALES, CELO Y OVULACIÓN**

En la **figura 4.29.** se representan las relaciones temporales entre los niveles de LH y progesterona, inicio y final del celo, y el momento de la ovulación, utilizando los valores medios y error estándar de los intervalos fisiológicos expresados en anteriores apartados.

No observamos relación entre el momento del pico de LH y el inicio del celo o la duración del mismo, apreciándose, por tanto, amplia variabilidad individual en lo que respecta al momento del pico de LH con respecto al celo. Asimismo, tampoco apreciamos relación entre la máxima concentración alcanzada de LH y la descarga total de LH con respecto al inicio, final o duración total del celo. El pico máximo de LH tiene lugar a las  $25.33 \pm 9.20$  horas del comienzo del celo, ligeramente después de la mitad del celo.

Todas las ovejas que presentaron pico de LH ovularon y mostraron claros síntomas de celo, salvo una oveja que presentó un pico de LH de magnitud y duración normal pero sin manifestar comportamiento estral. Este pico de LH se presenta durante el celo con la excepción de una oveja que exhibió un pico de LH posterior a la finalización del mismo.

La ovulación acontece a las  $19.7 \pm 3.65$  horas tras el pico de LH, ajustándose al final del celo. No observamos relación entre la máxima concentración alcanzada de LH con respecto al momento de ovulación o con una mayor tasa de ovulación.

Los niveles plasmáticos de  $P_4$  alrededor del pico de LH y durante el celo son netamente basales ( $< 0.5$  ng/ml), alcanzándose niveles funcionales ( $> 0.5$  ng/ml) 2.9 días tras el pico de LH, es decir 1.9 días tras la ovulación.

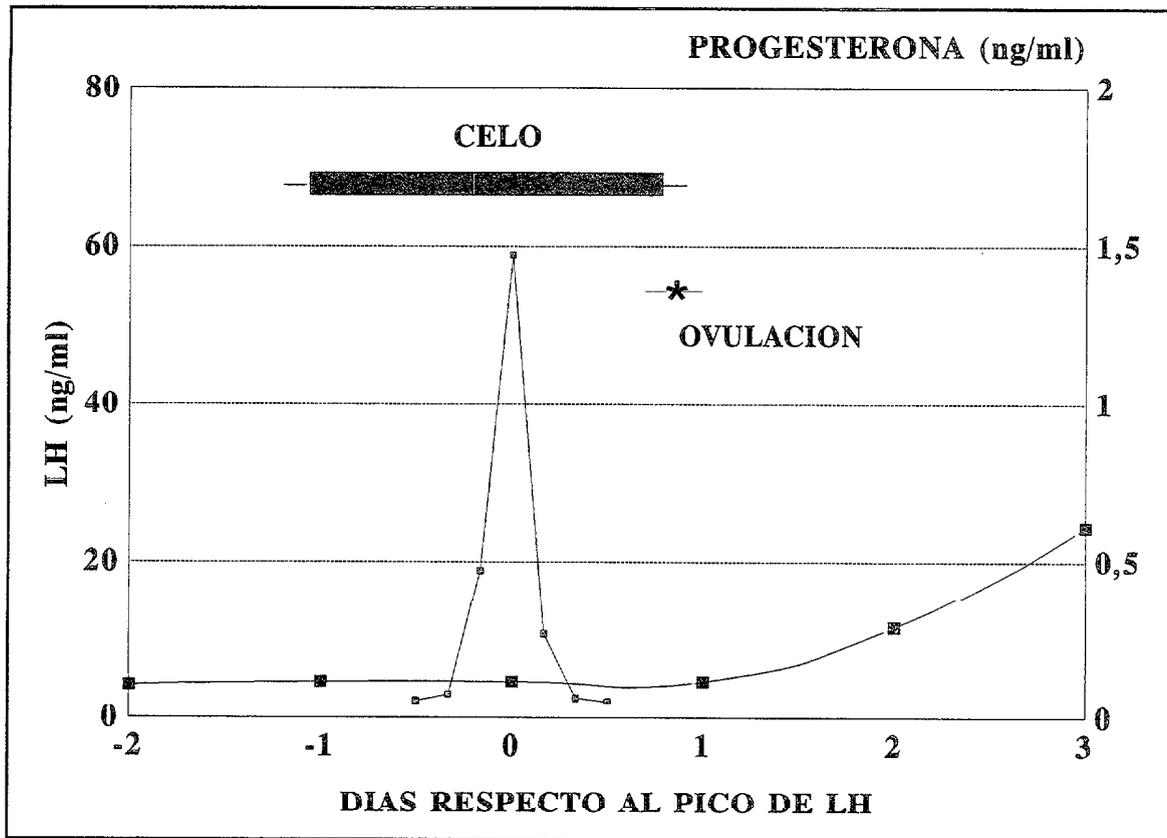


Figura 4. 29. Relación entre perfiles hormonales, celo y ovulación estimada

## 4.2. DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD FOLICULAR

### 4.2.1. POBLACIÓN FOLICULAR A LO LARGO DE LA FASE FOLICULAR

Una vez realizada la disección folicular y en función del número de folículos obtenidos de manera íntegra, se obtiene que la población total de folículos por oveja no varía a lo largo de los tres días de la fase folicular. El número total de folículos por oveja fue de  $12.67 \pm 4.36$ ,  $10.33 \pm 1.85$  y  $13.33 \pm 3.75$  para los días 1, 2 y 3 de la fase folicular, respectivamente (tabla 4.9., figura 4.30.).

El día 1 existe un predominio de folículos medianos, seguido de los folículos pequeños y por último, los folículos mayores de 4 mm. de diámetro. El día 2 no existen diferencias significativas entre folículos pequeños, medianos y grandes. Por último, el día 3 de la fase folicular existe una mayoría de folículos medianos, seguido de folículos pequeños y grandes, no existiendo diferencias significativas entre estas dos últimas categorías foliculares. Como consecuencia de lo anterior, en el conjunto de los tres días, se obtiene una mayoría de folículos medianos, seguido de folículos pequeños y grandes, sin diferencias entre estas dos últimas tallas foliculares (tabla 4.9., figura 4.30.).

El 100% de las ovejas presentan varios folículos entre 1-2 y 2-4 mm. de diámetro el día 1 de la fase folicular, mientras que al menos un folículo de 4 mm. de diámetro está presente en todas las ovejas, si bien un 33% de los ovarios examinados carece de folículos mayores de 4 mm. de diámetro.

El 100% de las ovejas presentan varios folículos entre 1-2 y 2-4 mm. de diámetro el 2º día de la fase folicular. El 66.6% de las ovejas presentan folículos mayores de 4 mm. de diámetro, mientras un 50.0% de los ovarios examinados carecen de folículos mayores de 4 mm. de diámetro.

El 100% de las ovejas tenían folículos entre 1-2 y 2-4 mm. de diámetro el día 3 de la fase folicular. El 66.6% de las ovejas mostraban folículos mayores de 4 mm. de diámetro, y un 66.6% de los ovarios presentaban folículos mayores de 4 mm. de diámetro.

| TAMAÑO FOLICULAR |                           |                          |                          | TOTAL        |
|------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------|
| DÍA              | 1-2 mm                    | 2-4 mm                   | > 4 mm                   |              |
| 1                | 4.0 ± 0.57 <sup>a</sup>   | 7.0 ± 0.57 <sup>b</sup>  | 1.66 ± 0.33 <sup>c</sup> | 12.67 ± 4.36 |
| 2                | 3.0 ± 0.57                | 4.66 ± 0.66              | 2.66 ± 1.76              | 10.33 ± 1.85 |
| 3                | 4.33 ± 0.88 <sup>ab</sup> | 6.66 ± 0.33 <sup>a</sup> | 2.33 ± 1.45 <sup>b</sup> | 13.33 ± 3.75 |
| <b>MEDIA</b>     | 3.77 ± 0.40 <sup>a</sup>  | 6.11 ± 0.45 <sup>b</sup> | 2.22 ± 0.68 <sup>a</sup> | 12.11 ± 1.85 |

<sup>ab</sup> Letras distintas dentro de una misma fila representan diferencias significativas (p<0.05)  
 Los resultados se expresan en número de folículos/oveja

Tabla 4. 9. Población y talla folicular a lo largo de la fase folicular

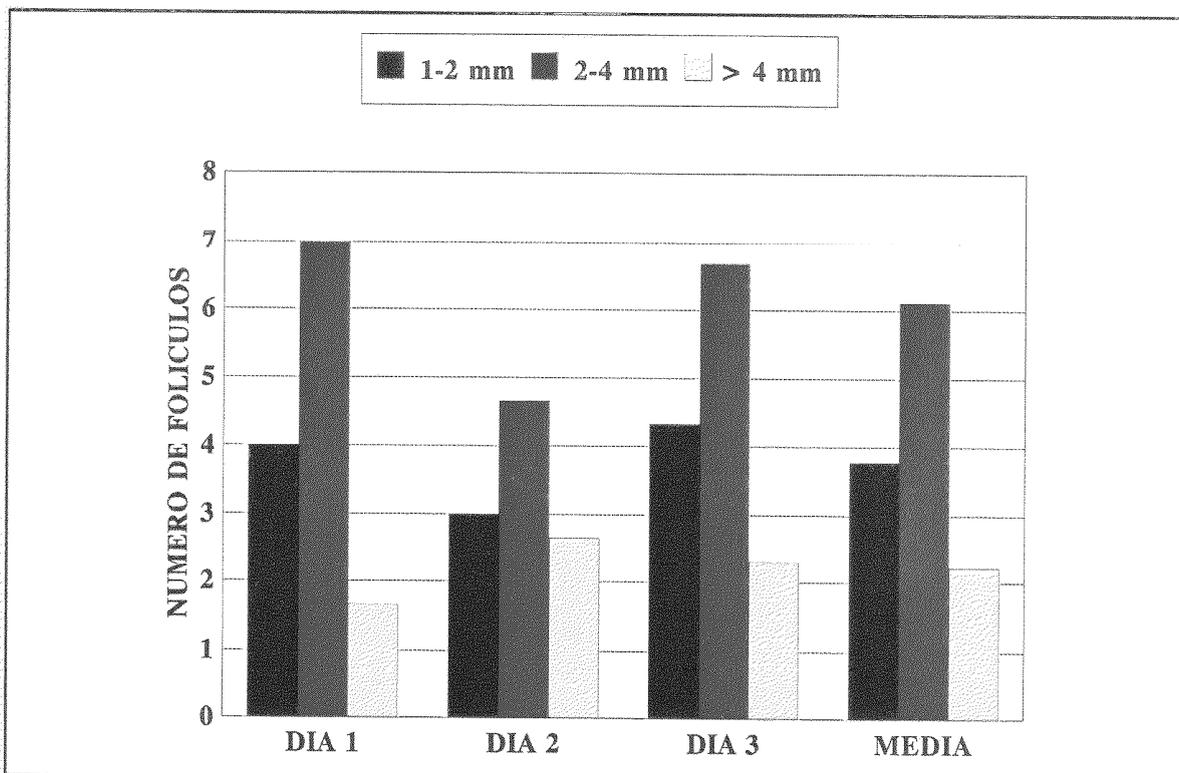


Figura 4. 30. Población y talla folicular a lo largo de la fase folicular

#### **4.2.2. CALIDAD FOLICULAR A LO LARGO DE LA FASE FOLICULAR**

El *día 1* de la fase folicular existe un predominio de folículos atrésicos sobre folículos normales (64.8% vs 35.1 %,  $p < 0.05$ ; tabla 4.10., figura 4.31.).

El *día 1* no existen diferencias entre las fases temprana y avanzada de atresia (54.1% vs 45.8%; tabla 4.11., figura 4.32.), ni entre las dos fases de atresia temprana (61.5% vs 38.4%; tabla 4.12., figura 4.33.), pero sí entre la atresia avanzada 1 y la atresia avanzada 2 (90.9% vs 9.1%;  $p < 0.01$ ; tabla 4.13, figura 4.34.)

El *día 2* de la fase folicular existe una mayoría de folículos atrésicos sobre los folículos normales (66.6% vs 33.3%,  $p < 0.01$ ; tabla 4.10, figura 4.31.).

Dentro de los folículos atrésicos, el día 2 existe una mayoría de folículos en atresia temprana que de folículos en atresia avanzada (70% vs 30%;  $p < 0.05$ , tabla 4.11., figura 4.32.). No existen diferencias significativas entre atresia temprana 1 y atresia temprana 2 (64.3% vs 35.7%; tabla 4.12., figura 4.33.), mientras que existe una mayoría de folículos en atresia avanzada 1 con respecto a los folículos en atresia avanzada 2 (83.33% vs 16.66%;  $p < 0.05$ , tabla 4.13, figura 4.34).

El *día 3* de la fase folicular no existen diferencias entre el porcentaje de folículos atrésicos y folículos normales (54.3% vs 45.7%; tabla 4.10, figura 4.31.).

Dentro de los folículos atrésicos, el día 3 de la fase folicular no se observan diferencias significativas entre atresia temprana y atresia avanzada (42.10% vs 57.90%; tabla 4.11., figura 4.32). Tampoco existen diferencias significativas entre las fases de atresia temprana (62.5% vs 37.5%; tabla 4.12., figura 4.33.), ni entre las fases de atresia avanzada (63.6% vs 36.3%; tabla 4.13, figura 4.34).

Al estudiar *el conjunto de los tres días*, observamos que predominan los folículos atrésicos sobre los folículos normales (61.7% vs 38.2%,  $p < 0.01$ ; **tabla 4.10, figura 4.31**).

En el conjunto de los tres días, dentro de los folículos atrésicos no existen diferencias entre atresia temprana y atresia avanzada (55.55% vs 44.44%, **tabla 4.11., figura 4.32** ). Dentro de las fases tempranas, predominan los folículos en atresia temprana 1 sobre los folículos en atresia temprana 2 (62.85% vs 37.15%;  $p < 0.05$ , **tabla 4.12., figura 4.33.**), mientras que en las fases avanzadas predominan los folículos en atresia avanzada 1 sobre los folículos en atresia avanzada 2 (78.57% vs 21.43%;  $p < 0.01$ , **tabla 4.13, figura 4.34**).

*A lo largo de los tres días de la fase folicular*, el número de folículos normales no experimenta variación significativa (35.1%, 33.3% y 45.7%, días 1, 2 y 3 respectivamente; **tabla 4.10., figura 4.31.**), y consecuentemente tampoco el porcentaje de folículos atrésicos.

La evolución de la profundidad de la atresia no muestra diferencias significativas a lo largo de los tres días de la fase folicular, si bien al comparar el día 2 con el 3, se aprecia una diferencia cercana a la significación en el porcentaje de atresia temprana (70% vs 42%, respectivamente,  $p = 0.06$ ; **tabla 4.11., figura 4.32.**).

No existen diferencias significativas entre los distintos grados de atresia temprana (con porcentajes de atresia similares; **tabla 4.12, figura 4.33.**), así como tampoco entre las distintas fases de atresia avanzada (**tabla 4.13, figura 4.34**).

|             | NORMALES                    | ATRESICOS                   |
|-------------|-----------------------------|-----------------------------|
| DIA 1       | 35.13% <sup>a</sup><br>(13) | 64.86% <sup>b</sup><br>(24) |
| DIA 2       | 33.33% <sup>a</sup><br>(10) | 66.66% <sup>b</sup><br>(20) |
| DIA 3       | 45.71% <sup>a</sup><br>(16) | 54.28% <sup>b</sup><br>(19) |
| VALOR MEDIO | 38.23% <sup>a</sup><br>(39) | 61.76% <sup>b</sup><br>(63) |

<sup>ab</sup> Letras distintas dentro de una misma fila representan diferencias significativas ( $p < 0.01$ )  
 Los números entre paréntesis representan el número total de folículos en cada categoría

Tabla 4. 10. Porcentaje de folículos normales y atrésicos a lo largo de la fase folicular

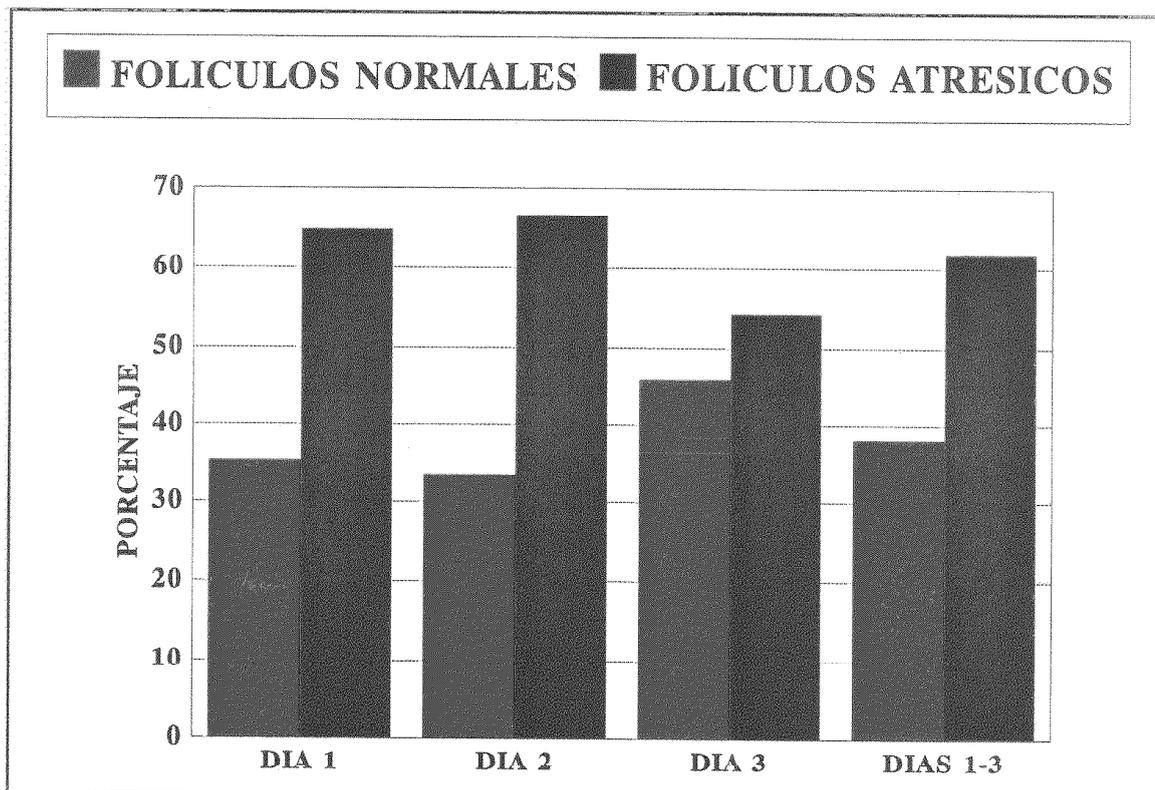


Figura 4. 31. Porcentaje de folículos normales y atrésicos a lo largo de la fase folicular

|             | GRADOS DE ATRESIA          |                           |
|-------------|----------------------------|---------------------------|
|             | ATRESIA TEMPRANA           | ATRESIA AVANZADA          |
| DIA 1       | 54.17%<br>(13)             | 45.83%<br>(11)            |
| DIA 2       | 70.0% <sup>a</sup><br>(14) | 30.0% <sup>b</sup><br>(6) |
| DIA 3       | 42.10%<br>(8)              | 57.90%<br>(11)            |
| VALOR MEDIO | 55.55%<br>(35)             | 44.44%<br>(28)            |

<sup>ab</sup> Letras distintas dentro de una misma fila representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )  
Los números entre paréntesis representan el número total de folículos en cada categoría

Tabla 4. 11. Porcentaje y grados de atresia a lo largo de la fase folicular

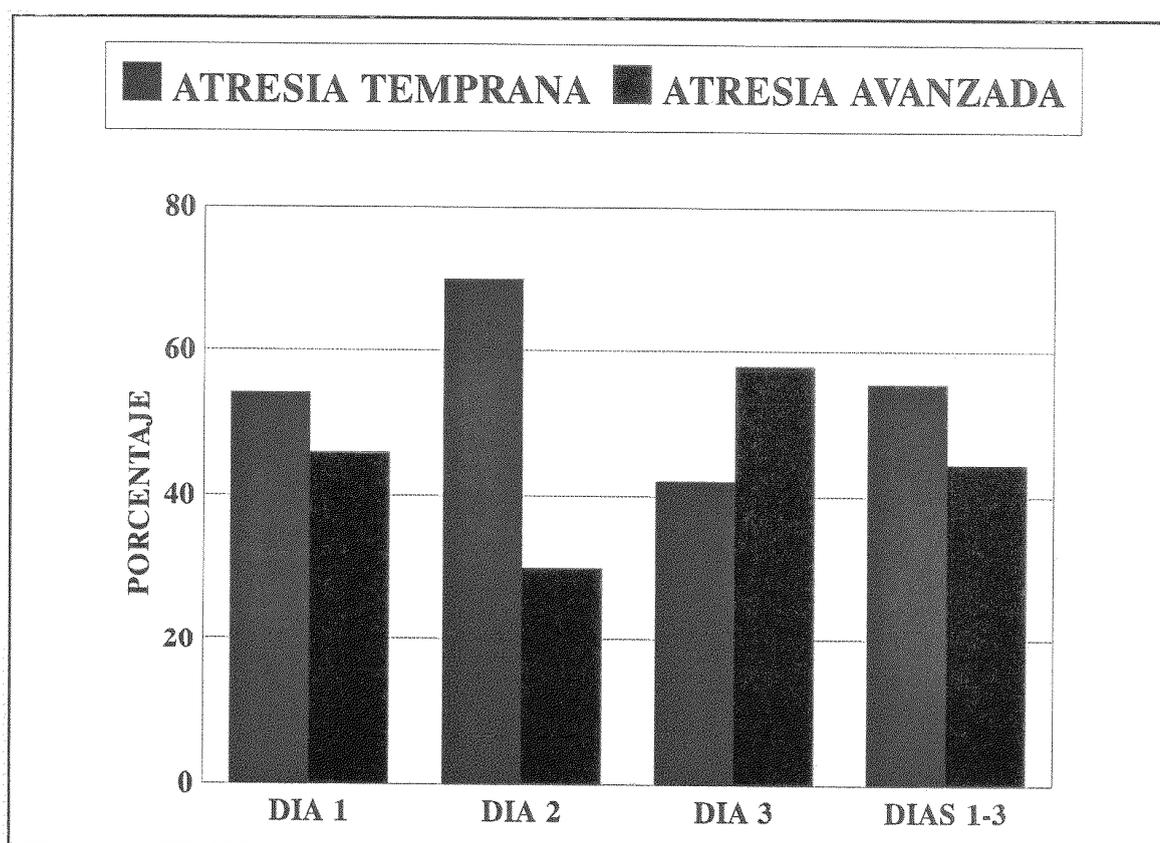


Figura 4. 32. Porcentaje y grados de atresia a lo largo de la fase folicular

|             | TIPOS DE ATRESIA TEMPRANA   |                             |
|-------------|-----------------------------|-----------------------------|
|             | ATRESIA TEMPRANA 1          | ATRESIA TEMPRANA 2          |
| DIA 1       | 61.53%<br>(8)               | 38.47%<br>(5)               |
| DIA 2       | 64.28<br>(9)                | 35.70<br>(5)                |
| DIA 3       | 62.50%<br>(5)               | 37.50%<br>(3)               |
| VALOR MEDIO | 62.85% <sup>a</sup><br>(22) | 37.15% <sup>b</sup><br>(13) |

<sup>ab</sup> Letras distintas dentro de una misma fila representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )  
Los números entre paréntesis representan el número total de folículos en cada categoría

Tabla 4. 12. Distribución de los tipos de atresia temprana a lo largo de la fase folicular

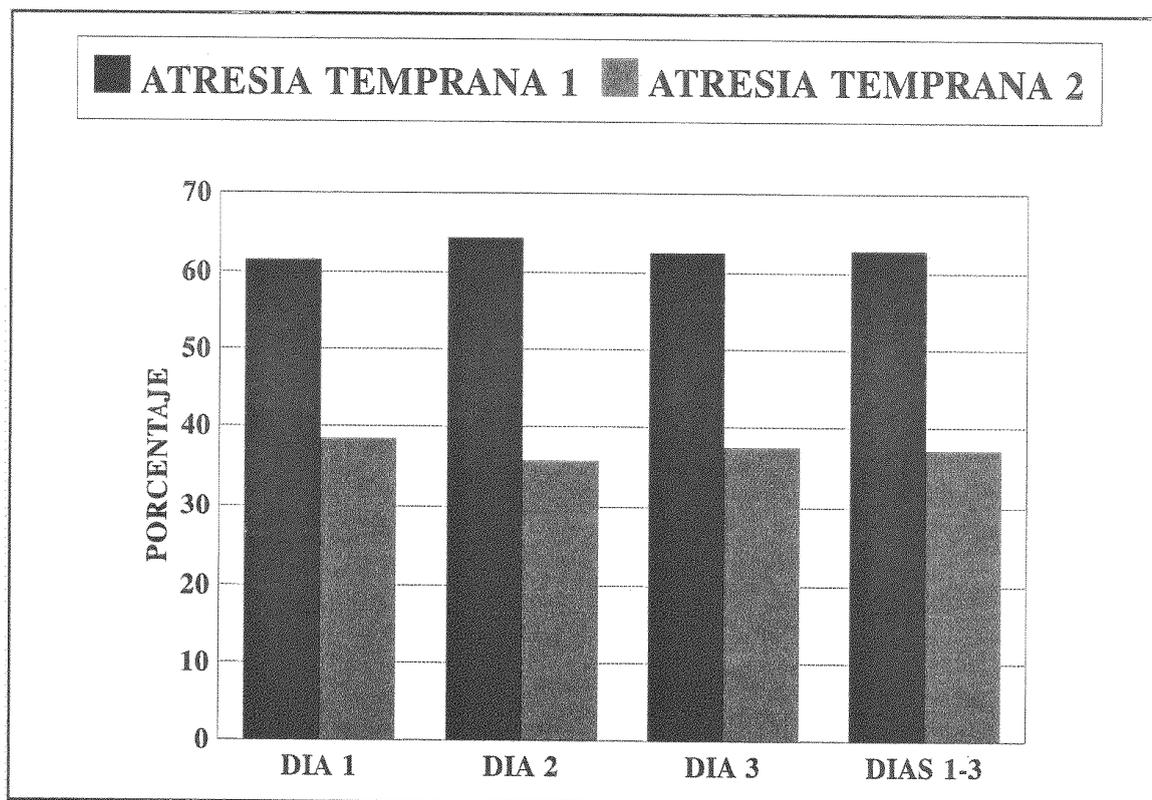


Figura 4. 33. Tipos de atresia temprana a lo largo de la fase folicular

|             | TIPOS DE ATRESIA AVANZADA   |                            |
|-------------|-----------------------------|----------------------------|
|             | ATRESIA AVANZADA 1          | ATRESIA AVANZADA 2         |
| DIA 1       | 90.90% <sup>a</sup><br>(10) | 9.09% <sup>b</sup><br>(1)  |
| DIA 2       | 83.3% <sup>a</sup><br>(5)   | 16.6% <sup>b</sup><br>(1)  |
| DIA 3       | 63.63%<br>(7)               | 36.36%<br>(4)              |
| VALOR MEDIO | 78.57% <sup>a</sup><br>(22) | 21.43% <sup>b</sup><br>(6) |

<sup>ab</sup> Letras distintas dentro de una misma fila representan diferencias significativas ( $p < 0.01$ )  
 Los números entre paréntesis representan el número total de folículos en cada categoría

Tabla 4. 13. Distribución de los tipos de atresia avanzada a lo largo de la fase folicular

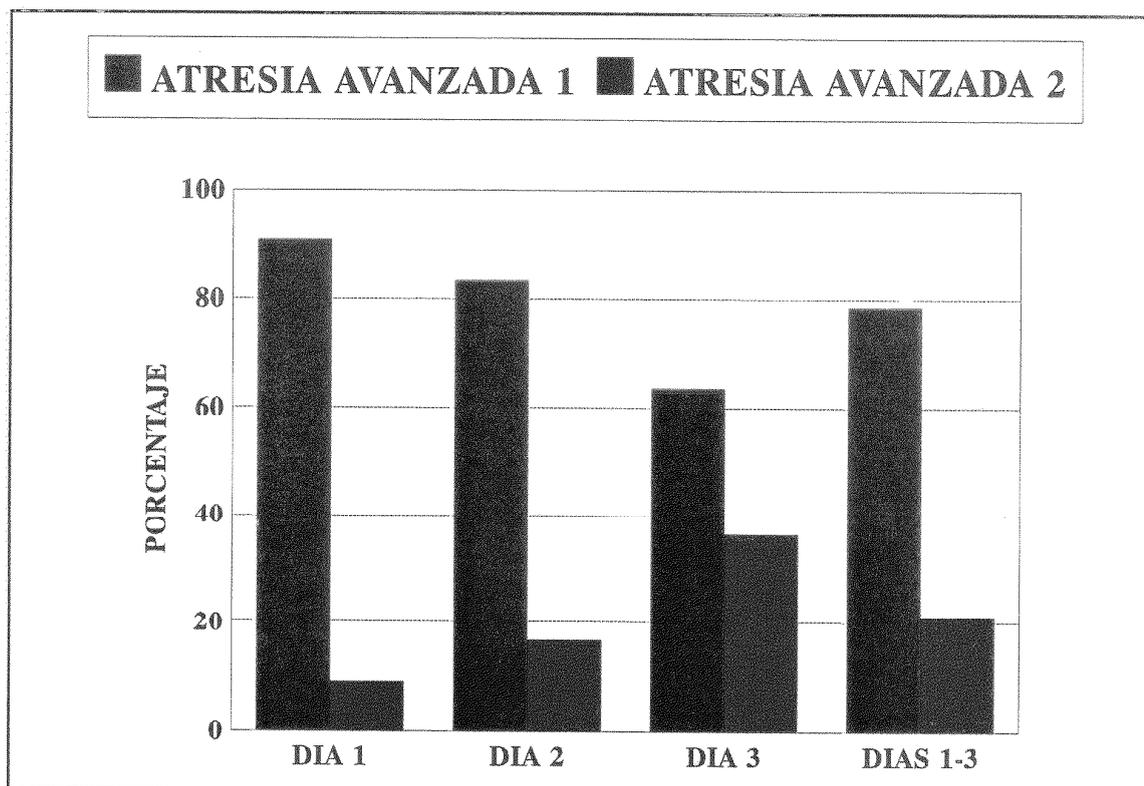


Figura 4. 34. Tipos de atresia avanzada a lo largo de la fase folicular

### **4.2.3. CALIDAD FOLICULAR EN FUNCIÓN DE LA TALLA FOLICULAR**

Si tenemos en cuenta la talla folicular, se observa que el *día 1* de la fase folicular no existen diferencias en el porcentaje de folículos normales y folículos atrésicos, tanto en la categoría de 1-2 mm. de diámetro, como en la categoría de folículos mayores de 4 mm. de diámetro. En la categoría de 2-4 mm. de diámetro existe una neta mayoría de folículos atrésicos frente a los folículos normales (84.21% vs 15.79%; tabla 4.14., figura 4.35.).

El *día 2* de la fase folicular no existen diferencias entre el número de folículos normales y de folículos atrésicos en las categorías de folículos pequeños y de folículos grandes. En la talla de 2-4 mm. de diámetro, la inmensa mayoría de los folículos son atrésicos, siendo el porcentaje de folículos normales muy bajo (84.61% vs 15.38%,  $p < 0.01$ ; tabla 4.15., figura 4.36).

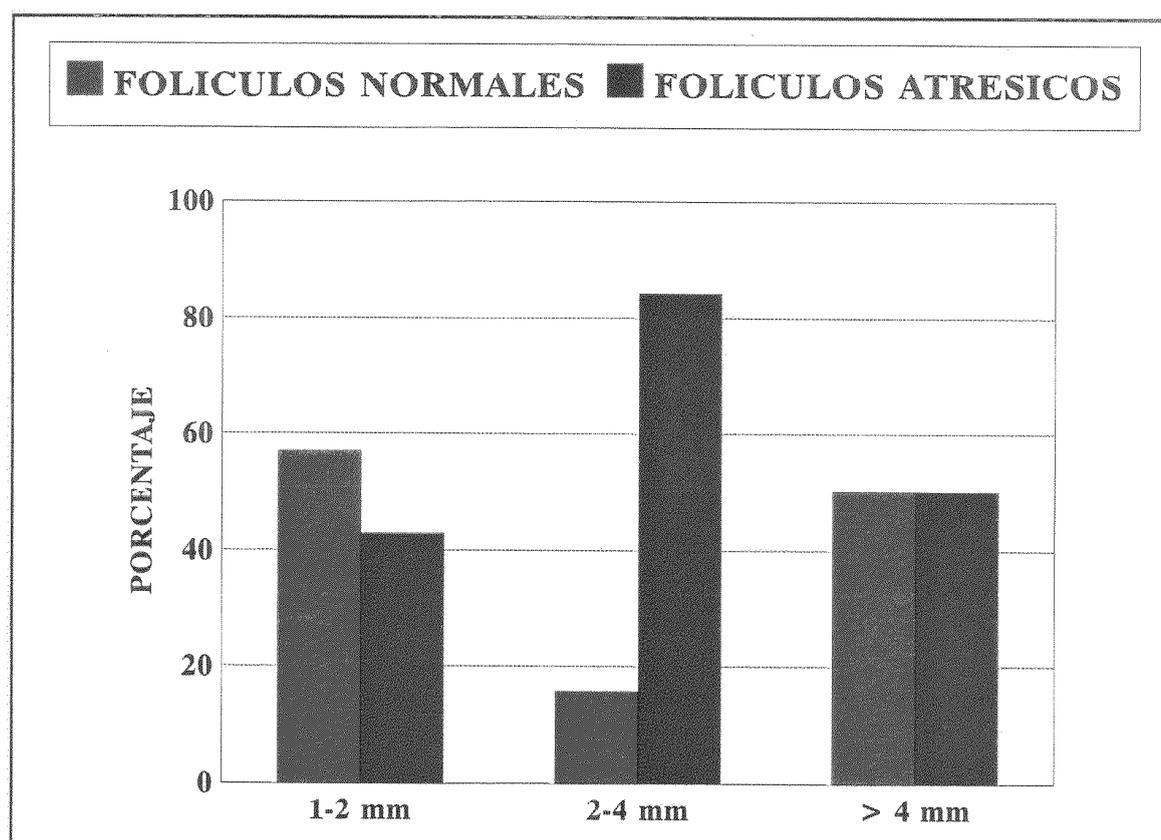
El *día 3* de la fase folicular, se obtiene que en los folículos de 1-2 mm. de diámetro existe una mayoría de folículos normales frente a los folículos atrésicos (90.9% vs 9.10%;  $p < 0.01$ ). En los folículos medianos, existe una neto predominio de atresia frente a la normalidad (83.33% vs 16.66%;  $p < 0.05$ ). Por último, en folículos grandes no existen diferencias entre folículos normales y folículos atrésicos (tabla 4.16, figura 4.37.).

En el *conjunto de los tres días*, en la talla de 1-2 mm. de diámetro se observa que existe un mayor número de folículos normales que de folículos atrésicos (64.8% vs 35.1%;  $p < 0.01$ ). En los folículos medianos existe una gran mayoría de folículos atrésicos sobre los folículos normales (84.0% vs 16.0%;  $p < 0.01$ ). En los folículos mayores de 4 mm. de diámetro, no existen diferencias significativas entre atresia y normalidad (tabla 4.17., figura 4.38.).

| TALLA FOLICULAR | NORMALES                   | ATRESICOS                   |
|-----------------|----------------------------|-----------------------------|
| 1-2 mm          | 57.14%<br>(8)              | 42.85%<br>(6)               |
| 2-4 mm          | 15.78% <sup>a</sup><br>(3) | 84.21% <sup>b</sup><br>(16) |
| > 4 mm          | 50.0%<br>(2)               | 50.0%<br>(2)                |

<sup>ab</sup> Letras distintas dentro de una misma fila representan diferencias significativas ( $p < 0.01$ )  
Los números entre paréntesis representan el número total de folículos en cada categoría

**Tabla 4. 14. Porcentaje de folículos normales y atrésicos en relación con la talla folicular. Día 1 de la fase folicular**



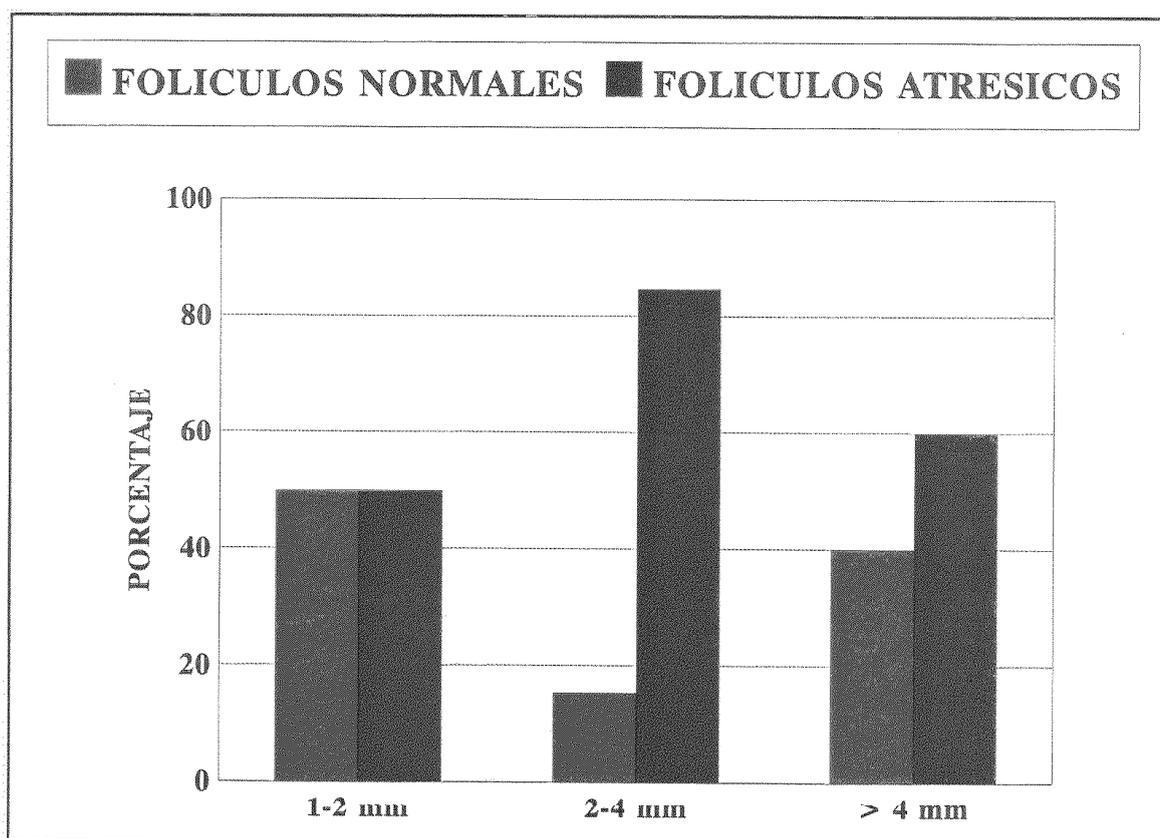
**Figura 4. 35. Porcentaje de normalidad y atresia en función de la talla folicular. Día 1 de la fase folicular**

| TALLA FOLICULAR | NORMALES                   | ATRESICOS                   |
|-----------------|----------------------------|-----------------------------|
| 1-2 mm          | 50.0%<br>(6)               | 50.0%<br>(6)                |
| 2-4 mm          | 15.38% <sup>a</sup><br>(2) | 84.61% <sup>b</sup><br>(11) |
| > 4 mm          | 40.0%<br>(2)               | 60.0%<br>(3)                |

<sup>ab</sup> Letras distintas dentro de una misma fila representan diferencias significativas ( $p < 0.01$ )

Los números entre paréntesis representan el número total de folículos en cada categoría

**Tabla 4. 15. Porcentaje de folículos normales y atrésicos en relación con la talla folicular. Día 2 de la fase folicular**



**Figura 4. 36. Porcentaje de normalidad y atresia en función de la talla folicular. Día 2 de la fase folicular**

| TALLA FOLICULAR | NORMALES                    | ATRESICOS                   |
|-----------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 1-2 mm          | 90.90% <sup>a</sup><br>(10) | 9.09% <sup>b</sup><br>(1)   |
| 2-4 mm          | 16.66% <sup>a</sup><br>(3)  | 83.33% <sup>b</sup><br>(15) |
| > 4 mm          | 50.0%<br>(3)                | 50.0%<br>(3)                |

<sup>ab</sup> Letras distintas dentro de una misma fila representan diferencias significativas ( $p < 0.01$ )  
 Los números entre paréntesis representan el número total de folículos en cada categoría

Tabla 4. 16. Porcentaje de folículos normales y atrésicos en relación con la talla folicular. Día 3 de la fase folicular

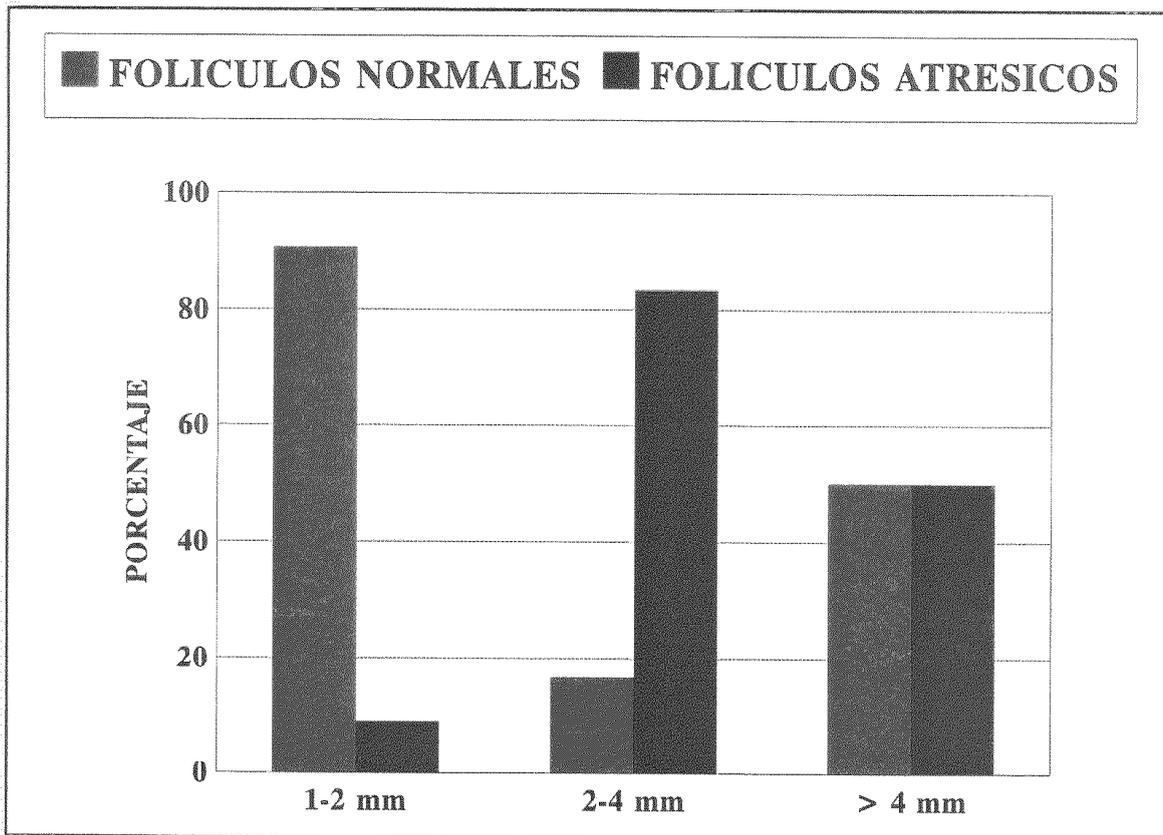


Figura 4. 37. Porcentaje de folículos normales y atrésicos en función de la talla folicular. Día 3 de la fase folicular

| TALLA FOLICULAR | NORMALES                   | ATRESICOS                   |
|-----------------|----------------------------|-----------------------------|
| 1-2 mm          | 64.8% <sup>a</sup><br>(24) | 35.1% <sup>b</sup><br>(13)  |
| 2-4 mm          | 16.00% <sup>a</sup><br>(8) | 84.00% <sup>b</sup><br>(42) |
| > 4 mm          | 46.6%<br>(7)               | 53.3%<br>(8)                |

<sup>ab</sup> Letras distintas dentro de una misma fila representan diferencias significativas ( $p < 0.01$ )  
Los números entre paréntesis representan el número total de folículos en cada categoría

Tabla 4. 17. Porcentaje de folículos normales y atrésicos en cada talla folicular en el conjunto de la fase folicular

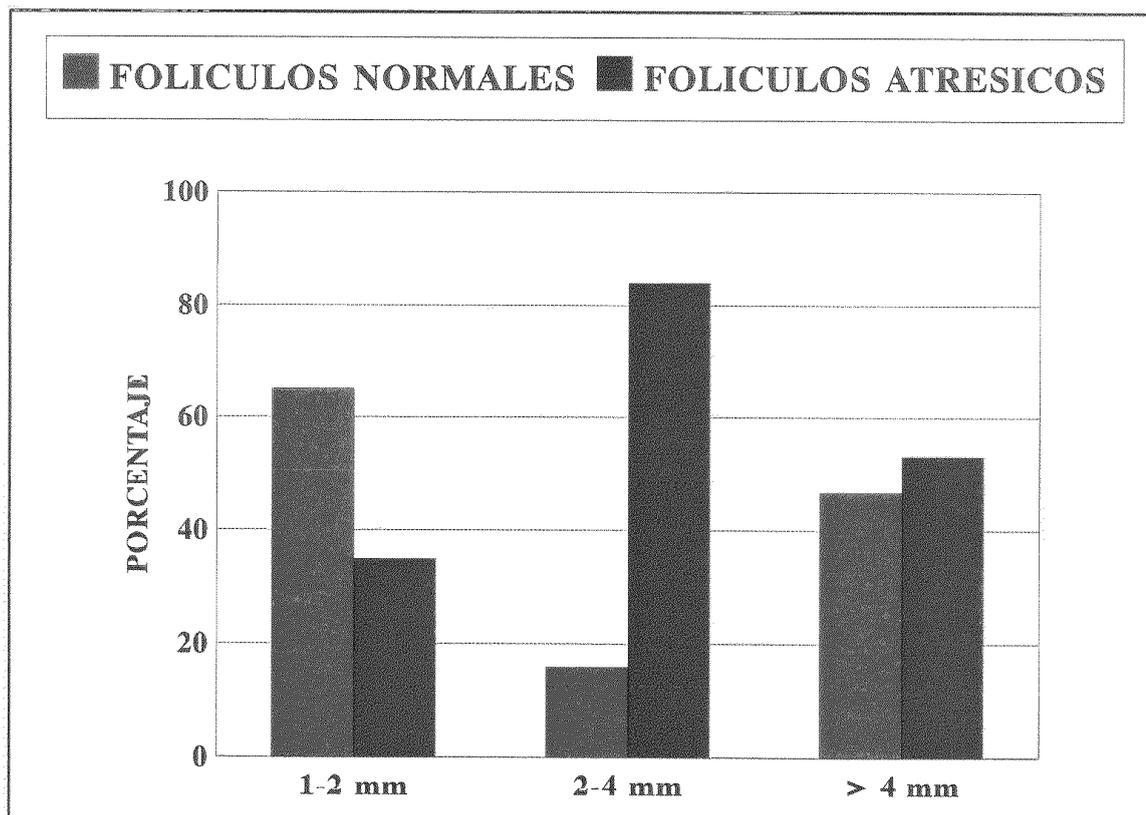


Figura 4. 38. Porcentaje de folículos normales y atrésicos en cada talla folicular en el conjunto de la fase folicular

Al *comparar* el porcentaje de folículos normales en la talla de 1-2 mm. de diámetro, se obtiene que entre los días 1 y 2 de la fase folicular no existen diferencias significativas (57.1% vs 50.0%). El día 3 existe un mayor número de folículos normales que en los días 1 y 2; esta diferencia es significativa con respecto al día 2 (90.9% vs 50.0%;  $p < 0.05$ ) y tendente a la significación con respecto al día 1 (90.9% vs 57.1%;  $p < 0.1$ , **tabla 4.18.**, **figura 4.39.**).

En las tallas de 2-4 y mayores de 4 mm. de diámetro, no se obtienen diferencias entre el número de folículos atrésicos y de folículos normales a lo largo de los tres días de la fase folicular, siendo los porcentajes de atresia y normalidad, prácticamente similares (**tablas 4.19. y 4.20.**, **figuras 4.40. y 4.41.**).

Dentro de las categorías de atresia se comprueba que en folículos pequeños predomina la atresia temprana sobre la avanzada (76.9% vs 23.1%;  $p < 0.05$ ; **tabla 4.21.**, **figura 4.42.**), mientras que en los folículos grandes ocurre lo contrario y existe una mayoría de folículos en atresia avanzada sobre folículos en atresia temprana, aunque no llega a la significación (75% vs 25%;  $p < 0.15$ , **tabla 4.21.**, **figura 4.42.**). En el tamaño de 2-4 mm. de diámetro, no existen diferencias entre atresia temprana y atresia avanzada (**tabla 4.21.**, **figura 4.42.**).

|       | NORMALES                    | ATRESICOS                   |
|-------|-----------------------------|-----------------------------|
| DIA 1 | 57.14% <sup>ab</sup><br>(8) | 42.85% <sup>ab</sup><br>(6) |
| DIA 2 | 50.00% <sup>a</sup><br>(6)  | 50.00% <sup>a</sup><br>(6)  |
| DIA 3 | 90.9% <sup>b</sup><br>(10)  | 9.09% <sup>b</sup><br>(1)   |

<sup>ab</sup> Letras distintas dentro de una misma columna representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )  
Los números entre paréntesis representan el número total de folículos en cada categoría

Tabla 4. 18. Porcentaje de folículos normales y atrésicos en folículos pequeños (1-2 mm. de diámetro) a lo largo de la fase folicular

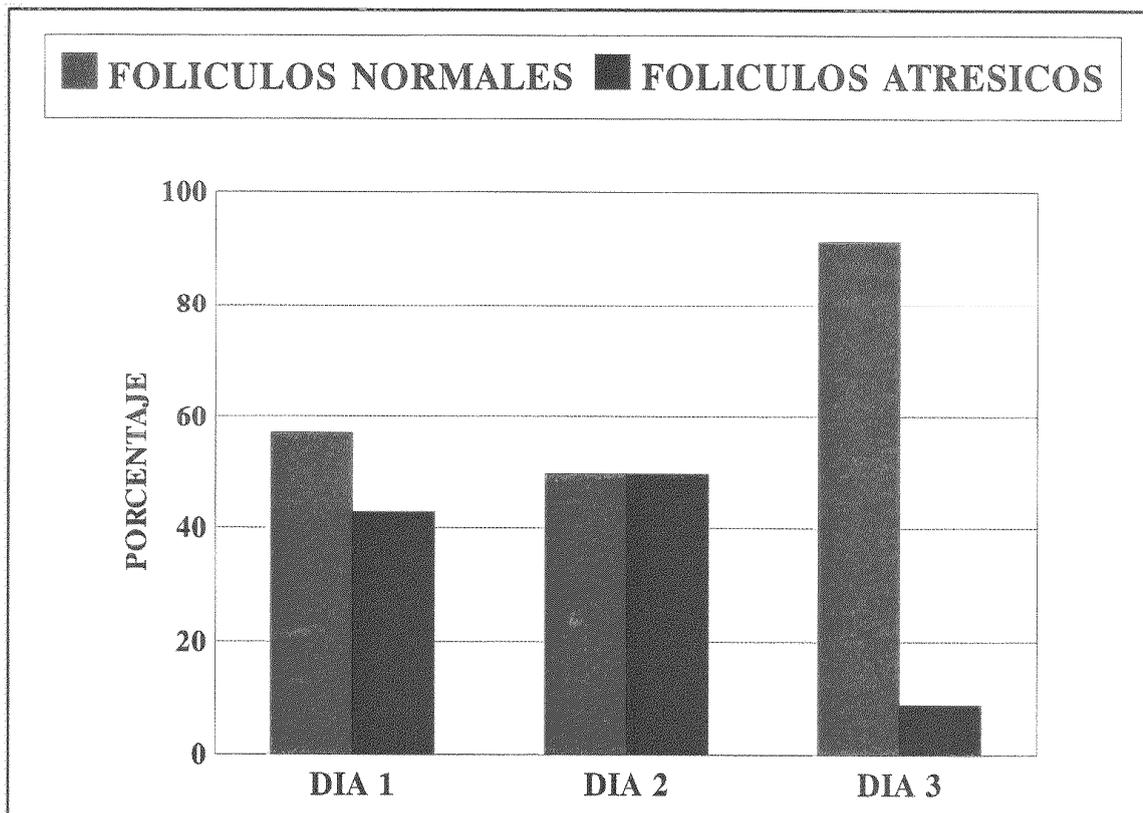


Figura 4. 39. Porcentaje de normalidad y atresia en folículos pequeños a lo largo de la fase folicular

|       | NORMALES      | ATRESICOS      |
|-------|---------------|----------------|
| DIA 1 | 15.78%<br>(3) | 84.21%<br>(16) |
| DIA 2 | 15.38%<br>(2) | 84.61%<br>(11) |
| DIA 3 | 16.6%<br>(3)  | 83.3%<br>(15)  |

Los números entre paréntesis representan el número total de folículos en cada categoría

Tabla 4. 19. Porcentaje de folículos normales y atrésicos en folículos medianos (2-4 mm. de diámetro) a lo largo de la fase folicular

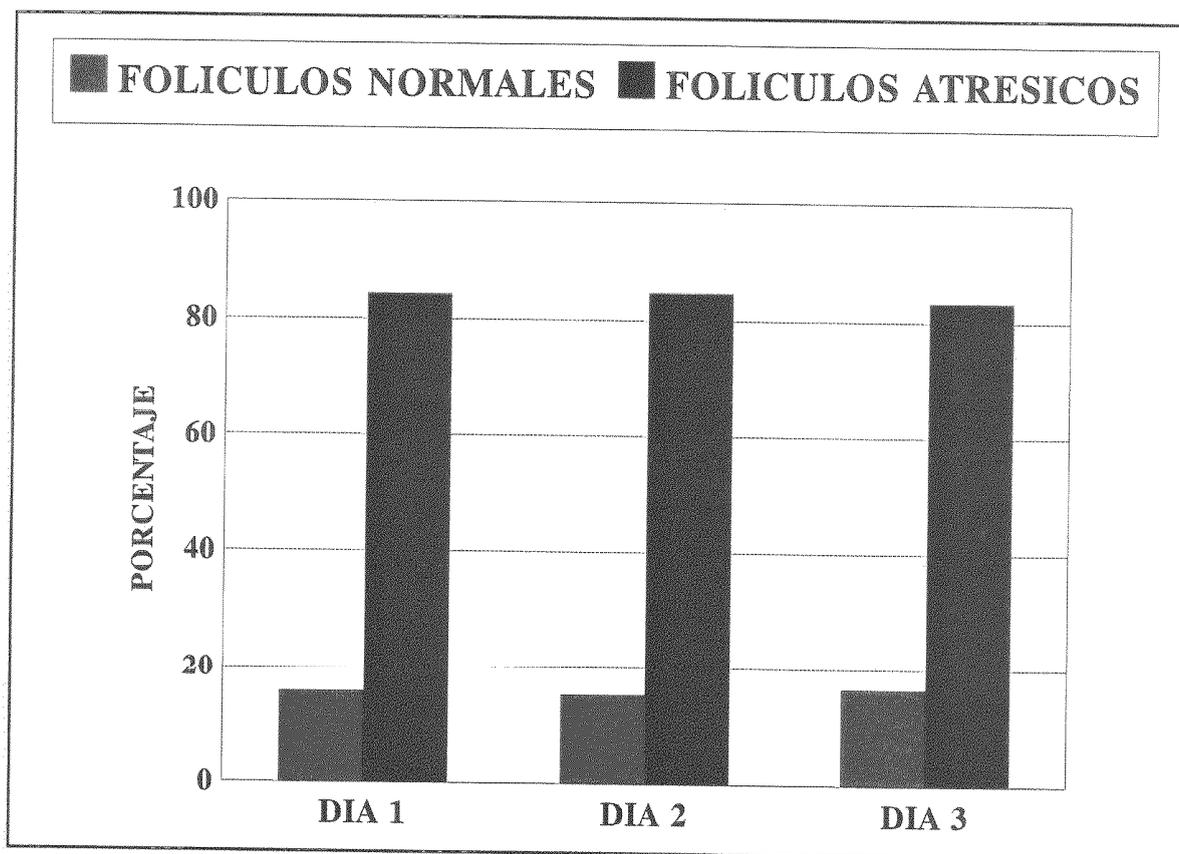


Figura 4. 40. Porcentaje de normalidad y atresia en folículos medianos a lo largo de la fase folicular

|       | NORMALES     | ATRESICOS    |
|-------|--------------|--------------|
| DIA 1 | 50.0%<br>(2) | 50.0%<br>(2) |
| DIA 2 | 40.0%<br>(2) | 60.0%<br>(3) |
| DIA 3 | 50.0%<br>(3) | 50.0%<br>(3) |

Los números entre paréntesis representan el número total de folículos en cada categoría

Tabla 4. 20. Porcentaje de folículos normales y atrésicos en folículos grandes (> 4 mm. de diámetro) a lo largo de la fase folicular

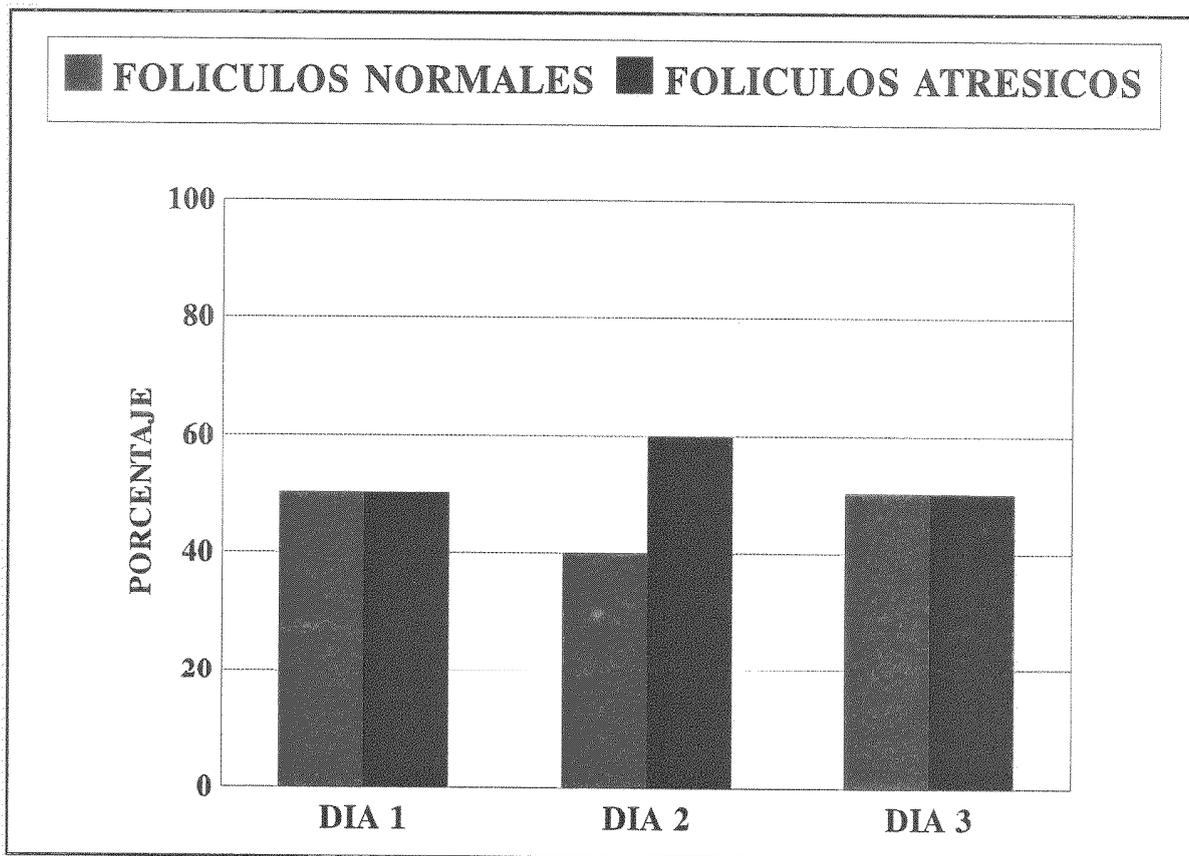


Figura 4. 41. Porcentaje de normalidad y atresia en folículos grandes a lo largo de la fase folicular

| TALLA FOLICULAR | TIPOS DE ATRESIA            |                            |
|-----------------|-----------------------------|----------------------------|
|                 | ATRESIA TEMPRANA            | ATRESIA AVANZADA           |
| 1-2 mm          | 76.92% <sup>a</sup><br>(10) | 23.07% <sup>b</sup><br>(3) |
| 2-4 mm          | 54.76%<br>(23)              | 45.24%<br>(19)             |
| > 4 mm          | 25.0%<br>(2)                | 75.0%<br>(6)               |

<sup>ab</sup> Letras distintas dentro de una misma fila representan diferencias significativas ( $p < 0.01$ )  
Los números entre paréntesis representan el número total de folículos en cada categoría

Tabla 4. 21. Porcentaje de los grados de atresia en función de la talla folicular a lo largo de la fase folicular

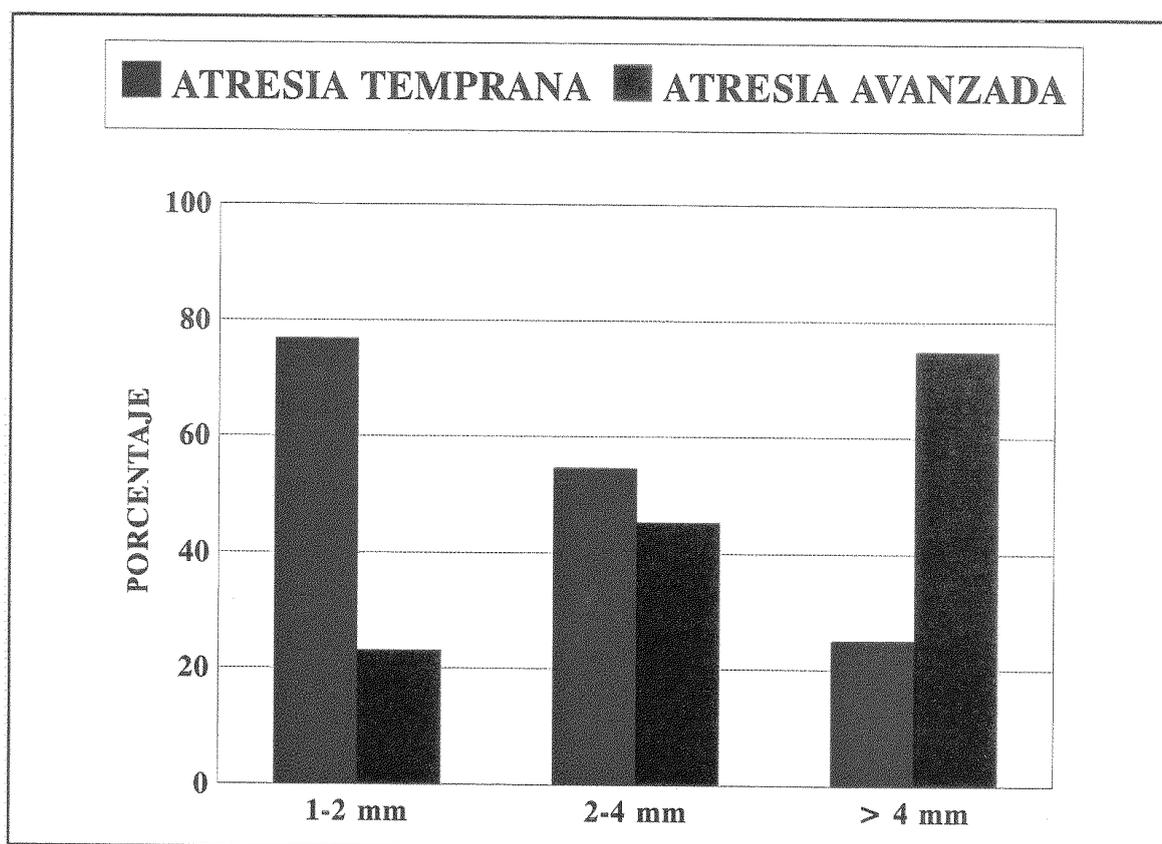


Figura 4. 42. Porcentaje de los grados de atresia en función de la talla folicular a lo largo de la fase folicular

### 4.3. CULTIVOS CELULARES

#### 4.3.1. PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS DE GRANULOSA

El número total de ovarios empleados en esta experiencia fueron 14, procedentes de un total de 7 animales. El número medio de folículos íntegros obtenidos por ovario fue de 6.85, 3.28 y 0.85 para folículos pequeños (1-2 mm. de diámetro), medianos (2-4 mm.) y grandes (> 4 mm.), respectivamente.

El número de células obtenidas en los folículos pequeños era alrededor de 147000 células/folículo, con un índice de viabilidad del 23.81%, obteniendo una media de 35000 células vivas/folículo. La concentración inicial de siembra era de  $360000 \pm 27000$  (media  $\pm$  error estándar) células de granulosa/ml.

El número de células obtenidas de los folículos medianos era alrededor de 181000 células/folículo, con un índice de viabilidad del 20.5%, obteniendo una media de 37000 células vivas/folículo. La concentración inicial de siembra era de  $360000 \pm 24000$  (media  $\pm$  error estándar) células de granulosa/ml.

El número de células obtenidas de los folículos grandes era alrededor de 420000 células/folículo, con un índice de viabilidad del 21.1%, obteniendo una media de 88000 células vivas/folículo. La concentración inicial de siembra era de  $360000 \pm 28000$  (media  $\pm$  error estándar) células de granulosa por pocillo.

En los folículos pequeños obtenemos que con respecto a la concentración inicial, después de 72 horas de cultivo existe un mayor y significativo número de células de

granulosa tanto en el tratamiento bajo como en el tratamiento medio ( $p < 0.05$  y  $p < 0.01$ , respectivamente; tabla 4.22.).

La proliferación de las células de granulosa sometidas al tratamiento alto es inferior tanto al tratamiento bajo (tendente a la significación,  $p < 0.06$ ), como al tratamiento medio (diferencia significativa,  $p < 0.01$ ; tabla 4.22.).

Dentro de los folículos medianos se observa que no existen diferencias significativas entre el número de células de granulosa presentes a las 72 horas de cultivo independientemente del tipo de tratamiento empleado, así como tampoco existen diferencias con respecto a la concentración inicial (tabla 4.22.).

Dentro de los folículos grandes se observa que no existen diferencias significativas entre el número de células de granulosa presentes a las 72 horas de cultivo independientemente del tipo de tratamiento empleado, así como tampoco existen diferencias con respecto a la concentración inicial (tabla 4.22.).

| TALLA FOLICULAR | CONCENTRACIÓN INICIAL (Nº células/ml) | TIPO DE TRATAMIENTO EMPLEADO (insulina) |                         |                        |                       |
|-----------------|---------------------------------------|---|-------------------------|------------------------|-----------------------|
|                 |                                       | CONTROL (0)                             | BAJO (0.05 UI/ml)       | MEDIO (0.5 UI/ml)      | ALTO (1.0 UI/ml)      |
| 1-2 mm          | 360000 <sup>1</sup>                   | 581000 <sup>1,2,3</sup>                 | 616000 <sup>2,3a*</sup> | 693000 <sup>2a**</sup> | 437000 <sup>1,3</sup> |
| 2-4 mm          | 360000                                | 427000                                  | 813000 <sup>**</sup>    | 627000 <sup>**</sup>   | 808000                |
| > 4 mm          | 360000                                | 320000                                  | 320000 <sup>b</sup>     | 307000 <sup>b</sup>    | 461000                |

<sup>1,2,3</sup> Números diferentes dentro de una misma fila representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

<sup>a,b</sup> Letras distintas dentro de una misma columna representan diferencias significativas (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ).

Tabla 4. 22. Proliferación de las células de granulosa (número de células/ml) a las 72 horas de cultivo en función del tipo de tratamiento y la talla folicular

Comparando las **tallas foliculares** entre sí se obtiene que al valorar folículos pequeños y medianos, los folículos medianos presentan una mayor proliferación celular (no significativa) a las 72 horas de cultivo en los tratamientos bajo y alto que los folículos pequeños (tabla 4.22.).

Al comparar folículos pequeños y grandes, la población celular obtenida a las 72 horas es mayor en los cultivos realizados con células procedentes de folículos pequeños para los tratamientos bajo y medio ( $p < 0.05$  y  $p < 0.01$ , respectivamente; tabla 4.22.).

Por último, al comparar folículos medianos y grandes se obtiene que la población folicular alcanzada a las 72 horas es mayor en los cultivos de células de granulosa procedentes de folículos medianos, en los tratamientos bajo y medio (tabla 4.22.).

Si unimos los folículos pequeños y medianos (1-4 mm.) y lo comparamos con los folículos grandes (> 4 mm.) se observa que en todos los tratamientos existe una mayor capacidad proliferativa en las células procedentes de folículos entre 1 y 4 mm. de diámetro; sin embargo, sólo en el tratamiento medio esta diferencia es significativa ( $p < 0.01$ ; tabla 4.23.).

| TALLA FOLICULAR | TIPO DE TRATAMIENTO EMPLEADO |                  |                     |                  |
|-----------------|------------------------------|------------------|---------------------|------------------|
|                 | CONTROL                      | TRATAMIENTO BAJO | TRATAMIENTO MEDIO   | TRATAMIENTO ALTO |
| 1-4 mm          | 504000                       | 714500           | 660000 <sup>a</sup> | 672500           |
| > 4 mm          | 320000                       | 320000           | 307000 <sup>b</sup> | 461000           |

<sup>a,b</sup> Letras distintas dentro de una misma columna representan diferencias significativas ( $p < 0.01$ )

**Tabla 4.23. Proliferación celular (número de células/ml) a las 72 horas de cultivo según el tratamiento y en tallas de 1-4 mm. y > 4 mm. de diámetro**

**4.3.2. CAPACIDAD ESTEROIDOGÉNICA DE LAS CÉLULAS DE GRANULOSA**

A las 24 horas de cultivo, las células de granulosa procedentes de folículos de 1-2 mm. de diámetro producían cantidades muy pequeñas de progesterona. El nivel medio de progesterona producido fue de  $0.114 \pm 0.036$  ng/ml (0.065-0.185; tabla 4.24.).

Las células de granulosa procedentes de folículos de 2-4 mm. y mayores de 4 mm. de diámetro producen cantidades apreciables de progesterona a las 24 horas de cultivo, con una producción media de  $0.307 \pm 0.195$  ng/ml (0.085-0.696) y  $0.233 \pm 0.100$  ng/ml (0.104-0.430) respectivamente (tabla 4.24.).

Al comparar la producción de progesterona entre las distintas tallas foliculares se observa que a las 24 horas de cultivo, tanto los folículos medianos como los folículos grandes producían mayor cantidad de progesterona que los folículos pequeños ( $p < 0.01$  y  $p < 0.05$  para folículos medianos y grandes respectivamente). No existían diferencias significativas en la producción de progesterona a las 24 horas de cultivo entre las células de granulosa procedentes de folículos medianos y de folículos grandes (tabla 4.24.).

| TALLA FOLICULAR    | NIVELES DE PROGESTERONA (ng/ml) |
|--------------------|---------------------------------|
| FOLÍCULOS PEQUEÑOS | $0.114 \pm 0.036^a$             |
| FOLÍCULOS MEDIANOS | $0.307 \pm 0.195^{b*}$          |
| FOLÍCULOS GRANDES  | $0.233 \pm 0.100^{b**}$         |

<sup>a,b</sup> Letras distintas dentro de una misma columna representan diferencias significativas (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ).

**Tabla 4. 24. Concentración de progesterona en el medio de cultivo (ng/ml) a las 24 horas de cultivo en las distintas tallas foliculares**

## **5. DISCUSIÓN**

## 5.1. CARACTERIZACIÓN DEL CICLO

### 5.1.1. ESTRO

#### 5.1.1.1. Comportamiento estral

De manera similar a otros autores (Adams *et al.*, 1988; Bland and Jubilan, 1987; Baril *et al.*, 1993), el comportamiento estral queda perfectamente definido como la inmovilidad al salto, no teniendo en cuenta ninguno de los restantes síntomas de celo para determinar su duración.

Durante el período previo a la instauración del celo, la oveja canaria muestra una ausencia total de inmovilidad al cortejo, y sólo en 1 de 13 observaciones mostraba síntomas de búsqueda y coleteo. Esta observación se correspondía con una oveja que 6 horas después ya había entrado en celo. Tras el período de celo, los niveles de búsqueda, inmovilidad al cortejo y coleteo son muy bajos, y su duración no se prolonga por encima de las 6 horas tras el final del celo, pudiéndose considerar, por tanto, como síntomas residuales. Bland and Jubilan (1987) obtienen ausencia total de coleteo, búsqueda e inmovilidad al cortejo en el período previo al celo, y estos síntomas tienden desaparecer casi al mismo tiempo que finaliza la receptividad sexual (tabla 4.1.).

Durante el celo y en especial durante sus primeras 24 horas, los síntomas de inmovilidad al cortejo, búsqueda y coleteo alcanzan sus valores más altos en la oveja canaria. La atracción y la inmovilidad al cortejo aparecen en todos los celos, mientras el coleteo aparece en algún momento en 12 de los 13 celos controlados, si bien aparece y desaparece a lo largo del mismo (Bland and Jubilan, 1987; Baril *et al.*, 1993), siendo un síntoma muy indicativo, pero no específico de la presencia del celo (tabla 4.1.).

La micción y los balidos en respuesta a la presencia del macho presentan unos valores altos antes y después del celo, si bien los balidos tendían a ser más irregulares. El macho tras el olfateo de la orina realizaba el *flehmen* y por lo general, el interés del macho se atenuaba en este período de ausencia de receptividad sexual (tabla 4.2.). Durante el período del celo, el porcentaje de ovejas que realizan micción al entrar en contacto con el macho era menor y un hecho similar ocurría con los balidos. Asimismo, durante el período del celo disminuía el porcentaje de *flehmen* del macho en respuesta al olfateo de la orina (tabla 4.1.). Bland and Jubilan (1987) obtienen que en el período de ausencia de receptividad sexual, el porcentaje de ovejas que miccionaban en respuesta a la presencia del macho era superior que cuando las ovejas se encontraban en celo, y que el porcentaje de *flehmen* del macho en respuesta al olfateo a la orina era mayor en ausencia de receptividad sexual.

Por tanto, la micción de la oveja en presencia del macho puede tratarse de un medio para comunicar un estado fisiológico; durante la ausencia del celo, la micción (Bland and Jubilan, 1987; Blissit *et al.*, 1994) y/o la postura de micción (Bland and Jubilan, 1987), junto con la falta de inmovilidad (Bland and Jubilan, 1987; Adams *et al.*, 1988; Baril *et al.*, 1993), le indican al macho la ausencia del celo y el macho mediante el *flehmen* confirma el estado reproductivo de la hembra. Durante el período del celo, las ovejas no hace falta que miccionen tan frecuentemente para indicar su estado reproductivo al macho; su inmovilidad es un signo definitorio.

Por otro lado, la micción de las ovejas al entrar en contacto con el macho durante el período de ausencia del celo, puede ser motivado por una actitud de aprensión o intimidación que le provoca el contacto con el macho. Durante el período de receptividad sexual, la atracción de la oveja por el macho puede subyugar ese temor y provocar una disminución del número de micciones. Este hecho puede guardar relación con el mayor número de balidos que las ovejas emiten en ausencia del celo, ante la presencia del macho.

### 5.1.1.2. Intervalos

#### 5.1.1.2.1. Intervalo retirada de las esponjas-inicio del celo

El modelo de sincronización utilizando esponjas intravaginales de FGA durante 14 días y a su retirada la aplicación de un análogo de prostaglandina, se traduce en la aparición del comportamiento estral a las  $40.85 \pm 4.84$  horas (tabla 4.3.) en la oveja canaria.

La utilización exclusiva de esponjas intravaginales o de prostaglandinas en época reproductiva y en ovejas de tasa de ovulación similar a la canaria, se traduce en la aparición del celo en un tiempo similar al obtenido en la oveja canaria. Oyedipe *et al.* (1989) trabajando con ovejas Yankasa obtiene que el celo aparece a las  $44.5 \pm 4.5$  horas tras la retirada de las esponjas. Schackell (1991) obtiene una aparición del celo a las 40.4 horas después de la retirada de las esponjas (FGA) en ovejas Coopworth, con un 80% de ovejas mostrando celo a las 40 horas tras la retirada de las esponjas. Por otro lado, la aplicación de prostaglandinas (sin la utilización previa de esponjas) en fase luteal provoca la aparición del celo a las  $44.0 \pm 1.8$  y  $43.5 \pm 1.8$  para ovejas Ile de France y Preálpes respectivamente (Bindon *et al.*, 1979); en ovejas Corriedale tras la aplicación de la prostaglandina, el celo acontece a las 54 horas aproximadamente (Driancourt and Cahill, 1984).

En aquellos tratamientos de sincronización que incorporan PMSG, el intervalo entre la retirada de las esponjas y el inicio del celo se acorta. Así la aplicación de PMSG en el momento de la retirada de las esponjas, provoca la aparición del celo a las  $27.0 \pm 1.6$  horas en las ovejas Galway (Quirke *et al.*, 1981) y entre 27-37 horas en las ovejas Yankasa (Oyedipe *et al.*, 1989), debido a que la PMSG incrementa y acelera la maduración folicular.

Por lo tanto, el modelo de sincronización empleado en la raza canaria se encuadra

dentro de los límites habituales con respecto a la aparición del celo.

#### 5.1.1.2.2. Duración del celo

La oveja canaria no presenta diferencias apreciables en la longitud total del celo natural y del celo sincronizado. Loftsson and Dyrmyndseinn (1990) y Kasemm *et al.* (1990) tampoco encuentran diferencias significativas entre la duración del celo natural y del celo sincronizado, después de someter a la oveja a un tratamiento de sincronización previo, mediante el uso de esponjas intravaginales.

La duración del celo en la oveja canaria ( $42.46 \pm 2.91$  horas, **tabla 4.3.**) es ligeramente superior a los niveles obtenidos para otras razas de similar tasa de ovulación. Las ovejas Galway presentan una duración del celo de  $34.0 \pm 3.2$  horas y una tasa de ovulación de 1.7, tras un tratamiento sincronizador con esponjas intravaginales de FGA durante 14 días (Adams *et al.*, 1988). Asimismo, las ovejas Preálpes con una tasa de ovulación de 1.7, presentan una longitud de celo de  $39.0 \pm 2.9$  horas tras un tratamiento de sincronización con PGF-2 $\alpha$  (Bindon *et al.*, 1979). Por último, la raza Dorset con una tasa de ovulación de 1.54 presenta una duración del celo casi similar a la oveja canaria, con una duración de 40-41 horas (Quirke *et al.*, 1988).

En ovejas con tasa de ovulación elevada, la duración del celo es superior al de la raza canaria, situándose sobre las 46 horas en la raza Finnish Landrace (Adams *et al.*, 1988) y 53 horas en la Romanov (Bindon *et al.*, 1979).

En tratamientos donde se aplica la PMSG, la duración del celo es variable en función de la dosis de PMSG utilizada. En ovejas Yankasa, con dosis de 250 y 750 UI de PMSG la duración del celo es de 61.3 y 50 horas respectivamente; esta elevada duración del

comportamiento estral se explica por el incremento de las concentraciones plasmáticas de estradiol que la aplicación de la PMSG genera (Oyedipe *et al.*, 1989). Sin embargo, en ovejas Galway la aplicación de PMSG (500 UI) provoca una duración del celo de  $27.0 \pm 1.6$  horas (Quirke *et al.*, 1981). Esta amplitud de valores parecen explicarse por la alta variabilidad de respuesta frente a la PMSG.

### 5.1.1.2.3. Intervalo retirada de esponjas-ovulación

El intervalo entre la retirada de las esponjas y el momento de la ovulación presenta un valor alargado, por encima de las 80 horas de duración (tabla 4.3.). Si tenemos en cuenta que el pico de LH se presenta por encima de las 60 horas desde la retirada de las esponjas, parece normal que la ovulación se presente alrededor de 20 horas después. En ovejas Coopworth, la ovulación aparece a las 71.2 horas tras la retirada de las esponjas, habiéndose situado el pico de LH alrededor de las 48 horas (Schackell, 1991).

### 5.1.1.2.4. Intervalo inicio del celo-ovulación

El intervalo entre el inicio del celo y el momento de ovulación, no difiere de manera significativa entre el celo sincronizado y el celo natural en la oveja canaria, situándose como media alrededor de las 41 horas de duración (tabla 4.3.). Schackell (1991) trabajando con ovejas Coopworth obtiene que tras un tratamiento de sincronización con esponjas intravaginales (FGA), este intervalo se situaba alrededor de las 31 horas de duración. La mayor amplitud de este intervalo en la oveja canaria puede tratarse de un reflejo de la mayor duración del celo y guarda relación con el pico de LH que se sitúa alrededor de 20-25 horas respecto al inicio del celo. Del mismo modo, la ovulación en la oveja canaria es coincidente con el final del celo, situación que acontece de manera similar en otras razas ovinas (Adams *et al.*, 1988; Schackell, 1991).

### 5.1.2. TASA DE OVULACIÓN

La tasa de ovulación de la oveja canaria (1.53, **tabla 4.3.**) permite integrar esta raza dentro del grupo de razas con una tasa de ovulación ligeramente baja. La tasa de ovulación de la oveja canaria es superior a ovejas de tipo Yankasa (1.0; Oyedipe *et al.*, 1989) o Awassi (1.2; Kassem *et al.*, 1990), mientras que es prácticamente similar a las ovejas Ile-de-France (1.63; Bindon *et al.*, 1979; 1.5, Cahill *et al.*, 1981) o a las ovejas Galway (1.7, Adams *et al.*, 1988), y es netamente inferior a las razas de elevada prolificidad tipo Romanov (2.7; Bindon *et al.*, 1979; 3.2, Cahill *et al.*, 1981) o Finnish Landrace (3.6, Adams *et al.*, 1988). La raza canaria, en función de su tasa de ovulación presenta características intermedias entre razas de baja tasa de ovulación y razas con una tasa de ovulación superior.

### 5.1.3. LONGITUD DEL CICLO ESTRAL

Los métodos para determinar la longitud del ciclo estral en la raza canaria (intervalo entre celos, intervalo entre ovulaciones) se muestran complementarios, puesto que los valores obtenidos son prácticamente similares (18.9 vs 19.1, respectivamente; **tabla 4.3.**), con un índice de correlación elevado ( $r > 0.8$ ). La longitud del ciclo estral en la oveja canaria puede considerarse prolongado en comparación tanto con razas poco prolíficas, Yankasa (16.5 días, Oyedipe *et al.*, 1989), Awassi (17.4 días, Kassem *et al.*, 1990), Dorset (17.0 días, Quirke *et al.*, 1988); como con razas de una tasa de ovulación superior, Finnish Landrace (17.2, Quirke *et al.*, 1988).

Sin embargo, en razas nativas de la India nos encontramos con ciclos estrales de duración elevada. En la raza Bannur, la duración del ciclo se sitúa en 19.4 días (Narajariaswamy and Balaine, 1976); en la raza nativa Muzaffarnagri, la duración del ciclo estral presenta un valor de 19.3 días (Rawal *et al.*, 1988). Por otro lado, en la raza West African

Dwarf, la duración del ciclo se encuentra cercana a los 18.5 días (Boly *et al.*, 1992). Las razas ovinas tropicales tienen una duración media del ciclo de hasta 18.6 días (Carles and Kipnegno, 1986; Farid and Macharechian, 1987).

Probablemente, la elevada duración del ciclo estral en la oveja canaria, sea debido a la mayor duración de la fase luteal. Aquellas razas con ciclos estrales por encima de los 18 días, presentan una mayor duración tanto de la fase luteal como de la fase folicular (Carles Kipnegno, 1986; Boly *et al.*, 1992)

### **5.1.4. LH**

#### **5.1.4.1. Intervalo retirada de las esponjas-pico de LH**

El intervalo entre la retirada de las esponjas y el pico de LH en la oveja canaria ( $63.42 \pm 10.34$ , tabla 4.3.) es ligeramente superior a los valores para otras razas de similar tasa de ovulación. De cualquier forma encontramos una amplia variación en la longitud de este parámetro: en ovejas Coopworth obtenemos una duración media de 48 horas para este intervalo (Schackell, 1991), mientras que en ovejas Ile de France y Preálpes obtenemos unos valores de 51.0 y 57.0 respectivamente (Bindon *et al.*, 1979). En la raza Galway se encuentra por encima de las 50-55 horas (Adams *et al.*, 1988), y en esta misma raza si se aplica un tratamiento con PMSG se acorta enormemente este intervalo, hasta situarse por debajo de las 40 horas. Por último, en la raza Corriedale tras la aplicación de prostaglandina, el intervalo hasta la aparición de la onda de LH se sitúa entre 54-60 horas (Tsonis *et al.*, 1984).

#### 5.1.4.2. Intervalo inicio del celo-pico de LH

El intervalo inicio de celo-pico de LH se encuentra alargado en la raza canaria ( $25.33 \pm 9.20$ , tabla 4.3.) . Este intervalo también presenta una amplia variación en su longitud en otras razas ovinas, si bien en la mayoría de las ocasiones el pico de LH se encuentra, acoplado con el inicio del celo (6.4 h. -raza Galway-, Quirke *et al.*, 1981; 4.1 h.-raza Galway-, Adams *et al.*, 1988; 4.4 h. -raza Finnish Landrace x Rambouillet-, Rawlings and Cook, 1992), o bien acontece muy tempranamente en el celo (13.5 h. -raza Preálpes-, Bindon *et al.*, 1979). En razas de mayor tasa de ovulación, el pico de LH aparece al inicio del celo (11.2 h. -raza Finnish Landrace-, Adams *et al.*, 1988), o bien ya ha avanzado el celo, (25.1 h. -raza Romanov-, Bindon *et al.*, 1979), si bien en estas razas prolíficas la duración del celo es notoriamente superior. A la vista de la duración del celo de la oveja canaria, no parece probable que el pico de LH se acerque mucho más al inicio del celo, y que por tanto, en la oveja canaria se sitúa alrededor de la mitad del celo.

#### 5.1.4.3. Intervalo pico de LH-final del celo

Entre el pico de LH y el final del celo de la oveja canaria, obtenemos un valor medio alrededor de 17 horas (tabla 4.3.); este nivel es inferior al obtenido para otras razas de parecida tasa de ovulación (25 h. -razas Ile de France y Preálpes-, Bindon *et al.*, 1979; 30 h. -raza Galway-, Adams *et al.*, 1988), mientras que en las razas de superior tasa de ovulación, este intervalo es aún mayor (35 h. -raza Finnish Landrace-, Adams *et al.*, 1988). El hecho de que este intervalo en la oveja canaria sea menor que en otras razas de similar prolificidad, tiene coherencia con la mayor duración del intervalo inicio celo-pico de LH, y refuerza la idea de que el pico de LH en la oveja canaria se vendría a situar alrededor de la mitad del celo.

El elevado error standard que presenta este último parámetro ( $17.33 \pm 9.37$  horas) es debido a que una oveja presentó el pico de LH dos horas antes de la detección del primer celo y otro animal presentó el pico de LH 18 horas después de la finalización del celo.

### 5.1.4.4. Intervalo pico de LH-ovulación

Entre el pico de LH y la ovulación transcurren alrededor de 20 horas (tabla 4.3.) con unos extremos bastantes amplios (8-33 h.), probablemente debido al hecho de que sólo se detectaba el momento de ovulación una vez cada 24 horas, y por tanto se podía cometer un error de hasta 12 horas en determinar el momento de ovulación. Sin embargo, parece que en este parámetro se ha compensado bastante bien las posibles desviaciones, puesto que el valor obtenido (20 horas), se encuentra cercano al valor considerado normal para las diferentes razas ovinas (20-26 horas; Goodman, 1988).

### 5.1.4.5. Onda preovulatoria de LH

El nivel medio del pico de LH (56.3 ng/ml; tabla 4.4.) en la oveja canaria se encuentra situado en un nivel intermedio en comparación con otras razas: Finnish Landrace x Rambouillet (39.3 ng/ml, Rawlings and Cook, 1993), Romanov (54.4 ng/ml, Cahill *et al.*, 1981), Finnish Landrace (75.2 ng/ml, Adams *et al.*, 1988), Ile de France (78.5 ng/ml; Cahill *et al.*, 1981), Clun Forest (92.9 ng/ml, Davies and Beck, 1993). No parece que la concentración de LH se encuentre relacionado con la T.O. ni dentro de una misma raza ni entre razas diferentes (Adams *et al.*, 1988). En la oveja canaria, tampoco existe relación entre la concentración máxima de LH y la tasa de ovulación ( $r=0.15$ ;  $p>0.8$ ).

La duración de la onda de LH queda definida por lo general como el tiempo durante el cual los niveles de LH se encuentran por encima de una determinada concentración.

Rawling and Cook (1993) definen la duración de la onda cuando los niveles de LH se encuentran por encima de 2 ng/ml y obtienen una duración de la onda de 13.5 horas; Davies and Beck (1993) utilizando un método similar obtienen una duración media de 12.3 horas en la raza Clun Forest. Quirke *et al.* (1981) obtiene una duración de la onda de 8.1 horas en la raza Galway, si bien aplica PMSG y considera que la descarga preovulatoria se sitúa por encima de 20 ng/ml. Baird and McNeilly (1981) definen que la onda preovulatoria de LH ha comenzado cuando los niveles de LH se encuentren por encima de 5 ng/ml, obteniendo una duración de la onda superior a las 12 horas. En la raza canaria, partiendo de 5 ng/ml, obtenemos una duración media de la onda ligeramente por encima de las 14 horas (tabla 4.5.), guardando una estrecha relación con la cantidad final de LH liberada durante este período.

El área bajo el pico de LH se ha ajustado con respecto a la duración de la onda de manera similar a otros autores, que definen el área bajo el pico de LH como la suma de valores de LH observados durante el período de descarga (Cahill *et al.*, 1981, Quirke *et al.*, 1981). Sin embargo, Adams *et al.* (1988) define el área bajo el pico de LH, como la suma de los valores de LH que se integran desde 12 horas antes hasta 12 horas después de la concentración máxima de LH. Consideramos que el método que hemos utilizado en la oveja canaria permite determinar con bastante fiabilidad este parámetro. El valor del área bajo la curva se sitúa en la oveja canaria en un nivel intermedio (357 ng/ml; tabla 4.6.), por debajo de la raza Ile de France (Cahill *et al.*, 1981) y por encima de los valores descritos para la raza Romanov (Cahill *et al.*, 1981) y la raza Galway (Quirke *et al.*, 1981), si bien en esta última raza se aplica un tratamiento de PMSG. La LH total liberada a lo largo de la onda preovulatoria tampoco tiene influencia sobre la tasa de ovulación en la oveja canaria, de manera similar a lo descrito por otros autores (Adams *et al.*, 1988).

Por otro lado, teniendo en cuenta la elevada correlación entre la duración de la onda

de LH y el área bajo el pico de LH, se puede afirmar que en la oveja canaria la concentración total del área bajo el pico de la onda preovulatoria de LH depende fundamentalmente de la duración de dicha onda, y en menor medida de la concentración alcanzada en el pico de la misma.

La velocidad de ascenso de la onda de LH en la raza canaria es inferior a la velocidad de descenso (tabla 4.6.). Esto es debido fundamentalmente a que desde el pico de LH hasta 4 horas después del mismo se produce un descenso vertiginoso con una velocidad de 11.4 ng/hora (frente a los 8.7 ng/hora de velocidad de ascenso desde -4/0 horas con respecto al pico de LH), mientras que desde + 4 h. hasta el comienzo de los niveles basales la velocidad de la onda es mucho más moderada. Rawlings and Cook (1993) trabajando con ovejas Clun Forest, obtienen una caída más brusca de los niveles de LH en la fase descendente, y por lo tanto, la velocidad de descenso de la onda es mayor que la de ascenso.

### **5.1.5. PROGESTERONA**

El método utilizado (radioinmunoanálisis con extracción) para determinar los niveles de progesterona plasmática a lo largo del ciclo estral de la oveja canaria, permite observar claramente dos fases netamente diferenciadas: una fase de niveles < 0.5 ng/ml, donde tienen lugar las manifestaciones estrales, el pico de LH y la ovulación, y una fase con niveles por encima de 0.5 ng/ml, coincidente con la presencia del cuerpo lúteo en el ovario. Para algunos autores los niveles basales de progesterona quedan definidos por debajo de 0.5 ng/ml (Bindon *et al.*, 1979; Cahill *et al.*, 1981; Adams *et al.*, 1988), mientras que para otros los niveles basales se mantienen hasta 1 ng/ml (Rhind *et al.*, 1985; Mukasa-Mugerwa *et al.*, 1990).

Las diferentes fases observadas con la técnica empleada en nuestra experiencia son similares tanto a las apreciadas por RIA sin extracción (Cahill *et al.*, 1981; Oyedipe *et al.*, 1989; Davies and Beck, 1993), como por ELISA (Mukasa *et al.*, 1990).

El día del pico de LH, los niveles de progesterona de la oveja canaria son basales (tabla 4.7.), de manera similar al resto de razas ovinas (Adams *et al.*, 1988; Oyedipe *et al.*, 1989; Mukasa *et al.*, 1990). El perfil de progesterona (fase de niveles basales post pico de LH, fase de ascenso, fase de meseta, fase de descenso, y niveles basales hasta nuevo pico de LH) de la oveja canaria se encuentra presente en numerosas razas, con independencia de su prolificidad (Cahill *et al.*, 1981; Adams *et al.*, 1988), y del método empleado (Bindon *et al.*, 1979; Cahill *et al.*, 1981; Mukasa *et al.*, 1990). Sin embargo, donde sí se observan diferencias es en la duración de cada una de las fases del perfil de progesterona, que tienen reflejo en la longitud del ciclo estral.

Tras el pico de LH, en la oveja canaria se observa una fase de niveles basales con una duración media cercana a de los tres días de duración (tabla 4.8.). Este período de niveles basales guarda coherencia con la duración obtenida tanto para la raza Ile de France (3 días; Cahill *et al.*, 1981), como para la raza Romanov (cercana a los tres días; Cahill *et al.*, 1981). Por tanto, una mayor duración del comportamiento estral, no conlleva una fase más prolongada de niveles basales de progesterona. En ovejas Yankasa, la duración de esta fase es de unos 4 días, si bien se toma como referencia el inicio del celo y los niveles basales se estiman hasta 1 ng/ml (Oyedipe *et al.*, 1989).

La duración de la fase de ascenso de la oveja canaria se encuentra cercana a los 4 días de duración y la concentración media que se obtiene se sitúa por debajo de los 2 ng/ml (tabla 4.8.). En ovejas Ile de France, la duración de esta fase es de unos 4 días y con niveles medios de progesterona por debajo de los 2 ng/ml; en ovejas Romanov, la duración de este

período oscila entre 3 y 4 días, y los niveles de progesterona son ligeramente superiores a 2 ng/ml (Cahill *et al.*, 1981). En ovejas de mayor T.O. se observa un ascenso de los niveles de progesterona más rápido que en las de menor T.O. (Cahill *et al.*, 1981; Adams *et al.*, 1988); en la oveja canaria no se observa relación entre una mayor T.O. y un ascenso más rápido, probablemente como resultado del reducido número de animales empleados en este estudio.

La fase de meseta en la oveja canaria aparece como media a los 8 días tras el pico de LH, tiene una duración cercana a los 9 días (tabla 4.8.) y los niveles (ng/ml) más altos se encuentran entre los días 9 y 13 con respecto a la ovulación vista. Esta fase de meseta es la que probablemente determina la mayor duración del ciclo estral en la oveja canaria, puesto que en otras razas esta fase tiene una longitud inferior: en ovejas Ile de France, tiene una duración de 7 días; en Romanov, duración entre 7-8 días (Cahill *et al.*, 1981); en Yankasa, 5 días de duración (Mukasa *et al.*, 1990).

Es en la fase de meseta donde se presentan los niveles más altos de progesterona (Bindon *et al.*, 1979; Cahill *et al.*, 1981; Adams *et al.*, 1989; Oyedipe *et al.*, 1989; Mukasa *et al.*, 1990). Los niveles de progesterona en la fase luteal, y sobre todo en la fase de meseta, son más elevados en las razas de mayor tasa de ovulación que en las de menor T.O. (Bindon *et al.*, 1979; Cahill *et al.*, 1981); el incremento de la secreción de progesterona durante la fase luteal en razas de elevada prolificidad parece ser una consecuencia, más que una causa, del número de cuerpos lúteos presentes (Cahill *et al.*, 1981; Adams *et al.*, 1989). Nosotros no hemos observado una buena correlación entre el número de cuerpos lúteos y la concentración de progesterona en la fase de meseta luteal o la duración de esta fase; al igual que ocurría en la fase de ascenso, puede ser resultado de un número insuficiente de animales, o bien que dentro de la raza canaria las diferencias en los niveles de progesterona resultado del número de cuerpos lúteos presentes no llegan a ser significativa.

La concentración de progesterona durante el período de meseta en la oveja canaria presenta unos valores medios que oscilan entre 5-9 ng/ml. La mayoría de los autores realizan la determinación de la progesterona plasmática mediante radioinmunoanálisis sin extracción, con una gran diversidad en cuanto a la concentración alcanzada. Bindon et al (1979) obtienen valores entre 2.0-2.5 ng/ml durante la fase luteal en la raza Preálpes, y valores cercanos a los 3.5 ng/ml en la raza Romanov. Cahill et al. (1981) observan valores cercanos o superiores a 2 ng/ml entre los días 7 a 14 respecto al pico de LH en la raza Ile de France, mientras que en Romanov se sitúan por encima de los 3 ng/ml. Oyedipe et al. (1989), en ovejas Yankasa utilizando también un RIA sin extracción, obtienen valores entre 2-3 ng/ml durante la fase de meseta; en este mismo trabajo, se generan valores entre 4-9 ng/ml tras la aplicación de 500 UI de PMSG, el día de la retirada de las esponjas. Por otro lado, la utilización de un RIA con extracción de características similares al utilizado en nuestra experiencia, permite obtener valores de  $8.8 \pm 2.2$  ng/ml durante los días 14 y 15 del ciclo estral en ovejas cíclicas Romanov (Monniaux, 1987); asimismo, la utilización de un RIA con extracción ligeramente diferente al utilizado en nuestra experiencia, permite obtener valores cercanos a 3 ng/ml antes de la luteolisis en la raza Galway y sobre 4 ng/ml en la raza Finnish Landrace (Adams et al., 1988).

En la oveja canaria, la fase de descenso tiene una duración inferior a los 2 días, presentando por tanto una pendiente más pronunciada que la fase de ascenso (tabla 4.8.). Esta brusca caída de los niveles de progesterona en la oveja canaria, es prácticamente similar en todas las razas: en Ile de France (Cahill *et al.*, 1981) y en Yankasa (Mukasa *et al.*, 1990), dura poco más de un día; en Romanov (Cahill *et al.*, 1981) y en Finnish Landrace (Adams *et al.*, 1989) se acercan a los 2 días de duración. El modelo de luteolisis en razas con distinta tasa de ovulación ha generado resultados contradictorios. Bindon *et al.* (1979) y Cahill *et al.* (1981) obtienen que las razas menos prolíficas alcanzan con mayor rapidez los niveles basales que las razas con mayor tasa de ovulación. Sin embargo, Adams *et al.* (1988) no

obtienen diferencias entre razas de distinta T.O., en el intervalo desde el comienzo de la luteolisis hasta la instauración de niveles basales de progesterona.

En ovejas Ile de France, una vez finalizada la luteolisis, se presentan niveles basales que se mantienen durante 1 día antes de que se produzca el pico de LH (Cahill *et al.*, 1981). En ovejas Yankasa, transcurren dos días entre la aparición de niveles basales y el inicio del celo (Mukasa *et al.*, 1990). En la oveja canaria, el intervalo entre el inicio de los niveles basales y el pico de LH se encuentra alrededor de 1.5 días.

En síntesis, la oveja canaria en función de los niveles de progesterona presenta un período de niveles basales (no progesterónica), con una duración de 4-5 días, y una fase progesterónica ligeramente por encima de los 14.5 días de duración. Es esta fase luteal la que determina fundamentalmente la mayor duración del ciclo estral de la oveja canaria: en ovejas Ile de France, se obtienen 12.5 días de fase progesterónica y 4 días de fase de niveles basales (Cahill *et al.*, 1981); en Yankasa se observa 11 días de fase progesterónica y de 5 a 6 días de fase con niveles basales (Mukasa *et al.*, 1990); en ovejas nativas de Islandia, la longitud de la fase luteal es de 11 días y la de la fase folicular es de 5 días (Eldon, 1994). En aquellas razas, donde la duración *fisiológica* del ciclo se encuentra por encima de los 18 días, se alarga tanto la fase progesterónica como la fase de niveles basales; en la oveja canaria lo que se alarga es la fase luteal.

## 5.2. CALIDAD FOLICULAR

### 5.2.1. POBLACIÓN FOLICULAR A LO LARGO DE LA FASE FOLICULAR

La distribución de la población folicular ovárica en función de la talla folicular, muestra importantes variaciones en función de la raza estudiada y de las categorías foliculares observadas. Así, si tenemos en cuenta exclusivamente las tallas foliculares utilizadas para clasificar las diferentes categorías en la oveja canaria, observamos que tanto en ovejas Texel (Brand and de Jong, 1973), como en Scottish Blackface o Finnish Landrace (Webb *et al.*, 1989), así como en Corriedale (Cahill *et al.*, 1985) existe un predominio de folículos pequeños (1-2 mm. de diámetro), seguido de folículos medianos (2-4 mm. de diámetro) y folículos grandes (> 4 mm. de diámetro). En la oveja canaria, a lo largo de los tres días de la fase folicular estudiada, se observa un predominio de folículos medianos, seguido de folículos pequeños, y por último de folículos grandes (tabla 4.9.). Esta diferencia en la raza canaria parece explicarse por una mayor intensidad en la selección de folículos de 2-4 mm. de diámetro que impide que prosiga a tallas superiores, mientras que el tránsito de los folículos en la categoría de 1-2 mm. de diámetro es muy rápida.

El número total de folículos pequeños (1-2 mm.) a lo largo de la fase folicular en la oveja canaria se viene a situar alrededor de 4 folículos/oveja (tabla 4.9.). En ovejas de baja prolificidad, este número de folículos es netamente superior, con valores de 12 folículos/oveja en Merino x Scottish Blackface (Webb *et al.*, 1989), y de alrededor de 28-29 folículos/oveja en Texel (Brand and de Jong, 1973); en razas de tasa de ovulación alta, el número de folículos pequeños también es superior al de la raza canaria (Webb *et al.*, 1989). Por otro lado, en la raza Corriedale, el número de folículos entre 0,5-2 mm. de diámetro se situaba alrededor de 11 folículos (Cahill *et al.*, 1985), mientras que en las razas Timahdite y D´Man, el número de folículos entre 1.2-2.3 mm. de diámetro oscilaba entre 5-6 y 9-10

folículos/oveja respectivamente (Lahlou-Kassi and Mariana, 1984).

En función de lo expuesto, la oveja canaria presenta un menor número de folículos entre 1-2 mm. de diámetro, si bien se acerca a los valores de las razas Corriedale y Timahdite (aunque en estas dos razas los resultados vienen presentados en categorías foliculares distintas a las empleadas por nosotros en la raza canaria). Este menor número de folículos pequeños podría ser resultado de que en la onda de maduración folicular presente en la fase folicular, el número de folículos que integren la onda sea escaso y que los folículos pequeños se integren rápidamente en la categoría inmediata superior. Por otro lado, hay que tener en cuenta que aproximadamente un 30% de los folículos de esta categoría sufrieron alteraciones en su disección y no se tuvieron en cuenta a la hora de obtener el número de folículos medios a lo largo de la fase folicular, si bien este hecho no implicaría modificaciones sustanciales en el número total de folículos 1-2 mm. de diámetro en la oveja canaria, ya que se vendría a situar aproximadamente en 5.3 folículos/oveja.

El número de folículos medianos (2-4 mm. de diámetro) por oveja, a lo largo de la fase folicular se sitúa alrededor de 6 folículos/oveja (tabla 4.9.). Este valor se encuentra en una situación intermedia con respecto a otras razas: en ovejas Texel, el número de folículos medianos es alrededor de 9-9.5 folículos/oveja a lo largo de la fase folicular (Brand and de Jong, 1973); en Merino x Scottish Blackface, el número de folículos medianos en los dos primeros días de la fase folicular era de 8.7 folículos/oveja (Webb *et al.*, 1989), mientras que en Finnish Landrace, el número de folículos medianos se situaba sobre 5 folículos/oveja (Webb *et al.*, 1989). En ovejas Corriedale, el día 15 del ciclo, el número de folículos medianos observados era de 4.4 folículos/oveja (Cahill *et al.*, 1985).

Nosotros no observamos diferencias en el número medio de folículos medianos a lo largo de los tres días de la fase folicular estudiada, de manera similar a lo recogido por otros

autores (Brand and De Jong, 1973; Webb *et al.*, 1989). Sin embargo, Noel *et al.* (1993) obtienen que el número de folículos entre 2-3.5 mm. de diámetro experimenta un notable descenso entre el día 14 y el día 17 del ciclo estral.

El número medio de folículos grandes/oveja/día a lo largo de la fase folicular de la oveja canaria, se sitúa alrededor de 2 folículos (tabla 4.9.). Este valor se encuentra perfectamente integrado con respecto a otras razas: en ovejas Texel, el número de folículos mayores de 4 mm. de diámetro es cercano a los 2 folículos a lo largo de la fase folicular (Brand and de Jong, 1973), mientras que en Merino x Scottish Blackface es alrededor de 2.2. y en Finnish Landrace sobre 3.6 folículos/oveja (Webb *et al.*, 1989). Asimismo, en días concretos de la fase folicular también se observa un número pequeño de folículos grandes: en ovejas Corriedale se obtienen 2.6 folículos/oveja (Cahill *et al.*, 1985); en Suffolk y en Finnish Landrace, 2.4 y 3.5 folículos/oveja respectivamente (Castonguay *et al.*, 1990); en las razas D´Man y Timahdite, el número de folículos mayores de 3.5 mm. de diámetro se encuentra sobre 2 y 1 folículo respectivamente (Lahlou-Kassi and Mariana, 1984).

De manera similar a lo observado en folículos pequeños y folículos medianos, en la raza canaria no se observaron modificaciones en el número medio de folículos grandes a lo largo de los tres días de la fase folicular, siendo coincidente con otros autores (Brand and De Jong, 1973; Webb *et al.*, 1989). Sin embargo, Noel *et al.* (1993), al estudiar la onda de maduración folicular en la fase folicular, encuentran que el número de folículos mayores de 4 mm. de diámetro oscila desde 0-1 folículo al inicio de la fase folicular, hasta aproximadamente 5-6 folículos al final de la misma.

El número de folículos grandes (2.2) observados a lo largo de la fase folicular en la raza canaria y la tasa de ovulación de esta raza (1.53) permite afirmar que la oveja canaria se encuadra dentro de aquellas razas en las que el número de folículos grandes o

preovulatorios es cercano a la tasa de ovulación (Cahill and Mauleon, 1980; Lahlou-Kassi and Mariana, 1984; Cahill *et al.*, 1985; Webb and Gauld, 1985; Webb *et al.*, 1989; Castonguay *et al.*, 1990; Driancourt *et al.*, 1990). Sin embargo, Noel *et al.* (1993) obtienen que el número de folículos grandes observados en la fase folicular es de 2 a 3 veces la tasa de ovulación.

### **5.2.2. CALIDAD FOLICULAR A LO LARGO DE LA FASE FOLICULAR**

La raza canaria presenta un predominio de folículos atrésicos sobre folículos normales a lo largo de la fase folicular. Este hecho es particularmente evidente durante los dos primeros días de la fase folicular (tabla 4.10.).

El grado de atresia observado en la raza canaria es comparable al de otras razas, independientemente del método empleado para valorarlo. Así, en ovejas Texel, el grado de atresia a lo largo de la fase folicular, en folículos mayores de 1 mm. de diámetro se sitúa alrededor del 65-70% (Brand and de Jong, 1973). En la fase folicular temprana, en ovejas Booroola x Romney seleccionadas para alta y baja tasa de ovulación, el grado de atresia es de un 61% y un 64% respectivamente (McNatty *et al.*, 1985), mientras en ovejas Peul, el porcentaje de atresia en aquellos folículos mayores de 0.8 mm. de diámetro se sitúa alrededor del 57% (Yenikoye *et al.*, 1988). Si tenemos en cuenta la población folicular mayor de 0.5 mm. de diámetro, el porcentaje de atresia tanto en ovejas Timahdite (36%) como en ovejas D'Man (33%) es netamente inferior, pero hay que considerar que entre 0.6-1.2 mm. de diámetro es donde el índice mitótico es más elevado (Turnbull *et al.*, 1977; Cahill, 1979), y se ha puesto de manifiesto una relación inversa entre atresia y la proliferación de células de granulosa (Monniaux, 1987).

En nuestro caso, la población de folículos mayores de 2 mm. de diámetro de la raza

canaria presenta un 77% de folículos atrésicos y un 23% de folículos normales en el conjunto de los tres días de la fase folicular. Esta observación es coherente con los resultados de Monniaux (1987) que trabajando con ovejas cíclicas Romanov, obtiene que en la fase folicular temprana, la población de folículos mayores de 2 mm. de diámetro presenta un 67% de atresia; por otra parte, se ha observado que en ovejas de baja tasa de ovulación, la población de folículos mayores de 2 mm. de diámetro experimenta un incremento en el porcentaje de atresia desde el 80 al 92% durante el período transcurrido entre la fase folicular temprana y la fase folicular tardía (Driancourt *et al.*, 1991).

Al distinguir la atresia, en atresia temprana y atresia avanzada, se observa que en la raza canaria no existen diferencias entre las dos fases de atresia, si bien el día 2 de la fase folicular existe una mayoría de folículos en atresia temprana que en atresia avanzada (tabla 4.11.). Webb *et al.* (1989) observan que existe un mayor porcentaje de folículos en atresia temprana que en atresia avanzada en Merino x Scottish Blackface así como en Finnish Landrace x Merino, pero no encuentran diferencias en la raza Finnish Landrace. Monniaux (1987) trabajando con ovejas Romanov, obtiene que dentro de los folículos atrésicos (mayores de 2 mm. de diámetro), un 40% se encuentra en atresia temprana frente a un 60% en atresia avanzada; según nuestros resultados en la raza canaria, para la población folicular mayor de 2 mm. de diámetro existe una igualdad manifiesta entre atresia temprana y atresia avanzada. Asimismo, al estudiar la atresia avanzada Monniaux (1987) obtiene una mayoría de folículos en atresia avanzada 1 frente a los folículos en atresia avanzada 2, resultados muy similares a los obtenidos en nuestra experiencia (tabla 4.13.).

### **5.2.3. CALIDAD FOLICULAR EN LAS DIFERENTES TALLAS A LO LARGO DE LA FASE FOLICULAR**

En la raza canaria, el grado de atresia en los folículos de 1-2 mm. de diámetro en el conjunto de la fase folicular es de un 35 % (tabla 4.17.). Este valor es inferior al de la mayoría de razas estudiadas, tanto en experiencias que impliquen toda la fase folicular (Brand and De Jong, 1973), como en observaciones realizadas en momentos puntuales de la misma (Lahlou-Kassi and Mariana, 1984; McNatty *et al.*, 1985; Driancourt *et al.*, 1991).

En la raza canaria, la incidencia de la atresia en los folículos de 1-2 mm. de diámetro es baja, fundamentalmente debido a un muy alto porcentaje de folículos sanos el día 3 de la fase folicular (tabla 4.16., tabla 4.18.): el principal hecho diferenciador del día 3 es precisamente este fenómeno. Esto podría ser indicativo del inicio de una nueva oleada de desarrollo folicular.

Dentro de los folículos atrésicos, el 77% de los folículos entre 1-2 mm. de diámetro se encuentran en una fase temprana frente a un 23% de folículos en atresia avanzada (tabla 4.21.). En la raza canaria, la profundidad de la atresia es poco intensa como demuestra el menor porcentaje de folículos en atresia avanzada.

En la talla de 2-4 mm. de diámetro es donde se observa el mayor grado de atresia en la raza canaria, encontrándose en los tres días un porcentaje similar de atresia (80-85%), indicando que se trata de un grado de desarrollo clave en la maduración de la población folicular antes de alcanzar el tamaño ovulatorio (tabla 4.19.). Por tanto, en la oveja canaria, es en esta talla de 2-4 mm. de diámetro donde se produce un mayor grado de selección. El grado de atresia en esta talla es muy variable dependiendo de la raza estudiada y del método empleado, pero siempre es elevado: en ovejas Texel, el porcentaje de atresia obtenido a lo

largo de la fase folicular es de un 75% (Brand and de Jong, 1973); Lahlou-Kassi and Mariana (1984) obtienen alrededor de un 60 y un 50% de atresia para las razas Timahdite y D'Man en los folículos de 2.2 a 3.3 mm. de diámetro, si bien se trata de una observación realizada durante la fase folicular temprana y consideran que la atresia está presente cuando se observan 10 cuerpos picnóticos. Noel *et al* (1994), mediante observaciones laparoscópicas obtienen alrededor de un 50% de atresia en la categoría de 2-3.5 mm. de diámetro.

En la raza canaria, no se observan diferencias significativas entre las fases de atresia temprana y de atresia avanzada en el conjunto de la fase folicular, para la categoría de folículos medianos (tabla 4.21.).

Los folículos grandes de la raza canaria presentan un porcentaje de atresia prácticamente similar a lo largo de la fase folicular, situándose alrededor del 50% (tabla 4.20.). En razas de baja tasa de ovulación, el grado de atresia es variable puesto que puede oscilar desde un 20-30% (Brand and de Jong, 1973; Lahlou-Kassi and Mariana, 1984), hasta un 64% en folículos de 4-5.5 mm. de diámetro, tras un tratamiento sincronizador previo con esponjas intravaginales de FGA (Noel *et al.*, 1994). En razas de tasa de ovulación superior, el grado de atresia en esta talla folicular es, por lo general, bajo (Lahlou-Kassi and Mariana, 1984; Driancourt *et al.*, 1990).

Los folículos mayores de 4 mm. de diámetro son muy escasos en los ovarios de las ovejas de la raza canaria; prácticamente todos los folículos sanos que alcanzan el tamaño preovulatorio al final de la fase folicular, terminarán por ovular. Por tanto, podemos suponer que la tasa de ovulación coincide con el número de folículos mayores de 4 mm. sanos presentes el tercer día.

En función de los resultados obtenidos en las tres tallas foliculares estudiadas, se

puede observar que la onda de desarrollo folicular que tiene lugar en la fase folicular de la oveja canaria, está integrada por un bajo número de folículos que sufren una drástica selección en la categoría de 2-4 mm. de diámetro, de tal manera que aquellos que alcanzan la talla mayor de 4 mm. de diámetro, tienen un porcentaje de posibilidades de ovular cercano al 50%. Por otra parte, hay que hacer notar que los folículos mayores de 4 mm. de diámetro están presentes desde el inicio de la fase folicular, y este hecho puede guardar relación con la elevada intensidad de atresia observada en la categoría de 2-4 mm. de diámetro; los folículos grandes pueden generar una supresión de las concentraciones plasmáticas de FSH (Martin *et al.*, 1988), de tal manera que se bloquea el crecimiento por encima de 2-3 mm. de diámetro llevándolos a la atresia; en esta categoría, los folículos muestran ser dependientes de gonadotropinas, circunstancia que parece no suceder en folículos menores de 2 mm. de diámetro (Driancourt *et al.*, 1987; Henderson *et al.*, 1988; McNatty *et al.*, 1990).

Finalmente, es interesante la inversión que se produce en la profundidad de la atresia: en folículos pequeños predominan las fases tempranas, en folículos medianos no hay diferencias y en folículos grandes dominan las fases avanzadas; este aspecto, parece indicar una relación entre la profundidad de la atresia y el tamaño folicular.

En las tallas menores de 1 mm. de diámetro la atresia es muy baja (Brand and de Jong, 1973; Lahlou-Kassi *et al.*, 1984); es a partir de 1 mm. de diámetro cuando se inician sustancialmente los procesos degenerativos, por lo tanto no es de extrañar que la mayoría de los folículos atrésicos entre 1-2 mm. de diámetro, se encuentren en sus fases tempranas (tabla 4.21.). En los folículos atrésicos mayores de 4 mm. de diámetro, la mayoría se encuentran en atresia avanzada (tabla 4.21.), pudiendo ser indicativo que los procesos degenerativos iniciales en estos folículos grandes son más rápidos que en tallas inferiores o bien, tenemos que admitir la posibilidad de que existen folículos que ingresan en esta

categoría con un cierto grado de atresia, lo cual supondría que es posible el crecimiento folicular en las primeras fases de atresia, que va evolucionando posteriormente hacia estados avanzados de degeneración. Teniendo en cuenta que el número de folículos sanos mayores de 4 mm. de diámetro coincide prácticamente con la T.O. de la raza, podemos suponer que los folículos que ingresan sanos en la categoría de mayores de 4 mm. de diámetro, ya no experimentan procesos de atresia.

### 5.3. CULTIVOS CELULARES

#### 5.3.1. CAPACIDAD PROLIFERATIVA Y DIFERENCIADORA DE LAS CÉLULAS DE GRANULOSA EN CULTIVO

En la oveja canaria, las células de granulosa procedentes de folículos pequeños (1-2 mm. de diámetro) presentan capacidad proliferativa a las 72 horas de cultivo, tanto bajo condiciones basales (control) como con tratamientos. Las células de granulosa procedentes de folículos medianos (2-4 mm.) no muestran un incremento en el número de células bajo condiciones basales, pero sí con cualquiera de los tratamientos, si bien las diferencias no son significativas. Por último, las células de folículos grandes no muestran proliferación a las 72 horas de cultivo, ya sean condiciones basales o con tratamiento y su número es prácticamente similar a la población celular en el momento de la siembra (tabla 4.22.).

Nuestros resultados guardan coherencia con los obtenidos por otros autores tanto en cultivos a corto plazo como a largo plazo. A corto plazo, Monniaux (1987) obtiene que a las 2 horas de cultivo el índice de marcaje (capacidad proliferativa) era superior en las células de granulosa procedentes de folículos pequeños (2-4 mm.) que las de los folículos mayores (> 6 mm. ). Por otro lado, Monniaux and Pisselet (1992), trabajando en cultivos a largo plazo (hasta 96 horas), obtienen que bajo condiciones basales, las células de granulosa de folículos pequeños (1-3 mm.) tenían mayores índices de marcaje (capacidad proliferativa) que las células de folículos grandes en cualquier momento del cultivo. Asimismo, la aplicación de IGF-I se traducía en un incremento en la proliferación de las células de granulosa, siendo más notable en los folículos pequeños que en los grandes.

La capacidad diferenciadora de las células de granulosa en los cultivos *in vitro*, se ha determinado en numerosas experiencias por la producción de progesterona (McNatty *et al.*, 1985; Monniaux, 1987; Monniaux and Pisselet, 1992). En nuestro estudio, se observó que

en condiciones basales, las células de granulosa procedentes de folículos medianos y grandes producen mayor cantidad de progesterona que las células procedentes de folículos pequeños a las 24 horas de cultivo (tabla 4.24.). Este aspecto es similar al observado por diferentes autores que en condiciones basales, obtienen que al incrementarse la talla folicular, aumenta la capacidad esteroidogénica, tanto en cultivos a corto plazo (Monniaux, 1987), como en cultivos a largo plazo (McNatty *et al.*, 1985; Nandedkar *et al.*, 1990; Monniaux and Pisselet, 1992).

Por lo tanto, parece que en las células de granulosa ovárica de la oveja canaria, se pone de manifiesto una relación inversa entre proliferación y diferenciación, siendo particularmente evidente en los folículos de 1-2 mm. de diámetro y folículos mayores de 4 mm. de diámetro. Este hecho se ha puesto de manifiesto en otras experiencias, independientemente de la duración del cultivo (McNatty *et al.*, 1985; Monniaux, 1987; Monniaux and Pisselet, 1992). Esta circunstancia parece explicarse por la existencia de diferentes poblaciones foliculares en distintas fases de desarrollo, de tal forma que algunas de estas células ya están diferenciadas y poseen capacidad de producir progesterona, mientras que otras son más sensibles a la proliferación (Monniaux, 1987; Monniaux and Pisselet, 1992). Los folículos grandes poseerán mayor cantidad de células diferenciadas que los folículos pequeños, y de ahí que su capacidad esteroidogénica se manifiesta más rápidamente y en mayor grado que en los folículos de talla inferior.

En la oveja canaria, los folículos pequeños bajo condiciones basales, muestran una elevada capacidad proliferativa y un escaso poder diferenciador; la insulina no tiene efecto sobre la multiplicación celular, puede deberse a que las células de granulosa de estos folículos pequeños se encuentran al máximo de su propia capacidad proliferativa y la insulina no es capaz de incrementarla (tabla 5.1.). Diferentes autores, obtienen que la IGF-I presenta una acción estimulante sobre la proliferación celular y ningún efecto sobre la capacidad

diferenciadora en células procedentes de folículos pequeños (Adashi *et al.*, 1986; Monniaux and Pisselet, 1992).

En folículos medianos, bajo condiciones basales no se observa proliferación significativa pero sí una gran capacidad diferenciadora; al aplicar el tratamiento con insulina, no se produce un incremento significativo en la población celular, esto puede explicarse porque en esta talla folicular, la mayoría de las células de granulosa están diferenciadas y la insulina no puede promover manifiestamente la multiplicación celular (tabla 5.1).

En los folículos grandes, no se observa capacidad proliferativa en condiciones basales, pero sí una notable capacidad diferenciadora; al aplicar la insulina no se observa efecto sobre la proliferación celular: nosotros suponemos que en esta talla folicular, la casi totalidad de las células de granulosa están totalmente diferenciadas, y la insulina no puede promover la multiplicación celular, al no existir células sensibles a este efecto. Estos resultados guardan coherencia con los obtenidos por Monniaux and Pisselet (1992) que al trabajar con células procedentes de folículos grandes (5-7 mm.), observan que la IGF-I estimula notablemente la capacidad diferenciadora y en muy poca medida la capacidad proliferativa (tabla 5.1).

| TIPO DE TRATAMIENTO   | TIPO DE EFECTO | TALLA FOLICULAR    |                    |                   |
|-----------------------|----------------|--------------------|--------------------|-------------------|
|                       |                | FOLICULOS PEQUEÑOS | FOLICULOS MEDIANOS | FOLICULOS GRANDES |
| CONTROL <sup>1</sup>  | PROLIFERACIÓN  | +++                | ++                 | 0                 |
|                       | DIFERENCIACIÓN | +                  | ++++               | ++++              |
| INSULINA <sup>2</sup> | PROLIFERACIÓN  | 0                  | +                  | 0                 |

<sup>1</sup> Los resultados del grupo control se encuentran contrastados con respecto a la concentración inicial

<sup>2</sup> Los resultados del tratamiento con insulina se encuentran contrastados con el grupo control

0: sin efecto; +: incremento no significativo; ++: incremento tendente a la significación (p < 0.15)  
 +++: incremento significativo (p < 0.05); ++++: incremento significativo (p < 0.01)

Tabla 5.1. Expresión de los resultados en función del tratamiento empleado. Efecto sobre la proliferación y la diferenciación celular

#### **5.4. SUGERENCIAS**

En función de los resultados del presente trabajo, planteamos las siguientes sugerencias con vistas a investigaciones futuras:

1. Influencia del pico de LH sobre la capacidad proliferativa y esteroidogénica de las células de granulosa.
  
2. Empleando tratamientos superovulatorios:
  - a. Determinar los principales parámetros del ciclo estral en la oveja de la raza Canaria
  
  - b. Caracterizar el grado de atresia folicular a lo largo de la fase folicular del ciclo estral, estableciendo la posible relación entre el pico de LH y el grado y profundidad de la atresia en las diferentes tallas foliculares.
  
  - c. Determinar la capacidad proliferativa y esteroidogénica de las células de granulosa.
  
3. Observar las modificaciones en el desarrollo folicular terminal en razas ovinas de diferente tasa de ovulación.

## **6. CONCLUSIONES**

En el presente trabajo en la oveja de la raza Canaria hemos establecido las siguientes conclusiones:

- 1) Entre los signos que acompañan al reflejo de inmovilidad del celo, la agitación de la cola y la búsqueda del macho son los que presentan una mayor frecuencia entre las 0 y 24 horas del comienzo del celo. Los signos de micción y balidos en respuesta a la presencia del macho presentan sus valores más bajos entre 12 horas antes y 24 horas después del comienzo del celo.
- 2) La duración del celo es de  $42.46 \pm 2.49$  horas y la duración del ciclo estral es de  $19.1 \pm 0.82$  días.
- 3) La duración de la onda de LH es de  $14.1 \pm 0.36$  horas y el valor del nivel máximo es de  $56.28 \pm 1.91$  ng/ml.
- 4) Existe una amplia variabilidad individual en las relaciones temporales entre el pico de LH y el comienzo y el final del celo, mientras que es menor la dispersión en el intervalo entre el pico de LH y la ovulación.
- 5) La fase progestérica del ciclo estral (niveles  $> 0.5$  ng/ml) dura  $14.6 \pm 0.7$  días; se pueden distinguir una fase de ascenso de  $3.87 \pm 0.27$  días, una fase de meseta de  $8.77 \pm 0.8$  días y una fase de descenso de  $1.97 \pm 0.32$  días. La fase no progestérica (niveles  $< 0.5$  ng/ml) tiene una duración de  $4.56 \pm 0.94$  días.
- 6) Durante la fase folicular, en el conjunto de los folículos mayores de 1 mm. de diámetro existe un predominio de atrésicos sobre normales, plasmado fundamentalmente en los dos primeros días de la fase folicular.

- 7) El día 2 de la fase folicular existe un predominio de la atresia temprana sobre la atresia avanzada en el conjunto de folículos mayores de 1 mm. de diámetro. En el total de la fase folicular, no existen diferencias entre atresia temprana y atresia avanzada.
- 8) Durante la fase folicular, en el conjunto de folículos mayores de 1 mm. de diámetro dentro de la atresia temprana existe una mayoría de folículos en atresia temprana 1 sobre folículos en atresia temprana 2. Dentro de la atresia avanzada, existe una mayoría de folículos en atresia avanzada 1 sobre folículos en atresia avanzada 2.
- 9) En la categoría de folículos de 1-2 mm. de diámetro, en el día 3 de la fase folicular existe un predominio de folículos normales sobre atrésicos, no habiendo ninguna diferencia en los días 1 y 2. En los folículos de 2-4 mm. de diámetro existe una mayoría de folículos atrésicos sobre normales en los tres días de la fase folicular. En los folículos mayores de 4 mm. de diámetro no existen diferencias entre folículos atrésicos y normales en los 3 días de la fase folicular.
- 10) En los folículos de 1-2 mm. de diámetro existe una mayoría de folículos en atresia temprana sobre folículos en atresia avanzada. En los folículos mayores de 2 mm. de diámetro no existen diferencias entre atresia temprana y atresia avanzada.
- 11) Tanto en condiciones basales, como bajo la influencia de tratamiento con insulina, las células de granulosa ovárica ovina *in vitro* procedentes de folículos de 1-2 mm. de diámetro, poseen una gran capacidad proliferativa, mientras las células de granulosa ovárica ovina *in vitro* procedentes de folículos mayores de 4 mm. de diámetro no presentan tal capacidad proliferativa.

12) Las células de granulosa ovárica ovina *in vitro* procedentes de folículos medianos (2-4 mm. de diámetro) y grandes (> 4 mm. de diámetro), presentan una mayor capacidad esteroidogénica que las células de granulosa ovina *in vitro* procedentes de folículos pequeños (1-2 mm. de diámetro).

## **7. RESUMEN**

En el presente estudio, se han utilizado ovejas de la raza canaria a las que se han determinado los principales parámetros (comportamiento estral, intervalos fisiológicos, niveles hormonales de LH y progesterona) del ciclo estral, y se ha caracterizado la calidad de los folículos ováricos durante la fase folicular del ciclo estral. Asimismo, se ha determinado la capacidad proliferativa y esteroidogénica de las células de granulosa *in vitro* procedentes de folículos en fase folicular.

En la caracterización del ciclo sexual, se obtiene que en el comportamiento estral, los signos más indicativos de la presencia del celo son el reflejo de inmovilidad, la búsqueda del macho, y en menor medida el coleteo y una frecuencia de micción disminuída. Como media el intervalo entre la retirada de las esponjas intravaginales de FGA y el celo es de  $40.85 \pm 4.84$  horas, mientras que la duración del celo es de  $42.4 \pm 2.9$  horas. El pico de LH tiene lugar a las  $25.3 \pm 9.2$  horas del comienzo del celo y la ovulación tiene lugar 19.7 horas después del pico de LH y alrededor de 41 horas desde el inicio del celo. La duración de la onda preovulatoria de LH es de  $14.1 \pm 0.36$  horas con un nivel máximo de  $56.3 \pm 1.9$  ng/ml. Los niveles basales de progesterona ( $<0.5$  ng/ml), se mantienen hasta  $2.9 \pm 0.79$  días tras el pico de LH, ascienden durante 4 días pasando de 0.5 a 4 ng/ml, se sostienen en niveles  $> 4$  ng/ml durante casi 9 días, siguiendo una fase de descenso de  $1.97 \pm 0.32$  días de duración hasta alcanzar de nuevo niveles basales.

En el conjunto de la fase folicular, un 61.8% de los folículos  $> 1$  mm. de diámetro son atrésicos, siendo el valor de atresia mayor en los dos primeros días de la fase folicular. En los folículos pequeños (1-2 mm.) existe una mayoría de folículos normales (64.8%), en folículos medianos (2-4 mm.) el porcentaje de atresia es similar a lo largo de los tres días de la fase folicular (83-85%), mientras que en folículos grandes el porcentaje de folículos normales es prácticamente similar al de folículos atrésicos.

Las células de granulosa procedentes de folículos ováricos ovinos cultivadas *in vitro* durante 72 horas, presentan una elevada capacidad proliferativa en aquellos folículos entre 1 y 4 mm. de diámetro, mientras los folículos > 4 mm. de diámetro no presentan capacidad proliferativa. La capacidad esteroidogénica (valorada en producción de progesterona) a las 24 horas de cultivo es mayor en los folículos medianos y grandes, que en los pequeños.

## **8. BIBLIOGRAFÍA**

**ADAMS, T.E.; KINDER, J.E.; CHARKRABORTY, P.K.; ESTERGREEN, V.L. and REEVES, J.J.** (1975): Ewe luteal function influenced by pulsatile administration of synthetic LHRH/FSHRH. *Endocrinology*, 97: 1460-1467 (cit. Adams *et al.*, 1988).

**ADAMS, T.E.; QUIRKE, J.F.; HANRAHAN, J.P.; ADAMS, B.M. and WATSON, J.G.** (1988): Gonadotrophin secretion during the periovulatory period in Galway and Finnish Landrace ewes selected for high ovulation rate. *J. Reprod. Fert.*, 83: 575-584.

**ADASHI, E.Y.; RESNICK, C.E.; SVOBODA, M.E. and VAN WYK, J.J.** (1985): Somatomedin C enhances induction of luteinizing hormone receptors by follicle stimulating hormone in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*, 116: 2369-2375.

**ADASHI, E.Y.; RESNICK, C.E.; SVOBODA, M.E. and VAN WYK, J.J.** (1986): Follicle stimulating hormone enhances somatomedin C binding to cultured rat granulosa cells. *J. Biol. Chem.*, 261: 3923-3926.

**ALLEN, W.R. and STEWART, F.** (1978): The biology of pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG). In Control of Reproduction in the Cow: Current topics in Veterinary Medicine. Martinus Nijhoff. The Hague. pp: 50-72

**AMIR, D.; ROSENBERG, M. and SCHINDLER, H.** (1984): Oestrous and ovarian activities of Finn-cross ewes during the postpartum and the seasonal anoestrous periods. *J. Agr. Sci.*, 103: 155-160.

**BÁEZ, M. y SÁNCHEZ, L.** (1983): En Islas de Fuego y Agua. Ed. Edirca S.L. Las Palmas de G.C. pp: 102-139.

**BAIRD, D.T. and SCARAMUZZI, R.J.** (1975): Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  and luteal regression in the ewe: comparison with 16-aryloxyprostaglandin. *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.*, 15: 161-174.

**BAIRD, D.T. and McNEILLY, A.S.** (1981): Gonadotrophic control of follicular development and function during the oestrous cycle of the ewe. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 30: 119-133.

**BAIRD, D.T.; SWANSTON, I.A. and McNEILLY, A.S.** (1981): Folliculogenesis. In Reproduction in Domestic Animals. (CUPPS, P.T.). 4<sup>a</sup> ed. Eds. Academic Press, Inc. San Diego, California. pp: 119-171.

**BAIRD, D.T.; RALPH, M.M.; SEAMARK, R.F.; AMATO, F. and BINDON, B.M.** (1982): Preovulatory follicular activity and oestrogen secretion of high (Booroola) and low fertility Merino ewes. *Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol.*, 8: 83. abstr. (cit. Webb *et al.*, 1989).

BARANAO, J.L.S. and HAMMOND, J.M. (1984b): Serum-free medium enhances growth and differentiation of culture pig granulosa cells. *Endocrinology*, 116: 51-58.

BARIL, G.; CHEMINEAU, P.; COGNIE, Y.; GUERIN, Y.; LEBOEUF, B.; ORGEUR, P. and VALLET, J.C. (1993): Caractéristiques de reproduction des ovins et des caprins. In Manuel de formation pour l'insemination artificielle chez les ovins et les caprins. Ed. FAO., pp. 7-62.

BATISTA, M.; GONZÁLEZ, F.; RODRIGUEZ, F. y GRACIA, A. (1993): Calidad de la población folicular en ovarios caprinos (Agrupación Caprina Canaria). *ITEA*, vol. extra, 12: 331-333.

BEARD, A.P.; HUNTER, M.G. and LAMMING, G.E. (1994a): Quantitative control of oxytocin-induced PGF-2 $\alpha$  release by progesterone and oestradiol in ewes. *J. Reprod. Fert.*, 100: 145-150.

BEARD, A.P. and LAMMING, G.E. (1994b): Oestradiol concentration and the development of uterine oxytocin receptor and oxytocin-induced PGF-2 $\alpha$  release in ewes. *J. Reprod. Fert.*, 100: 469-475.

BECKERS, J.F.; BALLMAN, P.; ECTORS, F. and DERIVAUX, J. (1975): Le dosage radio-immunologique de la progestérone plasmatique chez la vache. *C.R. Acad. Sc. Paris*, t. 280, Série D: 335-338.

BETTERIDGE, K.J. (1981): An historical look at embryo transfer. *J. Reprod. Fert.*, 62: 1-13.

BINDON, B.M.; BLANC, M.R.; PELLETIER, J.; TERQUI, M. and THIMONIER, J. (1979): Periovarian gonadotrophin and ovarian steroid patterns in sheep of breeds with differing fecundity. *J. Reprod. Fert.*, 55: 15-25.

BINDON, B.M. and PIPER, L.R. (1986): The reproductive biology of prolific sheep breeds. *Oxford Rev. Reprod. Biol.*, 8: 414-451 (cit. Webb *et al.*, 1989).

BISTER, J.L. and PAQUAY, R. (1983): Fluctuations in the plasma levels of the follicle-stimulating hormone during oestrus cycle, anestrus, gestation and lactation in the ewe: evidence for an endogenous rhythm of FSH release. *Theriogenology*, 19: 565-583.

BLAND, K.P. and JUBILAN, B.M. (1987): Correlation of flehmen by male sheep with female behaviour and oestrus. *Anim. Behav.*, 35: 735-738.

BLISSITT, M.J.; BLAND, K.P. and COTTRELL, D.F. (1994): Detection of oestrous-related odour in ewe urine by rams. *J. Reprod. Fert.*, 101: 189-191.

- BOLY, H.; MAGAGI, L.; KONATE, T.; VIGUIER-MARTINEZ, M.C. and YENIKOYE, A.** (1992): Oestrous cycle and follicle growth in Djallonke ewes of the Moshi variety. *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, 45: 335-340 (Abstract).
- BOULTON, M.I.; NAYUDU, P.L.; HALEY, C.S. and WEBB, R.** (1992): The *in vitro* effect of FSH on the growth and oestradiol production of ovarian follicles from Scottish Blackface ewes, with and without the Booroola gene. 12 th International Congress on Animal Reproduction. Congress Proceedings, 1: 190-192.
- BRAND, A. and DE JONG, W.H.R.** (1973): Qualitative and quantitative micromorphological investigations of the tertiary follicle population during the oestrus cycle in the sheep. *J. Reprod. Fert.*, 33: 431-439.
- BROWN, B.W. and DRIANCOURT, M.A.** (1989): Blood flow in the ovaries and ovarian follicles of Romanov and Prealpes-du-Sud ewe. *J. Reprod. Fert.*, 85: 317-323.
- CAHILL, L.P.; MARIANA, J.C. and MAULÉON, P.** (1979): Total ovarian follicular populations in ewes of high and low ovulation rates. *J. Reprod. Fert.*, 55: 27-36.
- CAHILL, L.P. and MAULÉON, P.** (1980): Influence of season cycle and breed on follicular growth rates in sheep. *J. Reprod. Fert.*, 58: 321-328.
- CAHILL, L.P.** (1981): Folliculogenesis in the sheep as influenced by breed, season and oestrus cycle. *J. Reprod. Fert., Suppl.*, 30: 135-142.
- CAHILL, L.P.; SAUMANDE, J.; RAVAUT, J.P.; BLANC, M.; THIMONIER, J.; MARIANA, J.C. and MAULÉON, P.** (1981): Hormonal and follicular relationships in ewes of high and low ovulation rates. *J. Reprod. Fert.*, 62: 141-150.
- CAHILL, L.P.; DRIANCOURT, M.A.; CHAMLEY, W.A. and FINDLAY, J.K.** (1985): Role of intrafollicular regulators and FSH in growth and development of large antral follicles in sheep. *J. Reprod. Fert.*, 75: 599-607.
- CAMPBELL, B.K.** (1988): Factors affecting ovulation rate in sheep and cattle. Ph.D. thesis. University of Synney (cit. Campbell *et al.*, 1991).
- CAMPBELL, B.K.; McNEILLY, A.S.; PICTON, H.M. and BAIRD, D.T.** (1990a): The effect of a potent GnRH antagonist on ovarian secretion of estradiol, inhibin and androstenedione and the concentration of LH and FSH during the follicular phase of the sheep oestrous cycle. *J. Endocr.*, 126: 377-384.

- CAMPBELL, B.K.; McNEILLY, A.S.; MANN, G.E. and BAIRD, D.T. (1991):** The effect of estrous cycle and follicular maturation on ovarian inhibin production in sheep. *Biol. Reprod.*, 3, 843-890.
- CARLES, A.B. and KIPNGENO, A.K. (1986):** The effect of season and the introduction of rams on oestrous activity in Somali, Nandi, Merino, Karakul and New Zealand Romney Marsh ewes in Kenya. *Anim. Prod.*, 43: 447-457.
- CARSON, R.S.; FINDLAY, J.K.; BURGER, H.G. and TROUNSON, A.O. (1979):** Gonadotropin receptors of the ovine ovarian follicle during follicular growth and atresia. *Biol. Reprod.*, 21: 75-87.
- CARSON, R.S.; FINDLAY, J.K.; CLARKE, I.J. and BURGER, H.G. (1981):** Estradiol, testosterone and androstendione in ovine follicular fluid during growth and atresia of ovarian follicles. *Biol. Reprod.*, 24: 105-113.
- CARSON, R.S.; ZHANG, Z.; HUTCHINSON, L.A.; HERINGTON, A.C. and FINDLAY, J.K. (1989):** Growth factors in ovarian function. *J. Reprod. Fert.*, 85: 735-746.
- CASTONGUAY, F.; DUFOUR, J.J.; MINVIELLE, F. and ESTRADA, R. (1990):** Follicular dynamics and dominance in Booroola x Finnish Landrace and Booroola x Suffolk ewes heterozygous for the F gene. *J. Reprod. Fert.*, 89: 193-203.
- CLARKE, I.J.; THOMAS, G.B.; YAO, B. and CUMMINS, J.T. (1987):** GnRH secretion throughout the ovine estrous cycle. *Neuroendocrinology*, 46: 82-88.
- CLAVIJO, J.J. (1990):** Ganado caprino en la región Canaria. *Canarias Agraria y Pesquera*, 10: 13-16.
- CRAN, D.G.; OSBORN, J.C. and RUSHTON, D. (1983):** Folliculogenesis. In *Reproduction in Domestic Animals*. (CUPPS, P.T.). 4<sup>a</sup> ed. Eds. Academic Press, Inc. San Diego, California. pp: 119-171.
- DAVIES, M.C. and BECK, F.G. (1993):** A comparasion of plasma prolactin, LH and progesterone concentrations during oestrus and early pregnancy in ewe lambs and ewes. *Anim. Prod.*, 57: 281-286.
- DOWNING, J.A. and SCARAMUZZI, R.J. (1991):** Nutrient effects on ovulation rate, ovarian function and the secretion of gonadotrophic and metabolic hormones in sheep. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 43: 209-227.
- DRIANCOURT, M.A. and CAHILL, L.P. (1984):** Preovulatory follicular events in sheep. *J. Reprod. Fert.*, 71: 205-211.

**DRIANCOURT, M.A.; CAHILL, L.P. and BINDON, B.M. (1985):** Ovarian follicular populations and preovulatory enlargement in Booroola and control Merino ewes. *J. Reprod. Fert.*, 73: 93-107 (cit. Webb *et al.*, 1989).

**DRIANCOURT, M.A.; GAULD, I.K.; TERQUI, M. and WEBB, R. (1986):** Variations in patterns of follicle development in prolific breeds of sheep. *J. Reprod. Fert.*, 78: 565-575. (cit Webb *et al.*, 1989).

**DRIANCOURT, M.A. (1987):** Follicular dynamics and intraovarian control of follicular development in the ewe. In Follicular growth and ovulation rate in farm animals. Ed. Martinus Nishoff Publishers. Bruselas-Luxembourg. pp: 87-105.

**DRIANCOURT, M.A.; FRY, R.C.; CLARKE, L.I. and CAHILL, L.P. (1987):** Follicular growth and regression during the 8 days after hypophysectomy in sheep. *J. Reprod. Fert.*, 79: 635-641.

**DRIANCOURT, M.A. and FRY, R.C. (1988):** Differentiation of ovulatory follicles in sheep. *J. Anim. Sci.*, 66. Suppl. 2.

**DRIANCOURT, M.A. and FRY, R.C. (1988):** Mechanisms involved in the control of the differentiation of the ovulatory follicle in sheep. *J. Reprod. Fert., Abstr. Ser. 3*. Abstr. 54.

**DRIANCOURT, M.A.; PHILIPON, P.; LOCATELLI, A.; JACQUES, E. and WEBB, R. (1988):** Are differences in FSH concentrations involved in the control of ovulation rate in Romanov and Ile-de-France ewes?. *J. Reprod. Fert.*, 83: 509-516.

**DRIANCOURT, M.A.; CASTONGUAY, F; BINDON, B.M.; PIPER, L.R.; QUIRKE, J.F. and HANRAHAN, J.P. (1990):** Ovarian follicular dynamics in lines of sheep (Finn, Merinos) selected on ovulation rate. *J. Anim. Sci.*, 68: 2034-2041.

**DRIANCOURT, M.A. (1991):** Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology.*, 35: 55-79.

**DRIANCOURT, M.A. and HANRAHAN, J.P. (1991):** Alterations in follicular maturation produced by selection on ovulation rate in Romanov and Ile-de-France ewes?. *J. Reprod. Fert.*, 83: 509-516.

**DRIANCOURT, M.A.; WEBB, R. and FRY, R.C. (1991):** Does follicular dominance occur in ewes?. *J. Reprod. Fert.*, 93: 63-70.

**DUFOUR, J.; CAHILL, L.P. and MAULÉON, P. (1979):** Short and long-term effects of hypophysectomy and unilateral ovariectomy on ovarian follicular populations in sheep. *J. Reprod. Fert.*, 57: 301-309.

ECHTERNKAMP, S.E.; SPICER, L.J., GREGORY, K.E.; CANNING, S.F. and HAMMOND, J.M. (1990): Concentrations of Insulin like Growth Factor 1 in blood and ovarian follicular fluid of cattle selected for twins. *Biol. Reprod.*, 43: 8-14.

ELDON, J. (1994): Time of onset and potential length of the breeding season of Icelandic sheep: luteal activity. *Ani. Reprod. Sci.*, 34: 101-109.

ENGLAND, B.G.; WEBB, R. and DAHMER, M.K. (1981): Follicular steroidogenesis and gonadotrophin binding to ovine follicles during the estrous cycle. *Endocrinology*, 109: 881-887.

ESPINOSA, E. (1970): La dotación folicular primordial en ovinos. *Ann. Fac. Vet. Zaragoza*. Año V, nº 5: 437-453.

FADDY, M.J.; JONES, E.C. and EDWARDS, R.G. (1976): Folliculogenesis. In Reproduction in Domestic Animals. (CUPPS, P.T.). 4ª ed. Eds. Academic Press, Inc. San Diego, California. pp: 119-171.

FARID, A. and MAKARECHIAN, M. (1987): Onset of estrus and length of estrous cycle during breeding season in five breeds of fat-tailed sheep. *World Rev. Anim. Prod.*, vol. 23, nº 2.

FINDLAY, J.K.; HUTCHINSON, L.A. and RISBRIDGER, G.P. (1987): Intraovarian regulation by inhibin-related peptides. In Inhibin-non-steroidal regulation of follicle stimulating hormone secretion. Sero Symposia Publications, Vol. 42. Editors: H.G. BURGER; D.M. DE KRETZER; J.K. FINDLAY and M. IGARASHI. Raven Press, New York. pp. 299-312.

FINDLAY, J.K. and CUMMING, I.A. (1977): The effect of unilateral ovariectomy on plasma gonadotropin levels, estrus and ovulation rate in sheep. *Biol. Reprod.*, 17: 178-183.

FLETCHER, I.C. and LINDSAY, D.R. (1971): Effect of ram on the duration of oestrous behavior in ewes. *J. Reprod. Fert.*, 25: 253-259.

FLINT, A.P. and SHELDRIK, E.L. (1983): Evidence for a systemic role for ovarian oxytocin in luteal regression in sheep. *J. Reprod. Fert.*, 67: 215-225.

FORCADA, F.; ABECIA, J.A. and SIERRA, I. (1992): Seasonal changes in oestrus activity and ovulation rate in Rasa Aragonesa ewes maintained at two different body condition levels. *Small Rum. Res.*, 8: 313-324.

FORTUNE J.E.; SIROIS, J.; TURZILLO, A.M. and LAVOIR, M. (1991): Follicle selection in domestic ruminants. *J. Reprod. Fert.*, 43: 187-198.

FRASER, H.M. and MCNEILLY, A.S. (1982): Effect of immunoneutralization of luteinizing hormone releasing hormone on the estrogen-induced luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone surges in the ewe. *Biol. Reprod.* 3: 548-555

FRY, R.C.; CLARK, I.J. and CAHILL, L.P. (1987): Changes in gonadotrophin concentrations are not necessarily involved in ovarian compensation after unilateral ovariectomy in sheep. *J. Reprod. Fert.*, 17: 178-183.

GINTHER, O.J.; KNOFF, L. and KASTELIC, L.P. (1989): Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrus with two and three follicular waves. *J. Reprod. Fert.*, 87: 223-230.

GONZÁLEZ, A.; MURPHY, B.D.; FOOTE, W.C. and ORTEGA, E. (1992): Circannual estrous variations and ovulation rate in Pelibuey ewes. *Small Rum. Res.*, 8: 225-232.

GOODMAN, R.L. (1988): Neuroendocrine control of the ovine estrous cycle. In: The Physiology of Reproduction. Vol. 2 (Knobil and Neil). Ed. Raven Press, New York. pp: 1929-1969.

GOSPODAROWICZ, D.; ILL, C.R. and BIRDWELL, C.R. (1977): Effects of fibroblast and epidermal growth factors on ovarian cell proliferation *in vitro*. I. Characterization of the response of granulosa cells to FGF and EGF. *Endocrinology*, 100: 1108.

HAMMOND, J.M. and ENGLISH, H.F. (1987): Folliculogenesis. In Reproduction in Domestic Animals. (CUPPS, P.T.). 4<sup>a</sup> ed. Eds. Academic Press, Inc. San Diego, California. pp: 119-171.

HARE, L. and BRYANT, M.J. (1982): Characteristics of oestrous cycles and plasma progesterone profiles of young female sheep during their first breeding season. *Anim. Prod.*, 35: 1-7.

HARESIGN, W. (1981): The influence of nutrition on reproduction in the ewe. 1. Effects on ovulation rate, follicle development and luteinizing hormone release. *Anim. Prod.*, 32: 197-202.

HENDERSON, K.M.; KIEBOOM, L.E.; McNATTY, K.P.; LUN, S. and HEATH, D. (1985): Gonadotrophin-stimulated cyclic AMP production by granulosa cells from Booroola x Romney ewes with and without a fecundity gene. *J. Reprod. Fert.*, 75: 111-120.

HENDERSON, K.M.; McNATTY, K.P.; SMITH, P.; GIBB, M.; O'KEEFE, I.E.; LUN, S.; HEATH, D.A. and PRISK, M.D. (1987): Influence of follicular health on the steroidogenic and morphological characteristics of bovine granulosa cells *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 79: 185-193.

HENDERSON, K.M.; SAVAGE, L.C.; ELLEN, R.L.; BALL, K. and McNATTY, K.P. (1988): Consequences of increasing or decreasing plasma FSH concentrations during the preovulatory period in Romney ewes. *J. Reprod. Fert.*, 84: 187-196.

HERNÁNDEZ, E.R.; TWARDZIK, D.R.; PURCHIO, A. and ADASHI, E.Y. (1987): Gonadotropin-dependent ovarian transforming growth factor- $\beta$  gene expression. *Biol. Reprod.*, 36 (Suppl 58), Abstr. 35.

HIRSHFIELD, A.N. (1989): Rescue of atretic follicles *in vitro* and *in vivo*. *Biol. Reprod.*, 40: 181-190.

HOOLEY, R.D.; BAXTER, R.W.; CHAMLEY, W.A.; CUMMING, I.A.; JONAS, H.A. and FINDLAY, J.D. (1974): FSH and LH response to gonadotrophin-releasing hormone during the ovine estrous cycle and following progesterone administration. *Endocrinology*, 95: 937-942.

HSU, C.J. and HAMMOND, J.M. (1987): Gonadotropins and estradiol stimulate immunoreactive insulin like growth factor 1 production by porcine granulosa cells *in vitro*. *Endocrinology*, 120: 198-207.

HSUECH, A.J.W.; ADASHI, E.Y. ; JONES, P.B.C. and WELSH, T.H. (1984): Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocrine Reviews*, 5: 76-127.

HUNTER, M.G.; HINDLE, J.E.; McLEOD, B.J and McNEILLY, A.C. (1988): Treatment with bovine follicular fluid suppresses follicular development in gonadotrophin-releasing hormone-treated anoestrus ewes. *J. Reprod. Fert.*, 119: 95-100.

IRELAND, J.J. and ROCHE, J.F. (1982): Development of antral follicles in cattle after prostaglandin-induced luteolysis: changes in serum hormones, steroids in follicular fluid and gonadotropin receptors. *Endocrinology*, 111: 2077-2086.

IRELAND, J.J. (1987): Control of follicular growth and development. *J. Reprod. Fert.*, Suppl. 34: 39-54.

KARSCH, F.J.; FOSTER, D.L.; BITTMAN, E.L. and GOODMAN, R.L. (1983): A role for estradiol in enhancing luteinizing hormone pulse frequency during the follicular phase of the estrous cycle of sheep. *Endocrinology*, 113: 1333-1339.

KASSEM, R.; OWEN, J.B. and FADEL, I. (1990): A note of the characteristics of oestrus and ovulation in Awassi ewes. *Anim. Prod.*, 50: 198-201.

- KNECHT, M. and CATT, K.J. (1983b): Modulation of cAMP-mediated differentiation in ovarian granulosa cells by epidermal growth factor and platelet-derived growth factor. *J. Biol. Chem.*, 258: 2789-2794.
- KNECHT, M; FENG, P. and CATT, K.J. (1986): Transforming growth factor-beta regulates the expression of luteinizing hormone receptors in ovarians granulosa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 139: 800-807.
- KRUIP, T.A.M. and DIELEMAN, S.J. (1985): Steroid hormone concentrations in the fluid of bovine follicles relative to size, quality and stage of the oestrous cycle. *Theriogenology*, 24: 395-408
- LAHLOU-KASSI, A. and MARIANA, J.C. (1984): Ovarian follicular growth during the oestrous cycle in two breeds of different ovulation rate, the D'Man and the Timahdite. *J. Reprod. Fert.*, 72: 301-310.
- LAHLOU-KASSI, A.; SCHAMS, D. and GLATZEL, P. (1984): Plasma gonadotrophin concentrations during the oestrous cycle and after ovariectomy in two breeds of sheep with low and high fecundity. *J. Reprod. Fert.*, 70: 165-173.
- LAHLOU-KASSI, A. and MARIE, M. (1985): Sexual and ovarian function of the D'Man ewe. In *Genetics of Reproduction in Sheep*. Eds. R.B. Land & D.W. Robinson. London. pp. 245-260
- LE CANARIEN (1980): Crónicas francesas de la Conquista de Canarias (A. Cioranescu). Aula de Cultura de Tenerife.
- LEE, C.Y. (1976): Folliculogenesis. In *Reproduction in Domestic Animals*. (CUPPS, P.T.) 4<sup>a</sup> ed. Eds. Academic Press, Inc. San Diego, California. pp: 119-171.
- LEGAN, S.J.; GOODMAN, R.L.; RYAN, K.D.; FOSTER, D.L. and KARSCH, F.J. (1985): Can the transition into anoestrus in the ewe be accounted for solely by insufficient tonic LH secretion? *J. Endocrinol.*, 106: 55-60.
- LOFTSSON, E. and DYRMUNDSSON, O. (1990): Duration of oestrus in Icelandic ewes and ewe lambs. *Búvísindi*, 4: 71-76.
- MANN, G.E.; McNEILLY, A.S. and BAIRD, D.T. (1992a): Hormone production *in vitro* and *in vivo* from follicles at different stages of the estrous cycle in the sheep. *J. Endocr.*, 132: 225-234.
- MANN, G.E.; CAMPBELL, B.K.; McNEILLY, A.S. and BAIRD, D.T. (1992b): The role of inhibin and oestradiol in the control of FSH secretion in the sheep. *J. Endocr.*, 133: 381-391.

- MARIANA, J.C. and DE POL, J. (1986): Folliculogenesis. In Reproduction in Domestic Animals. (CUPPS, P.T.) 4<sup>a</sup> ed. Eds. Academic Press, Inc. San Diego, California. pp: 119-171.
- MARIANA, J.C.; MONNIAUX, D.; DRIANCOURT, M.A. and MAULÉON, P. (1991): Folliculogenesis. In Reproduction in Domestic Animals. (CUPPS, P.T.) 4<sup>a</sup> ed. Eds. Academic Press, Inc. San Diego, California. pp: 119-171.
- MARTIN, G.B. and THOMAS, G.B. (1985): Neuroendocrine control of the ovine estrous cycle. In: The Physiology of Reproduction (Knobil & Neil). 1<sup>a</sup> Ed. Raven Press Ltd., New York. pp. 1929-1969.
- MARTIN, G.B.; THOMAS, G.B.; TERQUI, M. and WARNER, P. (1987): Pulsatile LH secretion during the preovulatory surge in the ewe: experimental observations and theoretical considerations. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, 27: 1023-1040.
- MARTIN, G.B. and SCARAMUZZI, R.J. (1988): The induction of oestrus and ovulation in seasonally anovular ewes by exposure to rams. *J. Steroid. Biochem.*, 19: 869-875.
- MAULÉON, P. (1961): IVth International Congress of Animal Reproduction, (The Hague, pp. 348-354).
- MAULÉON, P. and MARIANA, J.C. (1977): Oogenesis and folliculogenesis. In: Reproduction in Domestic Animals. 3ed. Eds. H.H. Cole & P.T. Cupps. Academic Press. New York: 175-202.
- MECO, J. (1992): Los ovicaprinus paleocanarios de Villaverde. Diseño paleontológico y marco paleoambiental. Dirección General del Patrimonio Histórico. Gobierno de Canarias. Santa Cruz de Tenerife.
- McLEOD, B.J.; HARESIGN, W. and LAMMING, G.E. (1982a): The induction of ovulation and seasonally anoestrous ewes treated with small-dose multiple injections of GnRH. *J. Reprod. Fert.*, 65: 215-221.
- McLEOD, B.J. and McNEILLY, A.S. (1987): Suppression of plasma FSH concentrations and bovine follicular fluid blocks ovulation in GnRH-treated seasonally anoestrous ewes. *J. Reprod. Fert.*, 81: 187-194 (cit. McNeilly *et al.*, 1991).
- McNATTY, K.P. (1981): Hormonal correlates of follicular development in the human ovary. *Aust. J. biol. Sci.*, 34: 249-268. (cit. MONNIAUX, 1987).
- McNATTY, K.P.; GIBB, M.; DOBSON, C.; THURLEY, D.C. and FINDLAY, K. (1981): Changes in the concentrations of gonadotropic and steroidal hormones in the antral

fluid of ovarian follicles throughout the oestrous cycle of the sheep. *Aust. J. biol. Sci.*, 34: 67-80.

McNATTY, K.P. (1982): In Follicular Maturation and Ovulation (Rolland, Van Hall, Hillier, McNatty and Shoemaker). Eds. Excerpta Médica, Amsterdam. pp. 1-18

McNATTY, K.P.; GIBB, M.; DOBSON, C., BALL, K.; COSTER, J.; HEATH, D. and THURLEY, D.C. (1982): Preovulatory follicular development in sheep treated with PMSG and or prostaglandin. *J. Reprod. Fert.*, 65: 111-123.

McNATTY, K.P.; HUDSON, N.; GIBB, M.; BALL, K.; FANNIN, J.; KIEBOOM, L. and THURLEY, D.C. (1984a): Effects of long-term treatment with LH on induction of cyclic ovarian activity in seasonally anoestrous ewes. *J. Endocr.*, 100: 67-73.

McNATTY, K.P.; HENDERSON, K.M.; LUN, S.; HEATH, D.A.; BALL, K.; HUDSON, N.L.; FANNIN, J.; GIBB, M.; KIEBOOM, L.E. and SMITH, P. (1985a): Ovarian activity in Booroola x Romney ewes which have a major gene influencing their ovulation rate. *J. Reprod. Fert.*, 73: 109-205. (cit. Webb *et al.*, 1989).

McNATTY, K.P.; HUDSON, N.; GIBB, M.; BALL, K.; HENDERSON, K.M.; HEATH, D.A., LUN, S. and KIEBOOM, L.E. (1985b): FSH influences follicle viability, oestradiol biosynthesis and ovulation rate in Romney ewes. *J. Reprod. Fert.*, 75: 121-131.

McNATTY, K.P.; LUN, S.; HEATH, D.A.; BALL, K.; SMITH, P.; HUDSON, N.L.; McDIARMID, J.; GIBB, M. and HENDERSON, K.M. (1986a): Differences in ovarian activity between Booroola x Merino ewes which were homozygous, heterozygous and non-carriers of a major gene influencing their ovulation rate. *J. Reprod. Fert.*, 77: 193-205.

McNATTY, K.P.; LUN, S.; HEATH, D.A.; BALL, K.; SMITH, P.; HUDSON, N.L.; McDIARMID, J.; GIBB, M. and HENDERSON, K.M. (1986b): Ovarian activity in Booroola by Merino ewes which have homozygous, heterozygous and non carriers of major gene influencing their ovulation rate. *J. Reprod. Fert.*, 77: 193-205.

McNATTY, K.P.; FISHER, M.; COLLINS, F., HUDSON, N.L.; HEATH, D.A.; BALL, K. and HENDERSON, K.M. (1989a): Differences in the plasma concentrations of FSH and LH in ovariectomized Booroola FF and ++ ewes. *J. Reprod. Fert.*, 85: 705-713.

McNATTY, K.P.; HEATH, D.A.; HUDSON, N. and CLARKE, I.J. (1990): Effect of long-term hypophysectomy on ovarian follicle populations and gonadotrophin-induced adenosine cyclic 3', 5' monophosphate output by follicles from Booroola ewes with or without the F gene. *J. Reprod. Fert.*, 90: 515-522

- McNEILLY, A.S. and LAND, R.B. (1979): Effect of suppression of plasma prolactin on ovulation, plasma gonadotrophins and corpus luteum function in LHRH-treated anoestrous ewes. *J. Reprod. Fert.*, 56: 601-609.
- McNEILLY, A.S.; O'CONNELL, M. and BAIRD, D.T. (1982): Induction of ovulation and normal luteal function by pulsed injections of luteinizing hormone in anoestrous ewes. *Endocrinology*, 110: 1292-1299 (cit McNeilly *et al.*, 1991).
- McNEILLY, A.S.; FRASER, H.M. and BAIRD, D.T. (1984b): Effects of immunoneutralization of LH releasing hormone on LH, FSH and ovarian steroid secretion in the preovulatory phase of the oestrous cycle in the ewe. *J. Endocrinol.*, 101: 213-219.
- McNEILLY, A.S.; WALLACE, J.M. and BAIRD, D.T. (1985b): Induction of ovulation in anoestrous ewes using gonadotrophins. In Endocrine Causes of Lactational Anoestrus in Farm Animals. Eds. F. Elendorff & F. Elsaesser. Martinus Nijhoff Publishers, The Hague. pp. 66-76. (cit McNeilly *et al.*, 1991).
- McNEILLY, A.S.; JONASSEN, J.A., and FRASER, H.M. (1986): Suppression of follicular development after chronic LhRH immunoneutralization in the ewe. *J. Reprod. Fert.*, 76: 481-490.
- McNEILLY, A.S. and FRASER, H.M. (1987): Effect of GnRH agonist-induced suppression of LH and FSH on follicle growth and corpus luteum function in the ewe. *J. Endocr.*, 115: 273-282.
- McNEILLY, A.S.; JONASSEN, J.A. and RHIND, S.M. (1987): Reduced ovarian follicular development as a consequence of low body condition in ewes. *Acta endocr. Copenh.*, 115: 75-83.
- McNEILLY, A.S.; PICTON, H.M.; CAMPBELL, B.K. and BAIRD, D.T. (1991): Gonadotrophic control of follicle growth in the ewe. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 43: 177-186
- McNEILLY, A.S.; CROW, W.; BROOKS, J. and EVANS, G. (1992): Luteinizing hormone pulses follicle stimulating hormone and control of follicle selection in sheep. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 45: 5-19 (cit. Ravindra *et al.*, 1994).
- MONGET, P.; MONNIAUX, D. and DURAND, P. (1989): Localization, characterization and quantification of insulin-like growth factor-I-binding sites in the ewe ovary. *Endocrinology*, 125: 2486-2493.
- MONNIAUX, D., CHUPIN, D. and SAUMANDE, J. (1983): Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology*, 19: 55-86.

- MONNIAUX, D.** (1987a): Short-term effects of FSH *in vitro* on granulosa cells of ovine granulosa cells by Insulin-like growth Factor-I and Follicle-Stimulating Hormone *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 46: 109-119.
- MONNIAUX, D.** (1987b): Short-term effects of FSH *in vitro* on granulosa cells of individual sheep follicles. *J. Reprod. Fert.*, 79: 505-515.
- MONNIAUX, D. and PISSELET, C.** (1992): Control of proliferation and differentiation of ovine granulosa cells by Insulin-like Growth Factor and Follicle-stimulating hormone *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 46: 109-119
- MOOR, R.M.** (1977): Sites of steroid production in Ovine Graafian Follicles in culture. *J. Endocr.*, 73: 143-150 (cit. Monniaux, 1987).
- MOOR, R.M.; HAY, M.F.; DOTT, H.M. and CRAN, D.G.** (1978): Microscopic identification and steroidogenic function of atretic follicles in sheep *J. Endocr.*, 77: 309-318.
- MOOR, R.M.; POLGE, C. and WILLADSEN, S.M.** (1980b): Folliculogenesis. In Reproduction in Domestic Animals. (CUPPS, P.T.) 4<sup>a</sup> ed. Eds. Academic Press, Inc. San Diego, California. pp: 119-171.
- MOORE, L.G.; CHOY, V.J.; ELLIOT, R.L. and WATKINS, W.R.** (1986): Evidence for the pulsatile release of PGF-2 $\alpha$  inducing the release of ovarian oxytocin during luteolysis in the ewe. *J. Reprod. Fert.*, 76: 159-166.
- MORI, T.; FUKUOKA, M.; YASUDA, K.; TAKAKURA, K.; IWAI, T. and TAI, S.** (1989): Modulation of porcine granulosa cell functions by interleukin 1. *Steroids.*, 54: 543-552.
- MUKASA-MUGERWA, E. and TEKELYE, B.** (1988): The reproductive performance of Ethiopian Highland sheep. *Anim. Reprod. Sci.*, 17: 95-102.
- MUKASA-MUGERWA, E.; ZERE EZAZ and VIVIANI, P.** (1990): Plasma concentrations of progesterone during oestrous cycles of Ethiopian Menz sheep using enzyme immunoassay. *Small Rumin. Res.* 3: 57-62.
- NARAYANASWAMY, M. and BALAINE, D.S.** (1976): A note on the oestrus cycle in Bannur sheep. *Indian Veterinary Journal*, 53: 235-236. Abstr.
- NICOSIA, S.V.** (1980): In Endocrine Physiopathology of the Ovary. (R.I. Tozzini; G. Reeves and R.L. Pineda). Eds. Elsevier Biomedical Press, New York. pp. 43-62.
- NOEL, B.; BISTER, J.L. and PAQUAY, R.** (1993): Ovarian follicular dynamics in Suffolk ewes at different periods of the year. *J. Reprod. Fert.*, 99: 695-700.

NOEL, B.; BISTER, J.L.; PIERQUIN, B. and PAQUAY, R. (1994): Effects of FGA and PMSG on follicular growth and LH secretion in Suffolk ewes. *J. Reprod. Fert.*, 41: 719-727.

OTT, T.L.; ZHOU, Y.; MIRANDO, M.A.; STEVENS, C.; HARNEY, J.P.; OGLE, T.F. and BAZER, F.W. (1993): Changes in progesterone and oestrogen receptor mRNA and protein during maternal recognition of pregnancy and luteolysis in ewes. *J. Mol. Endoc.*, 10: 171-183.

OTTOBRE, J.S.; LEWIS, G.S.; THAYNE, W.V. and INSKEEP, E.K. (1980): Mechanism by which progesterone shortens the estrous cycle of the ewe. *Biol. Reprod.*, 23: 1046-1053.

OYEDIPE, E.O.; PATHIRAJA, N.; EDQUIST, L.E. and BUVANENDRAN, V. (1986): Onset of puberty and estrous cycle phenomena in Yankasa ewes as monitored by plasma progesterone concentrations. *Anim. Reprod. Sci.*, 12: 195-199.

OYEDIPE, E.O.; PATHIRAJA, N.; GYANG, E.O. and EDQUIST, L.E. (1989): Effect of pregnant mare serum gonadotrophin on estrus parameters, ovulation rate and peripheral progesterone concentrations in Yankasa ewes. *Anim. Reprod. Sci.*, 20: 255-264.

PANT, H.C. (1977): Effect of oestradiol infusion on plasma gonadotrophins and ovarian activity in progesterone-primed and unprimed anoestrous ewes. *J. Endocrinol.*, 75: 227-233.

PARSONS, S.D. and HUNTER, G.L. (1967): Effect of the ram on the duration of oestrus in the ewe. *J. Reprod. Fert.*, 14: 61-70 (cit. In *The Physiology of Reproduction*. Eds. Knobil & Neil, Raven Press, New York. pp. 1929-1969).

PEDERSEN, T. (1970): Folliculogenesis. In *Reproduction in Domestic Animals*. (CUPPS, P.T.) 4<sup>a</sup> ed. Eds. *Academic Press, Inc.* San Diego, California. pp: 119-171.

PELUSO, J.J. and STEGER, R.W. (1978): Role of FSH in regulating granulosa cell division and follicular atresia in rats. *J. Reprod. Fert.*, 54: 275-278 (cit. Monniaux and Pisselet, 1992).

PICTON, H.M. and McNEILLY, A.S. (1991): Evidence to support a follicle-stimulating hormone threshold theory for follicle selection in ewes chronically treated with gonadotrophin-releasing hormone agonist. *J. Reprod. Fert.*, 93: 43-51.

QUIRKE, J.F.; HANRAHAN, J.P. and GOSLING, J.P. (1981): Duration of oestrus, ovulation rate, time of ovulation and plasma LH, total oestrogen and progesterone in Galway adult ewes and ewe lambs. *J. Reprod. Fert.*, 51: 265-272.

QUIRKE, J.F.; STABENFELDT, G.H. and BRADFORD, G.E. (1988): Year and season effects on oestrus and ovarian activity in ewes of different breeds and crosses. *Anim. Reprod. Sci.*, 16: 39-52.

RAVINDRA, J.P.; RAWLINGS, N.C.; EVANS, A.C.O. and ADAMS, G.P. (1994): Ultrasonographic study of ovarian follicular dynamics in ewes during the oestrous cycle. *J. Reprod. Fert.*, 101: 501-509.

RAWAL, C.V.S.; SINGH, R. and LUKTUKE, S.N. (1988): Oestrous interval and pattern of oestrous cycles in Muzaffarnagari sheep. *Indian Journal of Animal Sciences*, 58: 195-199.

RAWLINGS, N.C. and COOK, S.J. (1993): LH secretion around the time of the preovulatory gonadotrophin surge in the ewe. *Anim. Reprod. Sci.*, 30: 289-299.

REDDY, K.P.; RAO, P.N.; REDDY, B.B. and REDDY, A.S.N. (1989): Plasma levels of progesterone in cycling and pregnant ewes. *J. Nuclear. Agric. Biol.*, 18: 239-242.

RHIND, S.M.; LESLIE, I.D.; GUNN, R.G. and DONEY, J.M. (1985): Plasma FSH, LH, prolactin and progesterone profiles of Cheviot ewes with different levels of intake before and after mating and associated effects on reproductive performance. *Anim. Reprod. Sci.*, 8: 301-313.

RHIND, S.M. and McNEILLY, A.S. (1986): Follicle populations, ovulation rate and plasma profiles of LH, FSH and prolactin in Scottish Blackface ewes in high and low body condition. *Anim. Reprod. Sci.*, 10: 105-115.

RHIND, S.M. and SCHANBACNER, B.D. (1991): Ovarian follicle populations and ovulation rates of Finnish Landrace cross ewes in different nutritional states and associated profiles of gonadotrophins, inhibin, growth hormone (GH) and Insulin-like Growth factor-I. *Domes. Ani. Endoc.*, 8: 281-291.

ROBINSON, T.J. (1959): The oestrous cycle of the ewe and doe. In Reproduction in Domestic Animals. Vol 2. Eds. H. H. Cole & P.T. Cupps. Academic Press. New York. pp. 291-333.

SAVION, N.; LUI, G.; LAHERTY, R. and GOSPODAROWICZ, D. (1981): Factors controlling proliferation and progesterone production by granulosa cells in serum free-medium. *Endocrinology*, 109: 409-420.

SCARAMUZZI, R.J. and RADFORD, H.M. (1983): Factors regulating ovulation rate in the ewe. *J. Reprod. Fert.*, 69: 353-367.

**SCHAMS, D.; PROKOPP, S. and BARTH, D.** (1983): The effect of active and pasive immunization against oxytocin on ovarian cyclicity in ewes. *Acta endocr., Copenh.* 103: 337-334 (cit. Moore *et al.*, 1986).

**SCHRICK, F.N.; SURFACE, R.A.; PRITCHARD, J.Y.; DAILEY, R.A.; TOWNSEND, E.C. and INSKEEP, E.K.** (1993): Ovarian structures during the estrous cycle and early pregnancy in ewes. *Biol. Reprod.*, 49: 1133-1140.

**SHACKELL, G.H.** (1991): The timing of oestrus, LH surge and ovulation in ewes following synchronisation with MAP sponges, FGA sponges or CIDR's. *Proc. New. Zeal. Soc. Anim. Prod.*, vol 51: 73-77.

**SIROIS, J. and FORTUNE, J.E.** (1989): Lengthening the bovine estrous cycle with low levels of P<sub>4</sub>: a model for studying ovarian follicular dominance. *Endocrinology*, 127: 916-925.

**THIBAUT, C.; SZOLLOSI, D. and GERARD, M.** (1987): Mammalian oocyte maturation. *Reprod. Nutr. Dév.*, 27: 865-896.

**THIMONIER, J. and MAULÉON, P.** (1969): Variations saisonnières du comportement d'oestrus et des activités ovarienne et hypophysaire chez les ovins. *Annls. Biol. anim. Biochim. Biophys.*, 9: 233-250 (cit. Bindon *et al.*, 1979).

**THOMAS, G.B.; OLDHAM, C.M.; HOSKINSON, R.M.; SCARAMUZZI, R.J. and MARTIN, G.B.** (1987): Effect of immunization against progesterone on oestrus, cycle length, ovulation rate, luteal regression and LH secretion in the ewe. *Aust. J. biol. Sci.*, 40: 307-313.

**TOMKINS, T. and BRYANT, M.J.** (1974): Oestrous behavior of the ewe and the influence of tretament with progestagen. *J. Reprod. Fert.*, 41: 121-132.

**TORRIANI, L.** (1978): Descripción de las Islas Canarias (A. Cioranescu). Goya ed. Santa Cruz de Tenerife.

**TSONIS, C.G.; CAHILL, L.P.; CARSON, R.S. and FINDLAY, J.K.** (1984a): Identification at the onset of luteolysis of follicles capable of ovulation in the ewe. *J. Reprod. Fert.*, 70: 609-614.

**TSONIS, C.G.; McNEILLY, A.S. and BAIRD, D.T.** (1987): Production and secretion of ovarian inhibin. In Inhibin-non-steroidal regulation of follicle stimulating hormone secretion. Serono Symposia Publications, Vol. 42. Editors: H.G. BURGER; D.M. DE kRETZER; J.K. FINDLAY and M.IGARASHI. Raven Press, New York. pp. 203-217.

- TURNBULL, K.E.; BRADEN, A.W.H. and MATTNER, P.E. (1977): The pattern of follicular growth and atresia in the ovine ovary. *Aust. J. Biol. Sci.*, 30: 229-241.
- VALLET, J.L.; LAMMING, G.E. and BATTEN, M. (1990): Control of endometrial oxytocin receptor and uterine response to oxytocin by progesterone and oestradiol in the ewe. *J. Reprod. Fert.*, 131: 625-634.
- VALLET, J.L. and LAMMING, G.E. (1991): Ovine conceptus secretory proteins and bovine recombinant interferon  $\alpha_1$ -1 decrease endometrial oxytocin receptor concentrations in cyclic and progesterone-treated ovariectomized ewes. *J. Endocr.*, 90: 625-634 (cit. Beard and Lamming, 1994).
- WALLACE, J.M. and McNEILLY, A.S. (1986): Changes in FSH and the pulsatile secretion of LH during treatment of ewes with ovine follicular fluid throughout the luteal phase of the oestrus cycle. *J. Endocr.*, 111: 317-327.
- WATHES, D.C.; DENNING KENDALL, P.A.; PERKS, C. and BROWN, D. (1992): Effects of stage of the cycle and estradiol-17 $\beta$  on oxytocin synthesis by ovine granulosa and luteal cells. *Endocrinology*, 130: 1009-1026.
- WHEELER, A.G. and LAND, R.B. (1977): Seasonal variation in oestrus ovarian activity of Finnish Landrace, Tasmanian merino and Scottish Blackface. *Anim. Prod.*, 24: 363-376.
- WAYNE, N.L.; MALPAUX, B. and KARSCH, F.J. (1989): Social cues can play a role in timing onset of the breeding season in the ewe. *J. Reprod. Fert.*, 87: 707-713.
- WEBB, R. and ENGLAND, B.G. (1982b): Relationship between LH receptor concentrations in thecal and granulosa cell and *in vivo* and *in vitro* steroid secretion by ovine follicles during the preovulatory period. *J. Reprod. Fert.*, 66: 169-180.
- WEBB, R. and GAULD, I.K. (1985b): Folliculogenesis in sheep: control of ovulation rate. In Genetics of Reproduction in the Sheep. Eds. LAND, R.B. and ROBINSON, D.W.) Butterworths. London. pp: 261-274. (cit. Webb *et al.*, 1989).
- WEBB, R.; BAXTER, G.; McBRIDE, D.; NORDBLOM, G.D. and SHAW, M.P.K. (1985): The measurement of testosterone and oestradiol-17  $\beta$  using iodinated tracers and incorporating an affinity chromatography extraction procedure. *J. Steroid. Biochem.*, 23: 1043-1051.
- WEBB, R. and GAULD, I.K. (1987): Endocrine control of follicular growth in the ewe. In Follicular Growth and Ovulation Rate in Farm Animals Eds. J.F. Roche and D. O'Callaghan. Martinus Nijhoff. The Hague. (cit Webb *et al.*, 1989).

**WEBB, R.; GAULD, I.K. and DRIANCOURT, M.A. (1989):** Morphological and functional characterization of large antral follicles in three breeds of sheep with different ovulation rates. *J. Reprod. Fert.*, 87: 243-255.

**WEBB, R.; BAXTER, G.; McBRIDE, D., RITCHIE, M. and SPRINGBETT, A.J. (1992):** Mechanism controlling ovulation rate in ewes in relation to seasonal anoestrus. *J. Reprod. Fert.*, 94: 143-151.

**XU, Z.Z.; McDONALD, M.F. and McCUTCHEON, S.N. (1989):** The effects of nutritionally-induced liveweight differences on follicular development, ovulation rate, oestrous activity and plasma follicle-stimulating hormone levels in the ewe. *Anim. Reprod. Sci.*, 19: 67-78

**YENIKOYE, A.; ANDRE, D.; RAVAVULT, J.D. and MARIANA, J.C. (1981):** Some reproductive characteristics of the Fulani ewe in Niger. *Reprod. Nutr. Dev.*, 21: 937-951.

**YENIKOYE, A.; MARIANA J.C. and CELEUX, G. (1989):** Follicular growth during the oestrous cycle in Peul sheep. *Anim. Reprod. Sci.*, 21: 201-211.

**ZARCO, L.; STABENFELDT, G.H.; BASU, S.; BRADFORD, G.E. and KINDALL, H. (1988):** Modification of prostaglandin  $F_{2\alpha}$  synthesis and release in the ewe during the initial establishment of pregnancy. *J. Reprod. Fert.*, 83: 527-536.

**ZHIWEN, Z.; CARSON, R.S.; HERINGTON, A.C.; LEE, V. and BURGER, H.G. (1987):** Folliculogenesis. In *Reproduction in Domestic Animals*. (CUPPS, P.T.) 4<sup>a</sup> ed. Eds. *Academic Press, Inc.* San Diego, California. pp: 119-171.

**ZUCKERMAN, S. (1962):** Folliculogenesis. In *Reproduction in Domestic Animals*. (CUPPS, P.T.) 4<sup>a</sup> ed. Eds. *Academic Press, Inc.* San Diego, California. pp: 119-171.