

CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS A LA IMPLANTACIÓN DEL *CONCEPTUS* OVINO BAJO CONDICIONES DE GESTACIONES NATURALES Y MÚLTIPLES INDUCIDAS

Macroscopic Characteristics of Ovine *Conceptus* Implantation under Natural and Induced Multiple Gestation

José M. Rodríguez-Márquez¹, Aureliano Hernández² y Gladys Hidalgo¹

¹Unidad de Investigaciones de Ciencias Morfológicas (UNICIM), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia. Apartado 15252, Maracaibo 4005-A, estado Zulia, Venezuela. E-mail: jmrodrim@net-uno.net.

²Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

RESUMEN

El propósito de esta investigación fue determinar las características macroscópicas del *conceptus* ovino, así como establecer el porcentaje de supervivencia de embriones a los 20, 28 y 35 días de gestaciones naturales (GN) y múltiples inducidas (GMI) en ovejas. Para lo cual se utilizaron 24 ovejas divididas en 2 grupos (G1 = GN y G2 = GMI). El G2 se sincronizó con 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP), superovuladas con 1500 UI de gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG) y 2,5 mL de NeutraPMSG. Se encontraron diferencias en la longitud de los cuernos uterinos entre los dos grupos estudiados, excepto para el día 20. En el G1 se obtuvo un promedio de 1,16 embriones/animal, con un 16% de gestaciones gemelares, sin embargo, hubo un 33,3% de ovulaciones dobles. El 100% de los embriones en el G1 se ubicaron en el sitio preferencial de nidación y fueron viables. En el G2 se obtuvieron 5 embriones/animal, de los cuales el 73,3% se ubicaron en la zona preferencial de nidación. El 63,3% de los embriones totales fueron viables de los cuales el 92,1% se ubicó en dicha zona. No hubo diferencias en el peso de los embriones viables entre los tratamientos G1 y G2. Aunque si se observaron diferencias a las tres edades de gestación evaluadas entre los embriones viables y no viables dentro del G2 ($P < 0,01$) a las 3 edades. La GMI se caracterizó por ser unicoriónica y multiamniótica, con independencia de las cavidades alantoideas y de los vasos sanguíneos, al menos hasta el día 35 de gestación. En conclusión la longitud de los cuernos es mayor bajo GMI a partir del día 28. Los embriones se ubican preferentemente en la mitad caudal del útero. El peso y longitud de los embriones puede ser utilizado como

medida válida para evaluar viabilidad embrionaria *in vivo*, mediante ultrasonografía, ya que existe una correlación ($r = 0,89$) entre el peso y longitud de los embriones.

Palabras clave: Oveja, implantación, superovulación, *conceptus*. progesterona.

ABSTRACT

The purpose of this experiment was to determine macroscopic characteristics of ovine *conceptus*, as well as to establish embryo survival percentage on day 20, 28 and 35 of natural (NG) and induced multiple (IMG) gestations in ewes. To attain that objective, 24 ewes divided in 2 groups (G1 = NG and G2 = IMG) were used. G2 was synchronized with 60 mg medroxiprogesterone acetate (MAP), superovulated with 1500 UI seric gonadotrophin of pregnant mares (PMSG) and 2.5 mL de NeutraPMSG. Significant differences were found in horn length between studied groups, except on day 20. In G1 an average of 1.16 embryos/animal with 16% of twin gestations were observed. However, there was 33.3% of double ovulation. In G1 the total embryos (100%) were located in the preferential implantation site and were viable. In G2, five embryos/animal were observed, of which 73.3% were located in the preferential implantation zone. A total of 63.3% of embryos were viable, and 92.1% of these viable embryos were located in the preferential implantation zone. There were no differences on weight between viable embryos derived from treatments G1 and G2. Instead, there were differences on size and weight between viable and non-viable derived from treatment G2 at the three studied ages. Induced multiple gestation was characterized for being unichorionic and multiamniotic, with independence of allantois cavities and blood vessels, at least up to day 35 of ges-

tation. In summary, the horn length is greater from day 28 on GMI treated ewes, ovines embryos preferentially located in the caudal half of uterus, and embryo weight and length can be used as a valid measurement to assess embryo viability *in vivo*, by ultrasonography, because there is a high correlation coefficient ($r = 0.89$) between both parameters.

Key words: Ewe, implantation, superovulation, conceptus, progesterone.

INTRODUCCIÓN

En la oveja, la implantación superficial y la placentación temprana comienzan el día 15 a 16, pero ésta no es completa hasta los días 50-60 de gestación [11, 38]. Durante este periodo, el útero crece y se remodela sustancialmente para acomodarse al rápido desarrollo y crecimiento del *conceptus* (embrión y membranas anexas), incluyendo el desarrollo placentomal en el área caruncular del endometrio y cambios en la vascularización uterina [35].

El útero de todos los mamíferos contiene glándulas endometriales que sintetizan o transportan y secretan sustancias esenciales para la sobrevivencia y desarrollo del *conceptus* [1]. En ovejas y cerdas ocurre una extensiva hiperplasia e hipertrofia de las glándulas endometriales (adenogénesis), durante la gestación, presumiblemente para proveer un incremento histotrófico a fin de soportar el desarrollo y crecimiento del *conceptus* [1, 35], dicha hipertrofia e hiperplasia ocurre principalmente durante la preñez temprana [35, 38]. Defectos en la morfogénesis de las glándulas endometriales durante el crecimiento uterino pueden causar una alta tasa de pérdidas embrionarias en el periodo peri-implantación en todos los animales domésticos [31].

La progesterona (P_4) es inequívocamente requerida para el soporte maternal del desarrollo y crecimiento del *conceptus* [33]. Durante el diestro tanto en ovejas cíclicas como en preñadas, los niveles de P_4 incrementan y actúan vía receptores de P_4 (RP) para bloquear la expresión de receptores de estrógenos y de oxitocina en el epitelio glandular superficial y epitelio endometrial [16]. Sin embargo, la continua exposición del útero a la P_4 por 8-10 días regula en baja la expresión de los RP luego del día 11 y 12 [32], sólo que dicha regulación se da únicamente en el epitelio endometrial y glandular superficial, mientras que el estroma y miometrio permanecen positivos los RP [33]. Dicha ausencia de RP es un requisito para dar inicio al desarrollo de las glándulas durante la preñez [20, 33, 37].

La mortalidad embrionaria (ME), se refiere a la pérdida del embrión entre la fertilización y el final del periodo de diferenciación [6]. Es causada por factores maternos y/o embrionarios, con la diferencia de que si los factores son maternos se afecta toda la camada, en contraste con los factores embrionarios que afectan los embriones individualmente. Se sabe que existen niveles "basales" de ME [8], los cuales son aumentados por injerencia de varios factores como los endocrinos, nu-

tricionales, el estrés térmico (calórico), la tasa de ovulación [19], anormalidades cromosómicas [17], asincronía útero-embrión [21], alteración en la producción de proteínas por parte del *conceptus* [25] y deficiencia en la vascularización de las vellosidades [3]. La ME es responsable de las mayores pérdidas prenatales teniendo una incidencia en la oveja de hasta un 36,7% [15]. Esta alta incidencia puede ocurrir durante el periodo pre-implantación dado que en éste se presenta una rápida elongación del blastocisto [19], y existe competencia intrauterina entre los embriones de la oveja [26]. La ME conlleva a considerables pérdidas económicas ya que en la mayoría de los casos pasa desapercibida si ocurre antes del reconocimiento materno de la preñez. En consecuencia el cuerpo lúteo involucre y el animal retorna al estro dentro del periodo normal de duración del ciclo estral [22].

El proceso de formación de vasos sanguíneos (angiogénesis) en el alantoides se inicia en las células mesenquimatosas del mesodermo esplácnico. El hecho de que el alantoides haga contacto con el corion en toda la extensión de éste hacia el día 23 de gestación, y que el crecimiento de la pared alantoidea exceda la velocidad de desarrollo de los vasos sanguíneos (angiogénesis) hacia las extremidades, hace que se presenten grandes áreas avasculares, trayendo como consecuencia que aparezcan áreas necróticas. Probablemente, el origen de la necrosis es una condición isquémica en las extremidades del alantocorion, como un resultado de la ausencia de vasos sanguíneos alantoideos y la falta de contacto del corion con el endometrio. En tal sentido se podría pensar que si el proceso necrótico logra envolver el embrión sería una de las causas de mortalidad embrionaria [13].

El factor de preñez temprano (FPT) medido en suero puede ser utilizado como indicador de ME temprana en bovinos [29]. Del mismo modo, la medición por radioinmunoanálisis (RIA) de la proteína B específica de preñez (PBEP) en ovejas y cabras posterior al día 26 del ciclo [14], se podría utilizar para determinar ME temprana en estas especies.

Por otro lado, en el rumiante, se ha determinado que el embrión tiene un sitio preferencial de implantación que para el caso de oveja se da entre la mitad del cuerno uterino y el cuerpo sin llegar a este último [9, 26], debido a que en este sitio hay mayor vascularización uterina [5, 28].

Algunas características de ME post-mortem en la oveja han sido previamente evaluadas. De hecho Boshier [4], inicialmente describió algunas características de la anatomía de las membranas extraembrionarias, tales como: el número de células gigantes binucleadas, número de cristaloides proteicos en las células, grado de asociación entre trofoblasto y mesodermo, número de mitosis y características del núcleo y citoplasma como indicador de ME. Por otro lado, Gaviria y Hernández [10], señalan que la tasa mitótica puede utilizarse como un indicador de viabilidad embrionaria. Recientemente Rodríguez [26] reportó que el porcentaje de células binucleadas puede ser utilizado como indicativo de sobrevivencia o mortalidad

embrionaria para el día 20 y 24 de gestación en la oveja, ya que en embriones no viables el número de células binucleadas está disminuido. Sin embargo, no se han determinado los parámetros de medidas y peso *post-mortem* de los embriones y su asociación con el porcentaje de supervivencia embrionaria.

El objetivo de este trabajo tuvo como fin determinar algunas características de tipo macroscópico que ocurren durante la implantación de embriones ovinos, así como el porcentaje de supervivencia embrionaria a los 20, 28 y 35 días de gestaciones naturales y múltiples inducidas en la oveja.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon 24 ovejas criollas, sexualmente maduras y cíclicamente sanas, las cuales se dividieron en dos grupos (TABLA I). Los animales fueron mantenidos en los corrales de experimentación del Postgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia.

Los animales fueron alimentados en pastoreo con pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*), con suministro del mismo pasto cortado y suplementados con concentrado comercial (14% de proteína) a razón de 250 g/animal/día, así como sal mineralizada y agua a voluntad.

A los animales se les hizo seguimiento de dos (2) ciclos estrales consecutivos. Aquellos que mostraron anomalías durante el seguimiento de los CE fueron descartados del experimento y sustituidos. Fueron observados dos (2) veces al día y el estro se detectó con la ayuda de un carnero caudoepidectomizado equipado con un chaleco marcador, el cual permaneció con el grupo de ovejas las 24 h. del día, bajo las mismas condiciones que éstas. El día cero (0) se consideró el día de inicio del estro.

Seguido a la observación de dos ciclos estrales consecutivos normales (de 14-20 días de duración), los animales fueron asignados aleatoriamente a cada grupo de estudio. Los pertenecientes al grupo 2 = Gestación múltiple inducida (GMI), se les colocó a cada uno una esponja intravaginal impregnada con 60 mg de Acetato de medroxiprogesterona (MAP), por espacio de 13 días. Cuarenta y ocho (48) horas antes de retirar

la esponja, los animales recibieron una aplicación de 1500 UI de PMSG (eCG) (Folligon. Intervet. Holanda) [27] vía intramuscular. Luego de retirar las esponjas se les detectó el estro entre las 24 y 72 horas siguientes y se aparearon con carneros enteros. Los animales del grupo 1 = gestación natural (GN) fueron apareados al presentar el tercer celo.

Con la finalidad de neutralizar el efecto secundario de la PMSG residual, a los animales del grupo 2 se les administró 2,5 cc de anticuerpos monoclonales contra PMSG producidos en conejo (Neutra PMSG, Intervet, Holanda), vía IV, el día del inicio del estro. Este producto tiene una especificidad del 99% con un efecto total dentro de los 30 minutos siguientes a la administración.

El diagnóstico de gestación se realizó a través de la concentración de P_4 , las ovejas que presentaron niveles mayores de 1,5 ng/mL posterior al día 16, se diagnosticaron como preñadas, lo cual se confirmó por ultrasonido el día previo al cumplimiento de la edad de gestación establecida para el sacrificio (Aloka, modelo: SSD-210DXII, con un transductor Aloka que emite una frecuencia de ondas de 5 MHz y una impresora SONY modelo: UP-87 OMD). También se utilizó como indicativo de preñez el no retorno al estro [2].

Muestras de sangre fueron tomadas para determinar los niveles séricos de P_4 diariamente por Radioinmunoanálisis (RIA), usando un kit comercial (Diagnostic Products, USA). El coeficiente promedio de variación intraensayo fue del 8,001% y, el de variación interensayo de 8,31%.

El sacrificio de los animales se realizó una vez cumplidas las edades de gestación establecidas (días 20, 28 y 35), mediante desangre a través de cánulas colocadas en las arterias carótidas, previa desensibilización eléctrica. Dentro de los 2-3 minutos siguientes a la sangría se obtuvieron los tractos reproductivos e inmediatamente se colocaron en bandejas estériles, se transportaron en hielo y condiciones asépticas al laboratorio de morfofisiología del Postgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia. Una vez en el laboratorio se procedió a medir e incidir cada cuerno uterino longitudinalmente por la parte dorsal del mismo, dicha incisión se realizó cuidadosamente con la finalidad de evitar la ruptura de las membranas extra-

TABLA I
ANIMALES UTILIZADOS EN EL ESTUDIO. USED ANIMALS IN THE STUDY

Grupo	Número de animales	Condición	Edad de gestación (días)
1	4	Gestación Natural	20
1	4	Gestación Natural	28
1	4	Gestación Natural	35
2	4	Gestación Múltiple	20
2	4	Gestación Múltiple	28
2	4	Gestación Múltiple	35

Total animales = 24.

embrionarias. Una vez abierto el útero fueron extraídos los *conceptus* de la cavidad uterina a los cuales se les inyectó colorante vegetal para determinar la independencia de las cavidades alantoideas.

Antes, durante y posteriormente a la apertura de los cuernos uterinos se realizaron las evaluaciones macroscópicas del tracto reproductivo y de los embriones.

La Evaluación macroscópica involucró la determinación de una serie de características, tales como:

- Apariencia macroscópica del tracto reproductivo.
- Longitud de los cuernos uterinos.
- Número de embriones en la cavidad uterina.
- Ubicación de los embriones dentro del útero. Para determinar la ubicación de los embriones se tomó en cuenta la longitud total de cada cuerno uterino (100%) y la distancia entre el cuerpo del útero y el sitio donde se encontró cada embrión, expresado en porcentaje, de modo que aquel embrión que se encontró a 0%, 50% y 100%, estaría ubicado en el cuerpo del útero, en la mitad del cuerno uterino y en el extremo ovárico respectivamente.
- Evaluación presuntiva de viabilidad embrionaria. Ésta se determinó por las características de las membranas extraembrionarias, presencia o ausencia de vasos sanguíneos alantoideos y desarrollo embrionario, donde embriones con membranas amarillentas y ausencia o deficiencia de vasos sanguíneos alantoideos fueron considerados como no viables [4, 13].
- Peso de los embriones, obtenido mediante el uso de una balanza analítica.
- Longitud de los embriones expresado en cm.
- Peso del tejido luteal, obtenido mediante el uso de una balanza analítica.

Se utilizó estadística descriptiva para comparar los resultados obtenidos con los encontrados en trabajos anteriores en la oveja y/o en otras especies, prueba de t-Student para comparar grupos de medias independientes entre variables y análisis de correlación para determinar el grado de asociación entre variables. Todos los datos fueron procesados mediante el uso de un paquete estadístico computarizado [18].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Apariencia macroscópica del tracto reproductivo

Todos los animales de los grupos GN y GMI presentaron tracto reproductivo normal sin lesiones macroscópicas visibles. Estos hallazgos junto con las características del comportamiento reproductivo de los animales durante el seguimiento de los CE indican la normalidad reproductiva de los animales utilizados en el estudio.

TABLA II
LONGITUD EN CENTÍMETROS DE LOS CUERNOS
UTERINOS A LOS DÍAS 20, 28 Y 35 DE GESTACIONES
NATURALES Y MÚLTIPLES INDUCIDAS ($\bar{X} \pm EE$)
LONGITUDE IN CENTIMETERS OF THE UTERINE HORNS
A DAYS 20, 28 AND 35 OF NATURAL AND INDUCED MULTIPLE
GESTATIONS ($\bar{X} \pm EE$)

Días de Gestación	Gestaciones Naturales	Gestación Múltiple
Día 20	22,2 ± 0,6	22,5 ± 0,9
Día 28	23,3 ± 1,5 ^c	31,6 ± 1,4 ^d
Día 35	24,6 ± 1,4 ^c	31,4 ± 1,5 ^d

c-d: diferentes letras en una misma línea indica diferencias significativas ($P < 0,001$).

Longitud de los cuernos uterinos

Entre los animales gestantes bajo las diversas condiciones, existen diferencias altamente significativas, excepto para el día 20 de gestación (TABLA II). Los resultados obtenidos en este estudio son similares a los reportados previamente por Rodríguez [26], sin embargo, con menor promedio en la longitud de los cuernos uterinos. Aunque Rodríguez reportó diferencias significativas al día 20 de gestación, posiblemente debido al efecto prolongado de la PMSG, en el presente estudio no se encontraron diferencias en la longitud de los cuernos al día 20 de gestación, probablemente debido a que el efecto de la PMSG fue inhibido mediante el uso de anticuerpos neutralizantes, bloqueándose el efecto biométrico que tiene la PMSG sobre el tracto reproductivo ovino [36]. De manera que las diferencias encontradas a los 28 y 35 días puede deberse a una verdadera influencia de la sobrepoblación uterina y/o por el efecto de factores de crecimientos peptídicos tales como los factores de crecimiento insulínicos I y II los cuales ejercen influencia en el crecimiento coordinado del útero y *conceptus* [30]. Es posible que una mayor concentración de P_4 circulante en los animales del tratamiento GMI (24,03 ± 6,4 y 18,52 ± 3,22 ng/mL los días 28 y 35 respectivamente), respecto a los del tratamiento GN (4,396 ± 0,70 y 5,565 ± 0,542 ng/mL los días 28 y 35 respectivamente) favorezca el crecimiento uterino, condición que debería evaluarse en el futuro. Por otro lado, bajo condiciones de gestación múltiple inducida podría incrementarse la secreción de factores que favorecerían el mayor desarrollo del útero para facilitar el albergue de un mayor número de embriones.

Durante las gestaciones naturales los niveles séricos de P_4 no presentaron diferencias significativas previo al día 15 ($P > 0,05$) con respecto a los animales en CE (datos no publicados). A partir de este día los niveles se mantuvieron superiores a 3,5 ng/mL con algunas oscilaciones. Estos resultados coinciden con los encontrados previamente [23, 24], de manera que el diagnóstico de gestación a través de los niveles séricos de P_4 , es válido cuando se realiza a partir del día 16 post-

servicio. Los altos niveles de P_4 luego del día 15-16 post-servicio son debido al mantenimiento estructural y funcional del CL como consecuencia de la acción embrionaria a través del envío de una señal molecular hacia la madre (IFN-t) que previene la luteólisis, proceso conocido como reconocimiento materno de la gestación.

Los niveles de progesterona sérica en las ovejas del tratamiento GMI fueron bajos hasta el día 3 (< 1 ng/mL), seguido de un aumento progresivo hasta el día 16 ($18,08 \pm 3,5$ ng/mL) para luego mantenerse con algunas fluctuaciones. Estos niveles son menores a los reportados por Rodríguez [26], posiblemente debido a que en el presente trabajo se detuvo la acción de la PMSG (bloqueo de la PMSG el día del estro) evitando la formación de quistes foliculares luteales cuyo tejido también produce P_4 , aunque sean menos activos en su producción respecto a los CL como fue reportado por Hermann [12]. Luego del día 4 post-servicio se encontraron diferencias significativas en la producción de P_4 , entre el tratamiento GN ($1,06 \pm 0,1$ ng/mL) y el tratamiento GMI ($3,5 \pm 1,0$ ng/mL) ($P < 0,05$). Sin embargo, tales diferencias no indican confirmación de la gestación, sino una buena respuesta superovulatoria, ya que el diagnóstico de gestación mediante los niveles de P_4 debe realizarse luego del día 16 post-servicio.

En el presente trabajo se encontró una correlación positiva altamente significativa de los niveles de P_4 con el peso del tejido luteal (TABLA III). El peso del tejido luteal refleja la capacidad funcional (secretoria) del CL. Estos resultados difieren de los reportados por Díaz [7], tal vez debido a que este autor concluye con base a la no correlación del diámetro luteal total con la P_4 sanguínea. Sin embargo, son similares a los de otros trabajos con tratamientos comparables [26].

Embriones: Número, localización y porcentaje de viabilidad

En los animales de GN se obtuvo un promedio de 1,16 embriones/animal, en ellos se presentaron dos gestaciones gemelares lo cual corresponde solamente al 16% de los animales del grupo, considerado como bajo en ovejas criollas [9], mientras que hubo un 33,3% de ovulaciones dobles, cifra que coincide con los reportes previos para razas criollas [9]. El 100% de los embriones en este grupo se ubicaron en la mitad caudal del cuerno uterino sin llegar al cuerpo (sitio considerado como preferencial de implantación) y fueron viables. Resultados similares se han reportado en estudios anteriores [9, 13, 26].

En el caso del grupo de GMI se obtuvo un total de 60 embriones con un promedio de 5 embriones/animal, del total de embriones en este grupo el 73,33% ($n = 44$) se ubicaron en el sitio considerado como preferencial de implantación. El 63,33% ($n = 38$) de los embriones fueron viables de acuerdo con las características macroscópicas propuestas por Boshier [4] y Hernández [13]. Es de hacer notar que la mayoría de los embriones no viables (63,6%; $n = 14$) se ubicaron fuera de la

TABLA III
GRADO DE ASOCIACIÓN ENTRE LOS NIVELES SÉRICOS DE P_4 Y EL PESO DEL TEJIDO LUTEAL EN CADA CONDICIÓN DEL ESTUDIO (GN = GESTACIÓN NATURAL; GMI = GESTACIÓN MÚLTIPLE INDUCIDA)
GRADE OF ASSOCIATION AMONG THE LEVELS SÉRICOS DE P_4 AND THE WEIGHT OF THE LUTEAL TISSUE IN EACH CONDITION OF THE STUDY (GN = NATURAL GESTATION; GMI = INDUCED MULTIPLE GESTATION)

	P_4 GN	P_4 GMI
Peso Tej. luteal	0,61*	0,83**

* $P < 0,05$. ** $P < 0,001$.

zona preferencial de implantación, contrario a los embriones viables que mayoritariamente se ubican en la zona preferencial de implantación (92,1%; $n = 35$). Estos resultados son concordantes con los de otras investigaciones [26] donde se trabajó con GMI en ovejas. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que bajo condiciones de GMI se presenta competencia de los embriones por la zona preferencial de implantación posiblemente con la finalidad de asegurar la sobrevivencia debido a un predominio del número de vasos sanguíneos endometriales existentes en dicha zona en la oveja [28].

Peso y longitud de los embriones

Los embriones viables se caracterizaron por presentar un crecimiento acelerado en peso y longitud desde el día 20 al 35 bajo las dos condiciones de gestación estudiadas (FIG. 1), sin encontrarse diferencias estadísticas significativas entre el peso de embriones viables bajo las diferentes condiciones de preñez a las mismas edades. Sin embargo, el mayor promedio de peso lo presentaron aquellos sometidos a competencia intrauterina. Es posible que se acelere el desarrollo de los embriones bajo condiciones de GMI como requisito para evitar que la muerte sobrevenga. Por otro lado, cuando se compararon los pesos y medidas entre embriones viables y no viables en los animales de GMI se encontró que existen diferencias estadísticas significativas en las tres edades de gestación estudiadas ($P < 0,01$) (TABLA IV). En tal sentido, aquellos embriones cuyos pesos sean \leq a 0,009 g (día 20); 0,18 g (día 28) y 0,54 g (día 35) y con medidas de longitud para las mismas edades \leq a 0,2 cm; 0,4 cm y 0,9 cm. respectivamente, pueden ser considerados no viables. Aun cuando estos valores son tomados *post-mortem* podrían ser un instrumento válido para evaluar viabilidad embrionaria mediante el uso de ultrasonografía empleando la medida de longitud de los embriones y más aún si se hace inferencia al peso, ya que se encontró una correlación positiva ($r = 0,89$) altamente significativa entre el peso y la medida de longitud de los embriones ($P < 0,01$).

Relación entre *Conceptus*

Los resultados de los hallazgos macroscópicos de los *conceptus* bajo condiciones de GMI, indican que esta gesta-



FIGURA 1. DIFERENTES TAMAÑOS DE LOS EMBRIONES OVINOS A LOS 20, 28 Y 35 DÍAS DE EDAD, MOSTRANDO LA DIFERENCIA DE TAMAÑO DE LOS EMBRIONES.

**TABLA IV
PESO EN GRAMOS DE EMBRIONES VIABLES Y NO VIABLES A LOS 20, 28 Y 35 DÍAS DE GESTACIÓN BAJO CONDICIONES DE GESTACIÓN MÚLTIPLE INDUCIDA ($\bar{X} \pm EE$). WEIGH IN GRAMS OF VIABLE AND NON-VIABLE EMBRYOS TO THE 20, 28 AND 35 DAYS OF GESTATION UNDER CONDITIONS OF INDUCED MULTIPLE GESTATION ($\bar{X} \pm EE$)**

Días de Gestación	Embriones Viables	Embriones No Viables
20 días	0,015 ± 0,001 ^a	0,005 ± 0,001 ^b
28 días	0,392 ± 0,05 ^c	0,042 ± 0,02 ^d
35 días	1,48 ± 0,06 ^c	0,192 ± 0,1 ^d

a-b = P < 0,01. c-d = P < 0,001.

ción se caracteriza por ser unicoriónica, multialantoidea y multiamniótica después del día 20, de tal manera que el corion de los diferentes embriones se fusionan entre sí. Para el día 20 las extremidades alantoideas no alcanzan a tener contacto con otra cavidad (longitud promedio de 6,5 cm). A los 28 y 35 días de gestación las extremidades de las cavidades alantoideas compiten por el espacio dentro de la cavidad coriónica superponiéndose entre ellas, pero manteniendo su independencia, de modo que existe sólo una relación de contigüidad entre las cavidades (FIG. 2). Esta independencia incluye los vasos sanguíneos alantoideos los cuales no llegan a fusionarse, al menos hasta el día 35 de gestación la mayor edad estudiada. Dicha independencia embrionaria podría tener la ventaja de que la muerte de un embrión no involucra a embriones vecinos. Con base en estos resultados se puede decir que la muerte de los embriones bajo estas condiciones podría deberse a causas propias del embrión, ya que cuando las causas o factores son maternos se afectan todos los embriones [34].

CONCLUSIONES

Existe una asociación significativa entre el peso del tejido luteal y las concentraciones séricas de progesterona en la oveja en gestaciones naturales y múltiples inducidas.

La longitud de los cuernos es predominantemente mayor bajo condiciones de GMI a partir del día 28 de gestación en comparación con preñeces naturales.

La ubicación de los embriones en la cavidad uterina de la oveja es mayor en la zona entre la mitad del cuerno y el cuerpo sin llegar a este último.



FIGURA 2. FOTOGRAFÍA QUE MUESTRA CUATRO *CONCEPTUS* DE GMI. NÓTESE LA INDEPENDENCIA DE LAS CUATRO CAVIDADES ALANTOIDEAS ASÍ COMO LA SUPERPOSICIÓN DE LAS EXTREMIDADES DE LAS MISMAS, LAS CUALES FUERON INYECTADAS CON CUATRO DIFERENTES COLORES VEGETALES. 1: CAVIDAD ALANTOIDEA; 2: EMBRIONES Y CAVIDADES AMNIÓTICAS.

El peso y la longitud de los embriones pueden ser utilizados como medidas válidas para evaluar la viabilidad embrionaria in vivo, mediante el uso de ultrasonografía, a tal efecto se recomienda realizar estudios destinados para tal fin.

La GMI en la oveja, se caracteriza por ser unicorionica, multialantoidea y multiamniótica.

AGRADECIMIENTO

Los autores quieren expresar su agradecimiento a la Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, a Colciencias, y a la Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela, por el financiamiento de esta investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALLISON, C.; BARTOL, F.; TARLETON, B.; WILEY, A.; JOHNSON, G.; BAZER, F.; SPENCER, T. Developmental biology of uterine glands. **Biol Reprod.** 65: 1311-1323. 2001.
- [2] AUDICANA, L.; HARVEY, M.J.A. Termination of early pregnancy in sheep with dinoprost or cloprostenol: comparison of two commercial preparations. **The Vet Rec.** 133 (23): 574-576. 1993.
- [3] BAS, H.L.M.; RUUD, Y.M.D.; LOUIS, L.H.P.; NIEK, E. Early pregnancy wastage: Relationship between chorionic vascularization and embryonic development. **Fertil. Steril.** 49 (2): 216-220. 1988.
- [4] BOSHIER, D.P. Histological examination of serosal membranes in studies of early embryonic mortality in the ewe. **J. Reprod. Fertil.** 15: 81-86. 1968.
- [5] CLAVIJO, E; HERNÁNDEZ, A. Diferencias en la vascularización de varias zonas del endometrio bovino. **Rev. Col. Cienc. Pec.** 4: 39-49. 1982.
- [6] COMMITTEE ON BOVINE REPRODUCTIVE NOMENCLATURE. Recommendations for standardizing bovine reproductive terms. **Cornell Vet.** 62:216-237. 1972.
- [7] DÍAZ, F.H. Fertilidad y características de ciclo estral de ovejas en el trópico alto Colombiano. Universidad Nacional de Colombia. Santa Fe de Bogotá (Trabajo de ascenso). 28pp. 1992.
- [8] EDEY, T.N. Embryo Mortality. In sheep breeding (G. J. Tomes, D. Robertson and R. Lightfoot). 2nd Ed. 37: 315-325 pp. 1979.
- [9] GAVIRIA, M.T. Estudios morfológicos de la implantación en los días 14 a 24 de la gestación en la oveja. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Santafé de Bogotá, (Tesis M.Sc). 316pp. 1992.
- [10] GAVIRIA, M.T.; HERNÁNDEZ, A. Morphometry of implantation in sheep I. Trophoblast attachment, Modification of the uterine lining, *conceptus* size and embryo location. **Theriogenol.** 41(5): 1139-1149. 1994.
- [11] GUILLOMOT, M. Cellular interactions during implantation in domestic ruminants. **J of Reprod and Fert Suppl.** 49: 39-51. 1995.
- [12] HERMANN, G. Macroscopic and micromorphological studies on ovaries from ewes following hormonal treatment. **Tierärztliche Umschau.** 47(12): 887-890. 1992.
- [13] HERNÁNDEZ, A. The development of the extremities of the placenta of the domestic sheep. University of Bristol, (Tesis M. Sc). 82pp. 1971.
- [14] HUMBLOT, P. Pregnancy specific proteins in ruminants. **Reprod. Nutr. Dev.** 28(6B): 1753-1761. 1988.
- [15] KAULFUSS, K.H.; MAY, J.; SÜSS, R.; MOOG, U. In vivo diagnosis of embryo mortality in sheep by real-time ultrasound. **Small Rum. Res.** 24 (2): 141-145. 1997.
- [16] McCRACKEN, J.A. Hormone receptor control of prostaglandin F₂ alpha secretion by the ovine uterus. **Adv Prostagl Thrombox.** 8:1329-1344. 1980.
- [17] McFEEY, R. A. Chromosome abnormalities. **Vet Clin of North Amer, Food Anim Pract.** 9(1): 11-22. 1993.
- [18] MINITAB STATISTIC PROGRAM. Versión 7,2. 1989.
- [19] MOOG, U.; SUSS, R.; SCHUIS, J. Ovulation rate, conception rate and embryonic mortality in German Mutton Merino ewes. **Monatshheftfur-Veterinarmedizin.** 49(5): 213-218. 1994.
- [20] MUSGROVE, E.A.; SWARBRICK, A.; LEE, C.S.; CORNISH, A.L.; SUTHERLAND, R.L. Mechanisms of cyclin-dependent kinase inactivation by progestins. **Mol Cell Biol** 18:1812-1825. 1998.
- [21] POPE, W. F. Uterine asynchrony: a cause of embryonic loss. **Biol. Reprod.** 39(5): 999-1003. 1988.
- [22] QUINLIVAN, T.D.; MARTIN, C.A.; TAYLOR, W.B.; CAIMEY, I.M. Estimates of pre-and perinatal mortality in the New Zealand Romney Marsh ewe. **J. Reprod. Fertil.** 11: 379-390. 1966.
- [23] RAO, K.M.; JABBAR, M.A.; NAZ, N.A. Early pregnancy diagnosis in the ewes based on plasma progesterone levels. **Pakistan Veter. J.** 10(2): 76-77, 1990.
- [24] RHODES, L.; NATHANIELSZ, P.W. Myometrial activity and plasma progesterone and oxytocin concentration in cycling and early pregnant ewes. **Biol. Reprod.** 42: 834-841, 1990.
- [25] ROBERTS, R.M.; LEAMAN, D.W.; CROSS, J.C. Role of interferon in maternal recognition of pregnancy in rumi-

- nants. **Proceedings of the Soc for Experim. Biol. Med.** 200(1): 7-18. 1992.
- [26] RODRÍGUEZ, J.M. Mortalidad embrionaria y morfofisiología de la implantación en ovejas en condiciones de competencia intrauterina. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Santafé de Bogotá, (Tesis M.Sc). 107pp. 1996.
- [27] RUBIANES, E.; IBARRA, D.; UNDERFELD, R.; CARBAJAL, B.; DE CASTRO, T. Superovulatory response in anestrus ewes is affected by the presence of a large follicle. **Theriogenol.** 43: 465-472, 1995.
- [28] SÁNCHEZ, J. A.; RODRÍGUEZ- MÁRQUEZ, J.; HERNÁNDEZ, A. Área capilar subepitelial del endometrio ovino durante los días 14, 17 y 24 de la gestación. **Rev. Científ FCV-LUZ.** XI (1): 69-74. 2001.
- [29] SAKUNJU, Y.; ENOMOTO, S.; KAMIMURA, S.; HAMANA, K. Monitoring ovine embryo viability with early pregnancy factor. **J. Veter. Med. Sci.** 55(2): 271-274. 1993.
- [30] SIMMEN, R.C.M.; KO, Y.; SIMMEN, F.A. Insuline-like growth factors and blastocyst development. **Theriogenol.** 39: 163-175, 1993.
- [31] SPENCER, T.; BAZER, F. Uterine and placental factors regulating conceptus growth in domestic animals. **J Anim Sci.** 82(13 suppl): E4 - E13. 2004.
- [32] SPENCER, T.E.; BECKER, W.C.; GEORGE, P.; MIRANDO, M.A.; OGLE, T.F.; BAZER, F.W. Ovine interferon-tau regulates expression of endometrial receptors for estrogen and oxytocin, but not progesterone. **Biol Reprod.** 53: 732-745. 1995.
- [33] SPENCER, T.; JOHNSON, G.; BURGHARDT, R., BAZER, F. Progesterone and Placental Hormone Actions on the Uterus: Insights from Domestic Animals. **Biol Reprod.** 71(1): 2-10. 2004.
- [34] SREENAN, J. M.; DISKIN, M. G. Embryonic mortality in farm animals. **Current topics in Vet Med and Anim Sci.** IV. 1-276 pp. 1986.
- [35] STEWART, M.D.; JOHNSON, G.A.; BURGHARDT, R.C.; SCHULER, L.A.; JOYCE, M.M.; BAZER, F.W.; SPENCER, T.E. Prolactin receptor and uterine milk protein expression in the ovine uterus. **Biol Reprod.** 62:1779-1789. 2000.
- [36] TOKOS, M.; TOKOSOVA, M.; ARENDARCIK, J. Biometrical changes in the genital organs of ewes after synchronization of oestrus and superovulation in the mating period. **Vet Med.** 35(1): 31-36. 1990.
- [37] TONG, W.; POLLARD, J.W. Progesterone inhibits estrogen-induced cyclin D1 and cdk4 nuclear translocation, cyclin E- and cyclin A-cdk2 kinase activation, and cell proliferation in uterine epithelial cells in mice. **Mol Cell Biol.** 19: 2251-2264. 1999.
- [38] WIMSATT, W.A. New histological observations on the placenta of the sheep. **Am J Anat.** 87: 391-436. 1950.