UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar por el título de

DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

EFECTO DE TRATAMIENTOS HORMONALES SOBRE LA EFICIENCIA REPRODUCTIVA, MORTALIDAD EMBRIONARIA Y FETAL, EN OVEJAS MERINO DE LA PATAGONIA NORTE

AUTOR: Vet. FERNÁNDEZ, Jimena.

DIRECTOR: Dra. LACAU-MENGIDO, Isabel.

DIRECTOR: Dr. SOTO, Andres.

LUGARES DE TRABAJO: Estación Experimental Agropecuaria INTA Bariloche. Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME), CONICET.

MIEMBROS DEL JURADO:

Dr. CATALANO, Rodolfo.

Dr. MEDINA, Víctor.

Dr. ANCHORDOQUY, Juan Mateo.

-2020-

Agradecimientos

Agradezco a mi familia por haberme apoyado en el camino de la educación y formación.

Agrezco a Santiago por el acompañamiento y apoyo en esta etapa que fue fundamental para mi progreso.

A mi director de tesis Alejandro Gibbons por su generosidad de conocimiento, su apoyo y su dedicación.

Al Grupo de Reproducción de INTA Bariloche, Marcela, Macarena y Alejandro por enseñarme el trabajo en equipo.

A mis directores de tesis, Bettina y Andrés por que a pesar de la distancia siempre estuvieron dispuestos y apoyando todos los trabajos.

Al personal del Campo Experimental Pilcaniyeu del INTA Bariloche, por que gracias al trabajo de ellos se pueden realizar los ensayos.

A los colaboradores que fueron apareciendo en el transcurso de la tesis, Agustín, Hugo, Natalia, Ulises, Felicitas, Nadia, Carolina, del INTA Bariloche, ICIVET, IByME y CIBA.

Citas bibliográficas correspondientes a las publicaciones parciales del trabajo de tesis

Trabajos publicados en revistas periódicas

- Fernández J, Bruno Galarraga M, Cueto M, Lacau I, Soto A, De La Sota R, Gibbons A. Tratamientos hormonales para incrementar la eficiencia reproductiva en los ovinos. Revista de Investigación Agropecuaria. 2016; 42: 145-152.
- Fernández J, Bruno Galarraga M, Cueto M, Soto A, de la Sota R, Gibbons A, Lacau I. Hormonal therapeutic strategy on the induction of accessory corpora lutea and progesterone increase in sheep. Theriogenology. 2018; 105: 184-188
- Fernández J, Bruno Galarraga M, Cueto M, Soto A, de la Sota R, Lacau I, Gibbons A. Effect of GnRH or hCG administration on Day 4 post insemination on reproductive performance in Merino sheep of North Patagonia. Theriogenology. 2019; 126: 63-67.

Resúmenes presentados en congresos o jornadas

- Fernández J, Bruno Galarraga M, Cueto M, Gibbons A. Efecto de la aplicación de tratamientos hormonales post inseminación sobre la tasa de preñez en el ovino. Memorias del IX Curso de Actualización en Producción Ovina. Ed. INTA EEA Bariloche. 2015; pp 83-85.
- Fernández J, Bruno Galarraga M, Cueto M, Lacau I, Soto A, de la Sota R, Gibbons A. Efecto de dos tratamientos hormonales posinseminación sobre la eficiencia reproductiva en ovejas Merino. 39º Congreso Argentino de Producción

Animal. Resumen RF23. Revista Argentina de Producción Animal. 2016; 36 Supl 1: 23.

- Fernández J, Bruno Galarraga M, Lacau I, Soto A, de la Sota R, Cueto M, Gibbons A. Effect of hCG or GnRH post insemination on progesterone concentration in sheep. XVIII Jornada Multidisciplinaria de la Sociedad Argentina de Biología. Resumen A52. Biocell. 2016; 40 Supl 2: 22.
- Fernández J, Bruno Galarraga M, Lacau I, Soto A, de la Sota R, Cueto M, Gibbons A. The administration of hCG or GnRH induce the formation of accessory corpora lutea. V Jornadas Internacionales del Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA). 2017, Ciudad Autonoma de Buenos Aires, Argentina.
- Fernández J, Bruno Galarraga M, Soto A, de la Sota R, Cueto M, Lacau I, Gibbons A. 2018. Hormonal treatment post insemination for induction of accessory corpora lutea and production of progesterone in sheep. 10th International Ruminant Reproduction Symposium. Resumen 008. Animal Reproduction. 2018; 15 Supl 1: 1022.
- Fernández J, Bruno Galarraga M, Soto A, de la Sota R, Cueto M, Gibbons A, Lacau I. Effect of GnRH post insemination on luteal function in sheep. XX Jornadas Anuales De La Sociedad Argentina De Biología. XVII Jornadas De La Sociedad Uruguaya De Biociencias. Segundas Jornadas Rioplatenses de Biología. Biocell. 2018; 43 Supl 3: 48.

- Fernández J, Bruno Galarraga M, Soto A, de la Sota R, Cueto M, Notaro U, Salvetti N, Ortega H, Gibbons A, Lacau-Mengido, I. Luteotrophic effect of GnRH or hCG on corpus luteum functionality during the luteal phase in ewes. Reunión Anual de Sociedades Biocientíficas (SAIC, SAFE, SAB, SAP, NANOMED-ar, AACYTAL). 2019, Resumen 107, Mar del Plata, Argentina.

Índice de contenidos

Agradecimientos I
Citas bibliográficas correspondientes a las publicaciones parciales del trabajo de tesis . II
Índice de contenidos V
Abreviaturas y símbolos VII
Resumen 1
Abstract 3
1. Introducción 5
2. Objetivos 25
2.1- Objetivo general 25
2.2- Objetivos específicos 25
3. Hipótesis generaL 25
4. Materiales y métodos 27
4.1- Sección Experimental I 27
Ensayo I: Año 1 28
Ensayo I: Año 2 31
Ensayo II 34
4.2- Sección Experimental II 40
Ensayo III 41
5. Resultados 44
5.1- Sección Experimental I 44
Ensayo I: Año 1 44
Ensayo I: Año 2 46
Ensayo II 51
5.2- Sección Experimental II 58
Ensayo III 58

6. Discusión 61
6.1- Sección Experimental I 61
6.2- Sección Experimental II 70
7. Conclusiones 77
8. Bibliografía 79

Abreviaturas y símbolos

µg: microgramos

µl: microlitro

3 β HSD: 3 β hidroxi deshidrogenasa

CC: condición corporal

CE: colesterol esterasa

CIBA: Centro de Investigaciones de Buenos Aires

CICUAL: Comité Institucional del uso y cuidado de animales de laboratorio

CL: cuerpo lúteo

CL po: cuerpo lúteo posovulatorio

CL acc: cuerpo lúteo accesorio

cm: centímetro

d: días

E: estrógenos

EEA: Estación Experimental Agropecuaria

eCG: gonadotrofina coriónica equina

EL: epitelio luminal uterino

EG: epitelio glandular uterino

FCV: Facultad de Ciencias Veterinarias

FSH: hormona folículo estimulante

GnRH: hormona liberadora de gonadotrofinas

h: horas

hCG: gonadotrofina coriónica humana

HDL: lipoproteínas de alta densidad

IA: inseminación artificial

IATF: inseminación artificial a tiempo fijo

IByME: Instituto de Biología y Medicina Experimental

ICIVET: Instituto de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral

i.m.: intramuscular

INF τ: Interferon tau

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

kg: kilogramo

LDL: lipoproteínas de baja densidad

LCC: longitud cráneo caudal

LH: hormona luteinizante

M: molar

mg: miligramo

MHz: megahertz

ml: mililitro

mm: milímetro

mM: milimolar

OT: oxitocina

P4: progesterona

PBS: solución buffer fosfatada

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PF: pos fecundación

PG: prostaglandina

PGF2α: prostaglandina F 2 alfa

PGE: prostaglandina E

pp: puntos porcetuales

PV: peso vivo

PVn: peso vivo al nacimiento

P450: 17 α citocromo hidroxilasa

RIA: radio inmuno análisis

RMP: reconocimiento materno de la preñez

RNasas: estereasas

SpB-NGF: factor de criemiento nervioso de origen seminal plasmático

STAR: proteína reguladora aguda esteroidogénica

TΦ: tasa de internalización

UI: unidades internacionales

UNLP: Universidad Nacional de La Plata

UNNOBA: Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires

vs.: versus

Efecto de tratamientos hormonales sobre la eficiencia reproductiva, mortalidad embrionaria y fetal, en ovejas Merino de la Patagonia Norte.

Palabras claves: hCG, GnRH, eficiencia reproductiva, mortalidad prenatal, progesterona, ovinos

Resumen

Se estudió el efecto de la administración de hCG o GnRH a los 4 días posinseminación en ovejas Merino sobre: - la inducción de cuerpos lúteos accesorios (CL acc), la concentración de progesterona [P4] (**Ensayo I**), - las características funcionales de los CL posovulatorio y acc (**Ensayo II**), y - la eficiencia reproductiva (porcentaje de preñez, pérdidas gestacionales, tamaño del embrión, prolificidad y peso al nacimiento de los corderos; **Ensayo III**). Las ovejas se distribuyeron al azar en tres grupos exprimentales: ***Grupo GnRH*** (4 µg), ***Grupo hCG*** (300 UI), ***Grupo Control*** (solución fisiológica). **Ensayo I**: La administración de hCG o GnRH generó un CL acc ($P \leq 0,05$) a partir de folículos de 3, 4 o 5 mm presentes al momento del tratamiento. La [P4] sólo aumentó en el Grupo hCG ($P \leq 0,05$) y no dependió del tamaño del folículo que generó el CL acc ($P > 0,05$). **Ensayo II**: El área inmunomarcada para STAR y 3 β HSD ($P \leq 0,05$) y la expresión de ARNm de STAR, 3 β HSD y P450 ($P \leq 0,1$), principalmente en el CL acc, fue mayor en el grupo hCG. **Ensayo III**: No se observó un incremento en la tasa de preñez y el tamaño del embrión ($P > 0,05$). Se observó una disminución de las pérdidas de preñez en el Grupo hCG ($P \leq 0,05$) y un incremento tendencial de la prolificidad en el Grupo GnRH ($P \leq 0,1$). La fertilidad de los carneros y la condición corporal de las ovejas influyeron en el efecto de los tratamientos hormonales sobre el porcentaje de preñez. Se concluye que, la administración de hCG en la fase luteal induce un CL acc con mejor

capacidad esteroidogénica incrementando la [P4]. Sin embargo, a pesar de observarse una disminución de las pérdidas gestacionales, no se reflejó un incremento en la preñez.

Effect of hormonal treatments on reproductive efficiency, embryonic and fetal mortality, in Merino sheep of Northern Patagonia.

Key words: hCG, GnRH, reproductive performance, prenatal losses, progesterone, ovine

Abstract

The effect of the administration of hCG or GnRH on Day 4 post-insemination on: - the induction of accessory corpora lutea (acc CL), the progesterone concentration [P4], (**Experiment I**) - the functional characteristics of post ovulatory CL and acc CL (**Experiment II**), and - reproductive efficiency (pregnancy rate, pregnancy losses, embryo size, litter size and birth weight of lambs (**Experiment III**) in Merino sheep was studied. The animals were distributed randomly in three experimental groups: ***GnRH Group*** (4 µg), ***hCG Group*** (300 IU), ***Control Group*** (saline solution). **Experiment I**: The administration of hCG or GnRH induced the formation of one acc CL from follicles of 3, 4 or 5 mm ($P \leq 0.05$). The [P4] increased significantly only in the hCG group ($P \leq 0.05$) and did not depend on the size of the follicle that generated the acc CL. **Experiment II**: The positive area in the luteal tissue for STAR and 3 β HSD ($P \leq 0.05$) and mRNA expression for STAR, 3 β HSD and P450 ($P \leq 0.1$), mainly observed in the acc CL, was higher in the hCG group. **Experiment III**: The pregnancy rate and embryo size did not differ between treatments ($P > 0.05$). A decrease in pregnancy losses was observed in the hCG Group ($P \leq 0.05$). Litter size tended to be greater in the GnRH group ($P \leq 0.1$). Rams fertility and body condition score of ewes at insemination time influenced the effect of hormonal treatments on reproductive parameters. It was concluded that, the administration of hCG in the luteal phase induces an acc CL with enhanced

steroidogenic capacity and increases [P4]; however, although a decrease in pregnancy losses was observed, it was not reflected in an increase in pregnancy rate.

1. INTRODUCCIÓN

El sector ovino en el crecimiento y desarrollo del país no debería subestimarse, no sólo por la diversidad en el aporte de materias primas, sino por la posibilidad de aplicar valor agregado a las mismas. Su consolidación contribuye a disminuir la subocupación rural y a satisfacer la demanda interna y los mercados internacionales.

La baja eficiencia reproductiva en los distintos sistemas de producción ovina constituye uno de los factores más relevantes que determina su escasa rentabilidad (Azzarini, 1992). Entre los factores que influyen directamente sobre los resultados productivos se destacan las pérdidas reproductivas durante la gestación y desde el nacimiento hasta el momento del destete de los corderos. A partir de un estudio realizado en el Sur de Australia (Kleemann y Walker, 2005) se estableció que el origen y la intensidad de las pérdidas prenatales pueden variar de una región a otra y se planteó la necesidad de establecer cuáles son y qué incidencia tienen los problemas reproductivos para cada región.

El éxito reproductivo de los ovinos depende de una serie de procesos biológicos, como la maduración de los gametos, la fecundación, el aporte endometrial para el desarrollo embrionario, la placentación, el crecimiento fetal y finalmente el nacimiento de un cordero viable. Las principales pérdidas ocurren durante el desarrollo embrionario (entre la concepción y el establecimiento de la preñez), momento en el cual transcurren eventos fisiológicos y morfológicos uterinos importantes, previos a la implantación embrionaria (Nancarrow, 1994). Se ha reportado que la principal causa de las pérdidas embrionarias se debe a una inadecuada función luteal (Kittok y col., 1983; Nancarrow, 1994). En base a lo expuesto, se han realizado una serie de investigaciones a nivel

mundial en los ovinos, utilizando diversas estrategias hormonales terapéuticas, con el objetivo de fortalecer el cuerpo lúteo (CL), aumentar las concentraciones de progesterona (P4) y reducir las pérdidas embrionarias. Estos estudios tuvieron la finalidad de incrementar la baja eficiencia reproductiva de las majadas. Dentro de las hormonas más utilizadas con tal fin se encuentran, la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) y la gonadotrofina coriónica humana (hCG), que fueron empleadas en diferentes momentos del ciclo estral con resultados diversos.

Eventos fisiológicos en el desarrollo embrionario temprano

El embrión ovino al cuarto día (d) posfecundación (PF) está conformado como una mórula temprana y se ubica en el cuerno uterino. Al d 5 PF la mórula se compacta y al día siguiente se conforma como blastocisto. Luego, entre los días 8 y 9 PF se produce el proceso de la protrusión o "*hatching*", que se inicia con la expansión del embrión y finaliza con la ruptura de la zona pelúcida y su eclosión. El blastocisto ovino es esférico en el d 10 PF, luego es tubular y posteriormente adquiere una forma filamentosa, y crece exponencialmente entre los días 12 y 15 PF (Spencer y Bazer, 2002). Este proceso de transformación se denomina elongación e implica un incremento en el largo y el ancho del trofoectodermo y se lo considera como el comienzo de la implantación (Spencer, 2013).

La elongación del blastocisto se presenta en forma previa al reconocimiento materno de la preñez (RMP), proceso en el cual el embrión señala su presencia en el útero, y los tejidos maternos reconocen la señal (Short, 1969), coincidiendo con el momento crítico del mantenimiento del CL entre los días 12 y 13 de gestación en la oveja (Moor y

Rowson, 1966). En los rumiantes existe una proteína responsable de bloquear el mecanismo luteolítico denominada interferón tau (INF τ). El INF τ se sintetiza en el trofoectodermo entre los días 10 y 21 de la gestación y alcanza su máxima concentración entre los 14 y 16 días de la preñez (Spencer y Bazer, 2002). Su función es parácrina y provoca la supresión de la transcripción de genes que codifican los receptores de estrógenos (E) y oxitocina (OT), por consiguiente, inhibe la secreción de prostaglandina F2α (PGF2α), evitando la regresión del CL hasta el parto, manteniéndose la secreción de P4, la cual es esencial para mantener la gestación (Spencer y Bazer, 2002). Es imprescindible que en el momento previo al RMP se produzca una adecuada concentración de P4 luteal y de INF τ en el endometrio, como parte de la interacción recíproca entre el concepto, el útero y el ovario (Bridges y col., 2013). La P4 es la hormona esteroide responsable de la producción y secreción de factores uterinos histotróficos durante el período crítico del RMP. El crecimiento y desarrollo de los blastocistos en el útero requieren histótrofos, que se originan a partir de las secreciones del epitelio luminal (EL) y glandular (EG) uterino y el transporte selectivo de proteínas y nutrientes desde la circulación materna (Bazer, 1975; Carson y col., 2000). La P4 ovárica induce la expresión de genes en el EL y EG que codifican a los factores de crecimiento, adhesión y de migración, provocando una disminución de la motilidad uterina y remodelación del endometrio para la implantación embrionaria (Spencer y Bazer, 2002). Además, varios de estos genes son estimulados por la acción de la prostaglandina E (PGE), el INF τ y el cortisol, provocando cambios en los componentes del fluido histotrófico del lumen uterino. Estas secreciones intervienen en los procesos críticos de la gestación, como son la elongación y el desarrollo del

embrión, la receptividad uterina, la producción de señales en el RMP, así como la implantación, placentación y la modulación del sistema inmune materno (Spencer, 2013). Por lo tanto, la acción conjunta del INF τ y la P4 es la que impide el desencadenamiento del mecanismo luteolítico, además de estimular la remodelación endometrial e intervenir en el proceso de la implantación embrionaria (Binelli y col., 2001).

Las observaciones experimentales indican que el período de mayor vulnerabilidad para el embrión ovino es la fase previa a la implantación, condicionada por varios factores exógenos, como los nutricionales, sanitarios y ambientales. El RMP depende de una adecuada modulación conjunta entre la P4, el INF τ, el E y la OT, además de la expresión de los diversos receptores uterinos específicos. Toda alteración en la señalización celular o molecular podría desencadenar la mortalidad embrionaria (Bridges y col., 2013).

Rol de la progesterona en el desarrollo temprano de la preñez

La P4 es una hormona esteroide sintetizada y secretada principalmente por el CL y la placenta. La secreción de P4 por el CL es crítica para el establecimiento y mantenimiento de la preñez en los mamíferos y juega un rol importante en la regulación de la secreción endometrial, esencial para el crecimiento y la diferenciación del embrión durante la preñez temprana. Las concentraciones circulantes de P4 representan un equilibrio entre la producción de P4 por el CL y su metabolismo, principalmente en el hígado. La producción de P4 está regulada por el desarrollo del CL después del

aumento de la hormona luteinizante (LH) y la cantidad de células de la granulosa que se luteinizan en células luteales grandes (Wiltbank y col., 2014).

La P4 inicia una cascada de eventos de expresión génica en el estroma y en los epitelios del endometrio y del trofectodermo del embrión, que son importantes para la receptividad uterina, la elongación del blastocisto y la formación de un concepto filamentoso durante el período de preimplantación embrionaria (Satterfield y col., 2008). La preparación del EL uterino para la unión del trofoectodermo y la implantación en todos los mamíferos, incluidos los rumiantes, implica alteraciones espacio temporales, sincronizadas por la expresión y localización de los genes y proteínas dentro del endometrio (Satterfield y col., 2008).

La concentración plasmática de P4 es mayor en ovejas preñadas comparada con ovejas cíclicas en las primeras dos semanas PF (Ott y col., 1993). Sin embargo, tanto en animales cíclicos como preñados, se producen cambios similares en la expresión génica endometrial hasta el inicio de la elongación del embrión (aproximadamente el d 13 PF), lo que sugiere que el mecanismo predeterminado en el útero es el de prepararse para llevar a cabo la gestación (Forde y col., 2011). Sólo en asociación con el RMP, se pueden detectar cambios significativos en el perfil transcriptómico entre el endometrio de un animal cíclico y el de uno preñado, cuando el endometrio responde a cantidades crecientes de IFN τ secretadas por el concepto filamentoso (Forde y col., 2011; Bauersachs y Wolf, 2013).

Estudios recientes han intentado descifrar los mecanismos involucrados en la compleja relación entre las concentraciones circulantes de P4 y el éxito de la preñez (Lonergan y col., 2016). Varios estudios retrospectivos han indicado una relación positiva entre las

concentraciones circulantes de P4 en la primera semana PF y la tasa de preñez (Kleemann y col., 1994; Kleemann y col., 2001 Stronge y col., 2005; Mousavy y col., 2009; O´hara y col., 2014; Khafaji, 2018). Otros se han centrado en caracterizar los efectos uterinos de la P4, que inducen un ambiente uterino compatible con el crecimiento embrionario, la implantación y el mantenimiento de la preñez (Spencer y col., 2007; Forde y col., 2009). Cabe destacar que el crecimiento y desarrollo del blastocisto puede acelerarse por el incremento prematuro de la concentración de P4 en vacas y ovejas (Garrett y col., 1988; Satterfield y col., 2006). Sin embargo, en bovinos, Carter y col. (2008), no observaron diferencias en el desarrollo de embriones en el d 5 o el d 7 PF cuando las vaquillonas recibieron P4 exógena en el d 3 del ciclo estral. Lo mismo fue observado en ovejas tratadas con P4 en los primeros 3 d PF (Kleemman y col., 2001). La presencia de concentraciones plasmáticas adecuadas de P4 durante el desarrollo embrionario temprano depende, en gran medida, de una correcta síntesis en el CL. Por lo tanto, garantizar la funcionalidad del CL es fundamental en el desarrollo y mantenimiento de la gestación.

Funcionalidad del cuerpo lúteo

El CL se considera una glándula endocrina transitoria, la cual responde a cambios hormonales estimulatorios e inhibitorios. Las alteraciones en el desarrollo, la función y la regresión del CL son características principales del ciclo reproductivo y de la preñez en los mamíferos. El papel principal del CL en estos procesos es la producción de P4.

La primera descripción detallada del CL la realizó Regnier deGraaf (1641-1673) cuando describió los cuerpos lúteos como “glóbulos” y explicó que en los conejos “*el número de*

glóbulos es igual al número de crías de un apareamiento particular" (deGraaf, 1672 citado por Jocelyn y Setchell, 1972). Fraenkel y Cohn (1901) y Magnus (1901) llegaron a la misma conclusión con sus estudios, el CL era esencial para el mantenimiento de la preñez. Más tarde, Magnus denominó a la secreción endocrina del CL para mantener la preñez "*differentieringsstofe*" (en inglés, *differentiating stuff*, cosa diferenciadora), el primer nombre dado a la hormona que más tarde sería reconocida como la P4 (Magnus, 1901).

Posiblemente, las propiedades biológicas más interesantes del CL están relacionadas con la dinámica de este tejido. A partir del folículo ovulado, se conforma una nueva estructura distinta, denominada cuerpo lúteo, inducido por la oleada preovulatoria de la LH (Baird, 1992; Smith, 1994). Este incremento de la LH es crucial para la luteinización de las células foliculares y el mantenimiento del CL (Tomac y col., 2011). La funcionalidad del CL depende del entorno endocrino al que estuvo expuesto el folículo antes de la ovulación. La concentración de P4 y los pulsos de GnRH de baja frecuencia probablemente permitan que el folículo dominante tenga un proceso de maduración suficiente antes de que la secreción de E sea suficiente para provocar un aumento de LH preovulatoria (Baird, 1992).

El CL es un tejido heterólogo compuesto por múltiples tipos de células (Wiltbank, 1994). Entre los diferentes tipos celulares se encuentran: células luteales grandes y pequeñas, fibroblastos, células del sistema inmune y células endoteliales (Farin y col., 1989; Reynolds y Redmer, 1995). Las células luteales grandes provienen de la granulosa del folículo, mientras que las luteales pequeñas provienen de las células de la teca. Esta transformación implica un cambio esteroidogénico que les permite a estas células

desarrollar la maquinaria enzimática para producir P4. Dentro de las células esteroidogénicas, las células luteales grandes secretan aproximadamente siete veces más P4, cuando son estimuladas por agentes luteotróficos (Kenny y col., 1989). En ovinos se demostró que las células luteales pequeñas pueden transformarse en grandes al ser estimuladas con una hormona luteinizante (Farin y col., 1988). El CL responde a los pulsos de LH con un aumento en la secreción de P4 en las fases lúteas media y tardía (Baird, 1992). Para que luego de la ovulación el folículo se convierta en un CL totalmente funcional es necesario que el mismo presente una cantidad adecuada de E y de receptores de LH (White y col., 1987). La producción de P4 por parte del CL se incrementa desde la fase inicial a la fase media del ciclo estral y la misma va acompañada por un aumento del tejido luteal. Las células luteales grandes incrementan su tamaño (hipertrofia) entre los días 4 y 12 del ciclo, sin variar su número, hasta el momento de la luteólisis. Por otro lado, las células luteales pequeñas no muestran cambios de su tamaño, pero su número aumenta (hiperplasia) entre los días 4 y 8 del ciclo (O`shea y col., 1980; Farin y col., 1989).

El crecimiento del tejido luteal depende de la angiogénesis, que se produce de manera rápida y extensa a medida que el antro folicular avascular se remodela en una estructura altamente vascularizada estableciendo un suministro de sangre que le permita el desarrollo de un CL funcional (Ellinwood y col., 1979). El establecimiento de la red vascular lútea comienza en el folículo preovulatorio y, en última instancia, es estimulado por el aumento de la LH. Después de la ovulación, el cuerpo lúteo experimenta un crecimiento extremadamente rápido y una angiogénesis intensa que está estrechamente regulada por un equilibrio logrado entre los factores pro-

angiogénicos y antiangiogénicos (Robinson y Woad, 2017). Grandes vasos sanguíneos y microcapilares se ubican adyacentemente a las células esteroidogénicas (Zheng y col., 1994). Las células endoteliales aumentan entre los días 4 y 12 del ciclo estral, comparadas con los fibroblastos que lo hacen entre los días 8 y 16 del ciclo estral (Farin y col., 1989).

En bovinos y ovinos existe una alta correlación entre el área, el diámetro y el volumen del CL con la concentración de P4 (Kayacik y col., 2006; Balaro y col., 2017). Sin embargo, hay algunos autores que sugieren que la concentración de P4 no sólo depende del tamaño o el número de CL, sino de su capacidad esteroidogénica para sintetizar P4 (Schmitt y col., 1996; Balaro y col., 2017). La función luteal es controlada por la interacción de varios factores luteotróficos que incluyen gonadotrofinas (LH, hCG) prolactina y PGE (Sangha y col., 2002). La síntesis de hormonas esteroideas es regulada por la disponiblidad de colesterol y la expresión específica de enzimas esteroidogénicas (Stocco y Clark, 1997). El aumento de la LH inicia cambios tanto en la expresión y regulación de enzimas esteroidogénicas como la 3 β hidroxideshidrogenasa (3 β HSD) y el 17 α citocromo hidroxilasa (P450), así como la proteína reguladora aguda esteroidogénica (STAR), estos tres componentes, participan en la síntesis de la P4 (Sangha y col., 2002; LaVoie, 2017) (**Figura 1.**).

En resumen, la actividad del CL responde a estrechas interrelaciones hormonales favorecidas por una estructura vascular que lleva un importante flujo sanguíneo, además de la interacción entre las células que garantizan la integridad y la funcionalidad de la glándula. Después de la fecundación, la función del CL consiste en el suministro de concentraciones de P4 adecuadas, siendo críticas para establecer un

entorno endometrial necesario para el mantenimiento de la preñez. La P4 es el principal producto esteroide funcional del CL.

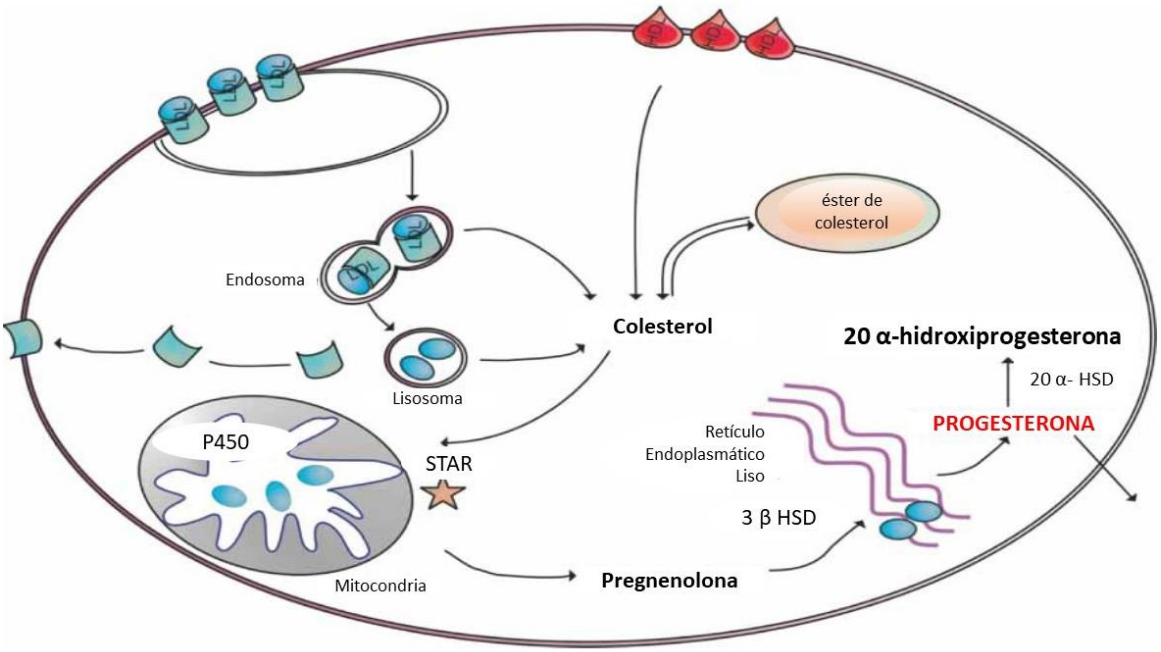

Figura 1. Esquema de la vía de la biosíntesis de progesterona en una célula lútea. La célula utiliza tres fuentes de colesterol como sustrato para la síntesis de progesterona: lipoproteínas de baja densidad (LDL); lipoproteínas de alta densidad (HDL) y ésteres de colesterol hidrolizados por la enzima colesterol esterasa (CE). El colesterol libre se transporta a las mitocondrias con la participación de elementos citoesqueléticos y proteínas transportadoras de esteroles. Luego, el colesterol se transporta desde la membrana mitocondrial externa a la interna, y este proceso implica una proteína reguladora aguda esteroidogénica (STAR), receptores de benzodiacepina de tipo periférico y endozepina. El colesterol se convierte en pregnenolona en las mitocondrias mediante el 17 α citocromo hidroxilasa (P450), y finalmente en progesterona mediante 3 β hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β HSD) en el retículo endoplásmico liso. Una vez sintetizada, la progesterona se difunde a partir de las células lúteas. (Traducido de Tomac y col., 2011).

Mortalidad embrionaria

La mortalidad embrionaria en los ovinos se presenta entre la fecundación y el fin del período embrionario de diferenciación, d 35 de gestación (Fernández Abella, 1993). La mayoría de las pérdidas embrionarias en los ovinos se produce en las primeras tres semanas de preñez, estimándose que la falla en el proceso de la fecundación se presenta aproximadamente en el 5-10% de los ovocitos (Wilmut y col., 1986). Se considera que el 20 al 40% de las ovulaciones no están representadas por crías nacidas vivas (Edey, 1979; Nancarrow, 1994). El 70-80% de estas pérdidas embrionarias ocurren entre los días 8 a 16 PF (Wilmut y col., 1986). Wilkins (1991) manifestó que las pérdidas gestacionales posteriores al d 30 de gestación son muy bajas (1-4%). Se ha reportado que las ovejas Merino de Patagonia Norte mantenidas en un sistema extensivo de producción presentan pérdidas gestacionales (o fallas en la fecundación) de hasta el 18% entre el d 1 y 17 de gestación, mientras que las pérdidas de preñez a partir del d 18 resultan menores al 4% (Bruno Galarraga y col., 2014).

Cabe mencionar que la fecundación y el adecuado desarrollo embrionario están supeditados a varios factores, como la maduración folicular preovulatoria, la calidad ovocitaria, las concentraciones de E, gonadotrofinas y de P4 previos y posteriores a la ovulación, la vida media luteal y la funcionalidad de los receptores luteales para la LH (Bridges y col., 2013). A su vez, el desarrollo embrionario también estará condicionado por la presencia de defectos intrínsecos del embrión, por un inadecuado ambiente uterino o bien a una incapacidad materna para responder adecuadamente a las señales embrionarias para el RMP (Spencer y Bazer, 2002).

En resumen, la mortalidad embrionaria constituye un problema reproductivo multicausal y produce importantes pérdidas económicas en la producción ovina a nivel mundial. El establecimiento y mantenimiento de la preñez están supeditados a una serie de eventos endocrinológicos, fisiológicos e inmunológicos durante la etapa temprana que son críticos para la sobrevivencia del embrión (Spencer y Bazer, 2002).

Estrategias para disminuir la mortalidad embrionaria en ovinos

Las principales causas de la mortalidad embrionaria son la deficiente función luteal, la asincronía embrionaria-uterina y el insuficiente desarrollo del embrión que se manifiesta con una menor señalización embrionaria y un efecto luteotrópico disminuido (Wilmut y col., 1986; Nancarrow, 1994). De éstas, la disfunción luteal sería la causa más relevante (Nancarrow, 1994).

En base a lo expuesto, y con la finalidad de incrementar la eficiencia reproductiva de las majadas, se han desarrollado diferentes estrategias de suplementación hormonal capaces de aumentar las concentraciones de P4 y reducir las pérdidas embrionarias. Algunas de estas estrategias tendientes a elevar la P4 luego de la inseminación artificial (IA), consisten en: i) aumentar de la función endógena del CL posovulatorio (CL po); por ejemplo, utilizando estrategias que promueven el crecimiento del folículo preovulatorio antes de la ovulación, lo que resulta en un CL más grande o aplicando tratamientos luteotróficos que estimulan el desarrollo del CL, por ejemplo, suministrando hCG; ii) la inducción de la ovulación de un folículo dominante y la formación de un CL accesorio (CL acc); por ejemplo, por la administración de hCG o GnRH; o iii) la suplementación de P4 directamente (por ejemplo, mediante inyección o dispositivos intravaginales)

(Kleemann y col., 1994; Thatcher y col., 2002; Cam y Kuran, 2004; Khan y col., 2007). Los trabajos experimentales realizados con este objetivo se han llevado a cabo en diferentes países y con diversas especies como ovejas (Khan y col., 2007), cabras (Riaz y col., 2012), vacas (Schmitt y col., 1996), búfalo (Arshad y col., 2017) y llamas (Ábalos y col., 2018); y a su vez, con distintas razas, categorías de animales y en diferentes épocas del año. Sin embargo, los datos sobre la respuesta en términos de porcentaje de preñez son variables o no concluyentes y pueden deberse a diversos factores como: i) el momento del tratamiento; ii) la proporción de animales con P4 inherentemente baja (número de hembras que pueden beneficiarse de dicho tratamiento); iii) baja efectividad de la suplementación con P4 puede ser menos efectiva en animales de alta producción debido al alto metabolismo de la P4 en el hígado (por ejemplo vacas lechera de alta producción; Wiltbank y col., 2014); o iv) número insuficiente de animales y poder estadístico en muchos de los estudios realizados.

A pesar de que los beneficios de la P4 suplementaria durante la preñez temprana son muy variables en los rumiantes, se reconoce que la P4 garantiza un medio uterino adecuado para el crecimiento y desarrollo embrionario. Por lo tanto, es posible suponer que la aplicación de P4 exógena, previo a la implantación, podría modificar el ambiente uterino y así favorecer la viabilidad y el desarrollo embrionario (Spencer, 2013).

Resultados de tratamientos con gonadotrofinas sobre la eficiencia reproductiva

Efecto de la Hormona Liberadora de Gonadotrofinas

La GnRH es una hormona producida por neuronas del hipotálamo en el sistema porta hipofisario de vasos sanguíneos hacia la hipófisis. Es un decapéptido que estimula la

síntesis y secreción de las hormonas folículo estimulante (FSH) y LH en la adenohipófisis. Ambas hormonas regulan la secreción de E, la ovulación, el desarrollo del CL, la secreción de P4 e intervienen en la ovógenesis y foliculogénesis.

La utilización de GnRH para inducir la formación de CL acc y aumentar la concentración de P4 ha sido utilizada en ovinos, tanto en la estación reproductiva (Beck y col., 1994; Cavalcanti y col., 2012; Maythem y Ziyad, 2018), como en contra estación (Ishida y col., 1999; Mirzaei y col., 2014). En el ganado bovino, se ha observado que la Buserelina (análogo de la GnRH) reduce la concentración plasmática de E, lo que retrasa el desarrollo de los receptores endometriales de OT. Por ende, se inhibe la liberación de PGF2α y se induciría una “luteoestasis” otorgándole al embrión mayor tiempo para producir y liberar IFN τ; favoreciendo su implantación (Newcombe y Peters, 2014). También se ha observado que la administración de GnRH en el momento del servicio puede incrementar la prolificidad en los ovinos (Türk y col., 2008). Dicha respuesta estaría condicionada por el número de los folículos con capacidad ovulatoria al momento de su aplicación (Hashem y col., 2014).

En ovinos, la administración de GnRH durante en la fase luteal provoca la formación de un CL acc que incrementa las concentraciones plasmáticas de P4 y disminuye las concentraciones de E (Beck y col., 1996; Hashem y col., 2014). Se ha descripto la presencia de receptores de GnRH en diferentes tejidos periféricos como el ovario, la placenta y la glándula mamaria (Shemesh, 2001). Esto sugeriría una acción directa de GnRH no solo en la hipófisis, sino que también, sobre estos órganos (Shemesh, 2001). Hashem y col. (2014) aplicaron GnRH en ovinos en la etapa temprana de la fase luteal (d 7 y 0-7 postcelo) y obtuvieron una disminución de las pérdidas fetales luego del d 40

PF. Estos autores, al igual que Cavalcanti y col. (2012), no encontraron diferencias en la tasa de ovulación. A su vez, cuando se aplicó la hormona en la fase luteal tardía (12 días postservicio), Mac Millan y col. (1986) observaron un aumento en la tasa de preñez. Cam y col. (2002) coincidieron con los resultados del estudio anterior y a su vez, determinaron un aumento en la longitud cráneo caudal (LCC) de los fetos a los 45 días de preñez, pero que no se correlacionó con un aumento posterior en el peso vivo al nacimiento (PVn) de los corderos. Lashari y Tasawar (2013) reportaron tanto un mayor número de carúnculas, como un aumento en las dimensiones del saco amniótico y de la LCC de los embriones de 25 días de edad gestacional. Además, la aplicación de GnRH al momento del celo puede incrementar el PVn de los corderos, tanto en pariciones simples como dobles (Lashari y Tasawar, 2010). Por el contrario, en dos trabajos posteriores no se evidenciaron aumentos del PVn de los corderos (Sirjani y col., 2011; Olfati y Moghaddam, 2013). Posiblemente estas diferencias se pueden deber a las distintas condiciones experimentales en que se realizaron los diferentes ensayos. En la **Tabla 1** se presenta un resumen de los distintos trabajos publicados luego de la aplicación de los tratamientos con GnRH sobre la eficiencia reproductiva en ovinos (Modificado de Fernández y col., 2016).

Tabla 1. Resumen de tratamientos hormonales con GnRH (Hormona Liberadora de Gonadotrofinas) sobre la eficiencia reproductiva en ovinos.

Autores	n	Raza	Dosis (µg)	DT	P4	CL acc	% Preñez	ER	Mejora
Beck y col. (1996)	-	-	4	12	>	-	-	SI	-
Ishida y col. (1999)	12	Suffolk	100	12	>	-	ns	NO	ns
Cam y col. (2002)	103	Karayaka ×Sakiz.	4	12	>	SI	>	SI	SI
Cam y Kuran (2004)	45	Karayaka/Karayaka x Sakiz F2	4	12	-	SI	>	SI	SI
Kahn y col. (2007)	40	Welsh Halfbred	4	12	>	SI	-	SI	SI
Türk y col. (2008)	11		4	0			-	NO	NO
Lashari y Tasawar (2010)	30	Lohi	50	0	>	-	>	SI	SI
Sirjani y col. (2011)	8	Iranian Afahari	50	0	>	-	>	SI	Ns
Cavalcanti y col. (2012)	34	Sta Inés/Sta Inés x Dorper	25	0	-	ns	ns	SI	-
Olfati y Moghaddam (2013)	30	Arkhar-Merino×Ghezel/Moghani	12,5	0 0, 11 y 13	-	-	>	SI	SI
Lashari y Tasawar (2013)	8	Lohi	50	12	>	-	>	SI	SI
Ataman y col. (2013)	60	Akkaraman	20	4, 12, 16	-	-	-	NO	NO
Hashem y col. (2014)	11	Rahmani	4	0 7 0 y 7	>	SI	>	SI	SI
Mirzaei y col. (2014)	25	Mehraban Iran	4	0	-	-	>	NO	SI
Fernández y col. (2015)	16	Merino	4	7	-	-	>	SI	-
Ahmadi y Mirzaei. (2016)	25	-	4.2	0		>	>	SI	SI
García-Pintos y Menchaca. (2017)	350	Merino	100	11	-	-	>	SI	SI
Maythem y Ziyad. (2018)	15	Nuaemie	4	10	>	-	>	SI	SI
Zonturlu y col. (2018)	30	Awassi	4	10	-	-	>	SI	SI
Dursun (2019)	30	Anatolian Merino	4	0	-	-	>	SI	SI
Fernández y col. (2019)	100	Merino	4	4	-	-	-	NO	NO

Ref.: n: número de ovejas utilizadas por tratamiento; µg: microgramos; DT: días de tratamientos hormonales con respecto al celo o servicio; ns: sin diferencias significativas; P4: concentración plasmática de progesterona; CL acc: cuerpo lúteo accesorio; ER: época reproductiva. La columna "mejora" se refiere a los resultados generales: Peso vivo al nacimiento de los corderos, tasa de ovulación, parición y prolificidad, peso de los fetos o embriones o distintos parámetros medidos en placenta y útero (número de cotiledones, peso de la placenta y útero, ancho y largo del saco amniótico) luego de la necropsia. (Modificado de Fernández y col., 2016).

Efecto de la gonadotrofina coriónica humana

La hCG es una hormona glicoproteica sintetizada por el embrión humano a partir de los días 7-8 PF y posteriormente por el sincitiotrofoblasto. Su acción biológica es similar a la de la LH y promueve la producción de P4 por parte del tejido luteal, interactúa con los receptores de LH del CL e interviene en su mantenimiento (Maillo y col., 2014). La administración de hCG durante la fase luteal en vacas, incrementa el volumen y la vida media del CL, aumenta la síntesis de P4, induce la ovulación y promueve la formación de CL acc (Stevenson y col., 2006; 2008).

En ovejas, los resultados de la aplicación de la hCG en ovejas son disímiles y dependientes del momento de la aplicación o de las condiciones experimentales. Cuando fue aplicada al momento del estro aumentó la prolificidad (Khan y col., 2009; Moeini y col., 2009), la fertilidad, la tasa de concepción y el PVn de los corderos (Moeini y col., 2013). Sin embargo, en otros estudios experimentales, luego del tratamiento con hCG no se halló un incremento en la tasa de preñez ni en la prolificidad (Fukui y col., 2001; Gómez Brunet y col., 2007). En la fase luteal temprana (3-7 días postcelo) la administración de hCG produjo un aumento en la prolificidad (Lankford y col., 2010; Castro y col., 2015). Los tratamientos con hCG en la fase luteal intermedia (8-12 días postcelo) incrementaron el peso del CL, el largo del embrión y la concentración de INF τ (Nephew y col., 1994). Sin embargo, estos incrementos no se relacionaron con un aumento posterior del PVn de los corderos (Ishida y col., 1999; Khan y col., 2009). En la **Tabla 2**, se puede observar un resumen de los resultados de los trabajos publicados sobre los tratamientos con hCG y su efecto sobre la eficiencia reproductiva en ovinos desde el año 1983 al 2019 (Modificado de Fernández y col., 2016).

Tabla 2. Resumen de tratamientos hormonales con hCG (Gonadotrofina Coriónica humana) sobre la eficiencia reproductiva en ovinos.

Autores	n	Raza	Dosis (UI)	DT	P4	CL acc	% Preñez	ER	Mejora
Kittok y col. (1983)	29	-	100	11,12,13	>	-	>	NO	-
Nephew y col. (1994)	10	Targhee	100	11.5	>	-	>	SI	SI
Zamiri y Hosseini., 1998	15		125/250/500	0	-	-			
Ishida y col.(1999)	12	Suffolk	500	12 6,9	> >	- -	ns ns	NO NO	ns ns
Fukui y col. (2001)	31	Suffolk /South down	300	3,4,5 4	>	ns	ns	NO	ns
Cam y Kuran (2004)	45	Karayaka/Karayaka x Sakiz	150	12	-	SI	>	SI	SI
Catalano y col. (2006)	29	Corrideale	150	0	-	-	>**	SI	ns
Kahn y col. (2007)	40	Welsh Halfbred	200	12	>	SI	-	SI	SI
Gómez Brunet y col. (2007)	331	Manchega	500	0	>	-	ns	SI	ns
Moeini y col. (2009)	127	Lori, Iran	200	0 12	ns	-	>	SI	SI
Kahn y col. (2009)	100	Welsh Halfbred	200	12	-	SI	ns	SI	SI
Lankford y col. (2010)	30	Suffolk	200	4,7,10	>	SI	-	SI	SI
Moeini y col. (2013)	127	Lori, Iran	250	0 12	>	-	>	SI	SI
Mirzaei y col. (2014)	25	Mehraban Iran	250	0	-	-	>	SI	SI
Castro y col. (2015)	7	Santa Inés	250	7	-	SI	-	NO	-
Fernández y col. (2015)	16	Merino	300	7	-	-	>	SI	-
Dias y col. (2018)	65	Santa Ines	500	-2	-	-	<	SI	NO
Fernández y col. (2019)	92	Merino	300	4	-	-	ns	SI	SI

Ref.: n: número de ovejas utilizadas por tratamiento; UI: unidades internacionales; DT: días de tratamientos hormonales con respecto al celo o servicio; ns: sin diferencias significativas; P4: concentración plasmática de progesterona; CL acc: cuerpo lúteo accesorio; ER: época reproductiva. La columna "mejora" se refiere a los resultados: Peso vivo al nacimiento de los corderos, tasa de ovulación, parición y prolificidad, peso de los fetos o embriones o distintos parámetros medidos en placenta y útero (número de cotiledones, peso de la placenta y útero, ancho y largo del saco amniótico) luego de la necropsia. Modificado de Fernández y col., 2016.

Cabe consignar que otros trabajos experimentales realizados en ovinos no hallaron diferencias significativas entre los tratamientos con GnRH o hCG al considerar la prolificidad (Gómez Brunet y col., 2007), la tasa de ovulación (Cavalcanti y col., 2012) y el porcentaje de preñez (Ishida y col., 1999), si bien, los tratamientos realizados con hCG tuvieron un mayor efecto luteotrófico con respecto a los tratamientos con GnRH (Cam y Kuran, 2004; Khan y col., 2007; Mirzaei y col., 2014). Esto podría deberse a diferencias en la farmacodinámica de estas dos hormonas que producirían un CL con distintas capacidades esteroidogénicas (Schmitt y col., 1996). La administración de hCG promueve la diferenciación de las células foliculares en células luteales, así como una mayor transformación de células luteales pequeñas a grandes (Farin y col., 1988) provocando un aumento del área del tejido luteal (Castro y col., 2015). Además, la hCG tiene una mayor vida media debido a su estructura química y alta glicosilación, posibilitando un efecto prolongado sobre el CL. Las concentraciones plasmáticas de P4 son dependientes de la capacidad del tejido esteroidogénico para sintetizar esta hormona. Por lo tanto, el número y el tamaño de las células luteales influyen en la producción de P4 (Maillo y col., 2014).

Justificación del trabajo

Los antecedentes expuestos demuestran que existiría una estrecha relación entre los tratamientos hormonales luteotróficos y su efecto sobre los parámetros reproductivos. Sin embargo, los resultados de los tratamientos hormonales en diversas investigaciones han sido variables, contradictorios o no concluyentes. Esto podría atribuirse a una variedad de factores, como las distintas dosis y el momento del ciclo estral en que

fueron suministradas, además del potencial biológico de cada fármaco. Diversas variables como la raza y el biotipo productivo de los animales, la edad, el manejo o la época del año, también pudieron condicionar los resultados de los tratamientos.

Teniendo en cuenta la ausencia de información sobre la mortalidad embrionaria y los efectos de los tratamientos hormonales sobre la eficiencia reproductiva en majadas ovinas Merino de la Patagonia criadas en condiciones extensivas, se planteó la necesidad de estudiar y determinar el efecto de los tratamientos hormonales con GnRH o hCG en momentos claves de la gestación, y cómo influyen en los distintos parámetros reproductivos; como la fertilidad, el desarrollo y el crecimiento del embrión, las pérdidas embrionarias y fetales, y su influencia sobre el PVn de los corderos al nacimiento.

A su vez, según nuestro conocimiento, no existe información en cuanto a la influencia de los tratamientos hormonales con GnRH o hCG sobre la inducción de la ovulación posinseminación según la presencia folicular y la concentración de P4 a lo largo de la preñez temprana en ovinos. Tampoco existen registros sobre la funcionalidad de los CL po y acc y de sus posibles diferencias morfológicas y funcionales entre ellos, luego de la aplicación de dichos tratamientos hormonales.

Como se ha citado anteriormente, la implementación de tratamientos hormonales en el momento previo a la implantación del embrión podría mejorar el RMP y mantenimiento de la preñez, así como evitar las pérdidas prenatales, maximizando el potencial reproductivo de las hembras y aumentando el porcentaje anual de señalada.

Generar esta información nos permitirá determinar un uso racional y justificado de estos tratamientos hormonales.

2. OBJETIVOS

2.1- Objetivo general

El objetivo general de esta tesis fue evaluar el efecto de la administración de la GnRH o de la hCG sobre la eficiencia reproductiva en las ovejas Merino en la Patagonia Norte.

2.2- Objetivos específicos

1- Evaluar la inducción ovulatoria en las ovejas tratadas con GnRH o hCG a los 4 días posinseminación artificial, según la presencia folicular para la generación de cuerpos lúteos accesorios y su efecto sobre la concentración sérica de progesterona.

2- Determinar las características histológicas y funcionales de los cuerpos lúteos posovulatorio y accesorios y su incidencia sobre la concentración sérica de progesterona en ovejas tratadas con GnRH o hCG a los 4 días posinseminación artificial.

3- Evaluar el efecto de la administración de GnRH o hCG a los 4 días posinseminación artificial en ovejas, sobre el porcentaje de preñez, las pérdidas embrionarias, la longitud cráneo caudal del embrión, la prolificidad y el peso al nacimiento de los corderos.

3. HIPÓTESIS GENERAL

En ovejas adultas Merino en condiciones extensivas de la Patagonia, los tratamientos hormonales con GnRH o hCG durante la fase luteal temprana posinseminación artificial:

- Inducen la formación de cuerpos lúteos accesorios y un incremento en la concentración plasmática de progesterona, debido a cambios en las características histológicas y funcionales de los cuerpos lúteos posovulatorios y accesorios.

- Incrementan el porcentaje de preñez, el tamaño del embrión, la prolificidad y el peso al nacimiento de los corderos y reducen las pérdidas de gestación.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1- Sección Experimental I

Esta Sección comprende dos ensayos; El ***Ensayo I*** se realizó durante dos años consecutivos (Año 1 y 2) con el objetivo de evaluar la inducción ovulatoria en ovejas tratadas con GnRH o hCG a los 4 días posinseminación artificial, según la presencia folicular en el momento de su aplicación, para la generación de CL acc y su efecto sobre la concentración sérica de P4 (*Objetivo específico 1*). El año 2 permitió incrementar la información obtenida en el Año 1, principalmente al evaluar el mantenimiento de los CL acc, la concentración de LH luego de los tratamientos y la concentración de P4 hasta el día 35 de gestación.

El ***Ensayo II*** se llevó a cabo con el objetivo de determinar las características histológicas y funcionales de los cuerpos lúteos posovulatorio y accesorios sobre la concentración sérica de progesterona en ovejas tratadas con GnRH o hCG a los 4 días posinseminación artificial (*Objetivo específico 2*).

Ensayo I

Lugar y época de estudio

Se seleccionaron ovejas de raza Merino (n= 72) clínicamente sanas, con un peso vivo (PV) de 48,7±5,3 kilogramos (kg) y condicion corporal (CC, según Russel y col., 1969) de 2,5±0,4. Los animales seleccionados permanecieron en pastoreo sobre pastizales naturales con libre acceso al agua durante todo el período de estudio.

Se realizaron dos ensayos durante la estación reproductiva (otoño-invierno) de 2016 y 2017, en las instalaciones del Campo Experimental Pilcaniyeu del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Bariloche, provincia de Río Negro (70° 28’ 30’’ longitud oeste y 41° latitud sur; Área de Sierras y Mesetas Occidentales, Patagonia Norte).

El cuidado y el tratamiento de los animales experimentales se realizaron de acuerdo con las normas emitidas por la National Academy Science, Washington DC, EE. UU. (National Research Council, 2011) y aprobadas por el Comité de Principios Rectores Internacionales para la Investigación Biomédica de Animales de Laboratorio (Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales [CICUAL]) de la FCV-UNLP; Número de protocolo: 53-6-15T.

Ensayo I: Año 1

Animales y diseño experimental

Se seleccionaron 36 ovejas de raza Merino, las cuales recibieron un tratamiento de sincronización de estros mediante doble dosis de un análogo de prostaglandina (PG; 125 µg de Cloprostenol, i.m., Ciclase®, Syntex, Argentina) distanciadas por 14 días.

A las 54-56 horas (h) luego de la segunda aplicación de PG se realizó la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) por vía vaginal con semen fresco según lo descripto por Cueto y Gibbons (2011). El semen fue colectado mediante vagina artificial, de 1 carnero adulto Merino clínicamente sano (Revisación clínica apta y prueba negativa a Brucella ovis). Se utilizó una dosis de 0,03 mililitros (ml) y una concentración aproximada de 100 millones de espermatozoides totales por oveja. El eyaculado colectado se mantuvo en

un baño de agua a 36 °C, y fue evaluado macro y microscópicamente en forma inmediata luego de su recolección para determinar en forma subjetiva la motilidad masal (0-5), empleándose solo aquéllos con una motilidad masal ≥ 3.

A los 4 d luego de la IATF, las ovejas inseminadas fueron divididas aleatoriamente en tres grupos experimentales:

1) ***Grupo GnRH (n= 12)***: recibieron 4 µg de un análogo de GnRH, i.m. (Buserelina; Receptal®, Laboratorio Intervet, Argentina)

2) ***Grupo hCG (n= 12)***: recibieron 300 UI de hCG, i.m. (Gonacor®, Laboratorio Ferring, Argentina)

3) ***Grupo Control (n= 12)***: recibieron 1 ml de solución fisiológica, i.m.

Laparoscopías exploratorias ováricas

A los 4 y 10 d luego de la IATF se realizaron las laparoscopías ováricas. La primera observación laparoscópica se realizó a las 6 h previas al momento de la aplicación de los tratamientos hormonales a fin de determinar el número, ubicación y tamaño de los folículos antrales ováricos, al mismo tiempo se determinó el número y ubicación del CL po. La segunda laparoscopía se realizó a los 10 días luego de la IATF a fin de evaluar el número y la ubicación del CL acc en la superficie ovárica, y su relación a la observación previa de la presencia folicular, para determinar el tamaño del folículo que generó el CL acc.

Las ovejas permanecieron en ayuno de agua y alimento, 12 h previas a las observaciones laparoscópicas. El procedimiento se realizó sobre una camilla, con el animal colocado en decúbito dorsal con una inclinación de 45º y sujetado de los

miembros. Luego se procedió a la preparación del animal mediante el rasurado, limpieza con jabón neutro, secado y desinfectado con alcohol de la zona abdominal. La intervención se realizó mediante anestesia general con xilacina (2 miligramos (mg)/10 kg de Kensol® 2%, Konig, Argentina) y clorhidrato de ketamina (25 mg/10 kg de Ketalar®, Parke-Davis, Argentina) y anestesia local con lidocaína (Frankaína®, 1 ml/animal, 2%, Fatro Von Frankel, Argentina). Finalizadas las observaciones laparoscópicas, se procedió a la aplicación de cicatrizante sobre la herida quirúrgica (Young Plata, Quimagro, Argentina) y se administró un antibiótico preventivo vía intramuscular (Penicilina-Estreptomicina, 1 ml/10 kg, Over, Argentina).

Las observaciones laparoscópicas se realizaron mediante un equipo Wolf (Richard Wolf, Knittlingen, West Germany), con telescopio de 4 milímetro (mm), ángulo de 45º, transmisión de luz por fibra óptica y fuente de luz fría de 250 W. La observación ovárica se realizó según la técnica de Killen y Caffery (1982). La aguja de Veress (Endopath®, Ethicon Endo-surgery, USA), situada equidistante de la línea alba con respecto al laparoscopio y a 5 centímetros (cm) a la izquierda del pliegue inguinal derecho, permitió la sujeción del ovario desde el ligamento útero-ovárico, para presentar la superficie ovárica a la visualización laparoscópica. La sujeción de cada uno de los ovarios desde el ligamento útero-ovárico, permitió la descripción de sus cuatro caras: frente, medial, lateral y posterior, registrándose la distribución ovárica de todos los folículos iguales o mayores a 2 mm. El diámetro de los folículos de ≥2 mm de tamaño se midió con una sonda grabada con una escala milimétrica, como lo descripto por Cueto y col. (2006). La posición relativa de cada folículo con respecto a otros folículos o estructuras lúteas

se registró en un diagrama de los ovarios para evaluar los tamaños de los folículos que generaron el CL acc, presentes a la segunda laparoscopía.

Determinación de las concentraciones séricas de progesterona

Se tomaron muestras de sangre de la vena yugular a los 12 animales de cada grupo (GnRH, hCG y Control) en los días 4, 10, 13, 17 y 21 (Día 0: momento de la IATF) utilizando tubos de 10 ml (BD Vacutainer®, Franklin Lakes, NJ, USA), para la determinación de P4. Las muestras fueron centrifugadas (1000 G por 10 minutos) y el suero obtenido fue almacenado a -20 ºC hasta el momento de los análisis hormonales. La determinación de la concentración sérica de P4 se realizó por quimioluminiscencia (Elecsys®, Progesterone II, Roche, Mannheim, Germany) con una sensibilidad de < 0,1 ng/ml, una especificidad del 90% y un coeficiente de variación intraensayo e interensayo <10% para muestras entre 0,1 y 36 ng/ml. Los resultados fueron expresados en ng/ml. La concentración de progesterona al día 17 fue aceptada como diagnóstico precoz de gestación utilizando como valor de corte 1 ng/ml (McPhee y Tiberghien, 1987; Thimonier, 2000).

Ensayo I: Año 2

Animales y diseño experimental

Se utilizaron 36 ovejas de raza Merino, las cuales recibieron un tratamiento de sincronización de estros mediante la aplicación de esponjas intravaginales (60 mg de acetato de medroxiprogesterona; Progespon®, Syntex, Argentina) por 14 d y al

momento del retiro del dispositivo progestacional se aplicó Gonadotrofina Coriónica equina (eCG; 200 UI; Novormon®, Syntex, Argentina).

A las 54-56 h luego del retiro de la esponja y aplicación de la eCG se realizó la IATF por vía vaginal con semen fresco. La inseminación artificial y la recolección y evaluación del semen se realizó como lo descripto en "***Animales y diseño experimental"***.

A los 4 d pos IATF, las ovejas inseminadas fueron divididas aleatoriamente en tres Grupos experimentales:

1) ***Grupo GnRH (n= 12):*** recibieron 4 µg de un análogo de GnRH, i.m. (Buserelina, Receptal®, Laboratorio Intervet);
2) ***Grupo hCG (n= 12):*** recibieron 300 UI de hCG, i.m. (Gonacor®, Laboratorio Ferring);
3) ***Grupo Control (n= 12):*** se les administró 1 ml de solución fisiológica, i.m.

Laparoscopías exploratorias ováricas

Las laparoscopías exploratorias se realizaron en todos los animales a los d 4, 10 y 21 días luego de la IATF. La primera laparoscopía se realizó a las 6 h previas al momento de la aplicación de los tratamientos a fin de determinar el número, ubicación y tamaño de los folículos ováricos, al mismo tiempo se determinó el número y ubicación de CL po. La segunda laparoscopía se realizó a los 10 días luego de la IATF a fin de evaluar el número y ubicación de CL acc en la superficie ovárica en relación a la observación previa de la presencia folicular. Por último, en el día 21, se observó la continuidad de la presencia del CL po y el CL acc.

El procedimiento se realizó como el descripto en "***Laparoscopías exploratorias ováricas***".

Determinación de las concentraciones séricas de progesterona y hormona luteinizante

Para la determinación hormonal se colectó sangre de la vena yugular a todos los animales a los 4, 7, 10, 13, 17, 21, 28 y 35 d (Día 0: momento de la IATF). Las muestras fueron centrifugadas (1000 G por 10 minutos) y el suero obtenido fue almacenado a -20 ºC hasta el momento de los análisis hormonales. El procesamiento para la determinación de P4 se realizó como el descripto en el Año 1, *"**Determinación de las concentraciones séricas de progesterona**".*

La concentración sérica de LH se determinó, en las muestras correspondientes a los d 4, 7 y 10 luego de la IATF, mediante radioinmunoanálisis (RIA) con el anticuerpo anti-rat-LH-RIA-11 (NIDDK), en el Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME). Los resultados se expresaron en ng/ml de acuerdo al estandár o-LH. I6 (NIDDK). Las muestras sanguíneas del día 4 fueron recolectadas entre las 2-6 h luego de la aplicación del tratamiento con GnRH, hCG o solución fisiológica.

Análisis estadístico

El número de CL acc se comparó mediante ANOVA con un test *a posteriori* de Bonferroni. El número de folículos en cada tratamiento se comparó mediante ANOVA con un test *a posteriori* de Bonferroni. La concentración de P4 de las ovejas diagnosticadas preñadas a los 17 d luego de la IATF y LH se analizó mediante análisis

factorial con medidas repetidas en el tiempo. La significación estadística se fijó en P≤0,05 y se consideró una tendencia a ser significativa cuando 0,05< P≤ 0,1. El programa estadístico utilizado fue el R commander (2016).

Ensayo II

Animales y diseño experimental

El presente experimento se realizó durante la estación reproductiva (otoño-invierno) en las instalaciones de la Estación Experimental Bariloche (EEA) del INTA (71° 31' 03'' longitud oeste y 41° latitud sur; Área de Sierras y Mesetas Occidentales, Patagonia Norte).

Se seleccionaron 29 ovejas de raza Merino con un PV promedio de 45,0±5,0 y una CC 2,5±0,3. La sincronización de los estros y la inseminación se realizó como fue descripta en el Ensayo I Año 2. *Veasé "**Animales y diseño experimental**"*.

Los animales se dividieron al azar en tres Grupos experimentales a los 4 d luego de la IATF:

1) ***Grupo GnRH (n= 10):*** recibieron 4 µg de un análogo de GnRH, i.m. (Buserelina (Receptal®, Laboratorio Intervet, Argentina)

2) ***Grupo hCG (n= 10):*** se les administró 300 UI de hCG, i.m. (Gonacor®, Laboratorio Ferring, Argentina)

3) ***Grupo Control (n= 9):*** recibieron 1 ml de solución fisiológica, i.m.

Laparoscopías exploratorias ováricas

A los d 4 y 14 luego de la IATF se realizó en todos los animales laparoscopías exploratorias para determinar el número, distribución y tamaño de los folículos, la presencia del CL po y acc, como lo descripto en ***"Laparoscopías exploratorias ováricas"***.

En la segunda laparoscopía, se realizó, además, una laparotomía para la obtención de los CL po y acc. Ver más adelante en "***Exéresis de los cuerpos lúteos"***.

Determinación de la concentración sérica de progesterona

Se extrajeron muestras de sangre de la vena yugular todos los animales de cada grupo (GnRH, hCG y Control) en los d 4, 10 y 14 (Día 0: momento de la IATF). El procesamiento se realizó como el descripto en ***"Determinación de las concentraciones séricas de progesterona".***

Exéresis de los cuerpos lúteos

Se realizó una laparotomía ventral paramediana con el objetivo de realizar la exéresis de los CL po y acc mediante la ovariectomía (Becaluba y Moscuzza, 2018) de uno o ambos ovarios dependiendo de la ubicación de los cuerpos lúteos. La intervención se realizó inmediatamente después de la segunda laparoscopía. El procedimiento quirúrgico se llevo a cabo como lo descripto en "***Laparoscopías exploratorias ováricas"***. Una vez que se realizó la cirugía se suturo la herida y se hizo el mismo procedimiento descripto anteriormente.

En una placa de Petri sobre escamas de hielo se separaron los CL en dos mitades. Una de las mitades de cada CL fue medida con un calibre, registrándose el diámetro en cm.

Esta muestra fue fijada en formalina al 10% durante 48 h. Luego, se trasvasó cada muestra a un tubo con alcohol al 70%, para realizar posteriormente los análisis histológicos e inmunohistoquímicos. Una porción interna de la otra mitad del CL fue conservada en un criotubo en nitrógeno líquido para posteriormente hacer el análisis mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Análisis histológicos e inmunohistoquímicos de los cuerpos lúteos

Las muestras de los CL po y acc fueron deshidratadas e incluidas en parafina. El procedimiento consistió en el pasaje de las muestras por soluciones de alcoholes crecientes (70, 96, 96%), luego por dos soluciones de xileno y después por tres soluciones de parafina con grado creciente de purificación. Se entacaron en moldes y se conservaron hasta el procesamiento histológico e inmunohistoquímico.

Para la realización de los estudios histológicos se montaron los cortes de los CL de 4 µm de espesor en portaobjetos (n= 3 animales por tratamiento). Se desparafinaron en xileno y se rehidrataron con lavados graduados con etanol. La tinción con hematoxilina eosina (H-E) se realizó con el objetivo de registrar el recuento de células luteales grandes en el Laboratorio de Histopatalogía de la EEA Bariloche del INTA. Los cortes fueron fotografiados bajo un microscopio óptico (Zeiss Axiostar Plus, Bélgica) con cámara digital (Canon, PowerShot G6, Japon). Para el recuento de células luteales grandes se contaron 10 campos/ portaobjetos/ animal con un aumento de 40X. Las imágenes capturadas fueron analizadas con el procesador de imágenes FIJI (Schindelin y col., 2012).

Para la realización de la inmunohistoquímica se montaron los cortes de los CL de 4 µm de espesor en portaobjetos (n= 3 animales por Grupo Experimental). Se desparafinaron en xileno y se rehidrataron con lavados graduados en etanol. La actividad de peroxidasa endógena se bloqueó con peróxido de hidrógeno en metanol durante 15 minutos. Después de 3 lavados con solución buffer fosfatada (PBS), las muestras se incubaron con anticuerpo primario [Anticuerpo Anti- 3 β HSD R1484 1/1000; o Anti. Star (ab 3343)- Abcam 1/100] y después de 1 h y dos lavados con PBS se colocó el anticuerpo secundario biotinilado (sistema Vectastain ABC; Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE. UU.) durante 30 min. Los cortes se cubrieron con estreptavidina-peroxidasa por 30 min y luego de 5 lavados con PBS, se cubrieron con la solución de cromógeno (DAB). Los controles negativos se obtuvieron en ausencia de anticuerpo primario. La reacción se detuvo utilizando agua destilada, se tiñó con hematoxilina y se deshidrató antes de montar con medio de montaje (Canadá Balsam Synthetic; Biopack, Santa Barbara, CA, EE. UU.). Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio del Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral ICIVET-CONICET.

Los cortes fueron observados, fotografiados y analizados bajo microscopio óptico (Zeiss, Axiostar Plus, Bélgica) con cámara digital (Canon, Power Shot G6, Japon). En un total de 10 fotografías por corte, se realizó un análisis comparativo de los aspectos inmunohistoquímicos encontrados en los CL de los animales de los distintos tratamientos. El porcentaje de células lúteas inmunomarcadas se procesó utilizando el programa FIJI (Schindelin y col., 2012). Se determinó el área inmunomarcada con STAR y 3 β HSD sobre el área total de interés y se calculó el promedio de las 10 imágenes de cada corte.

Análisis de la expresión génica de los cuerpos lúteos

Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Fisiopatología de la Hipófisis del Centro de Investigaciones de Buenos Aires (CIBA-UNNOBA).

El ARN total se aisló de las muestras de CL almacenadas en nitrógeno líquido (n= 3 animales por Grupo Experimental). Cada muestra fue homogeneizada en 400 µl de reactivo TRI (Trizol® LS Reagent, Ambion, Invitrogen) e incubada a 30 °C durante 10 min. Se añadió cloroformo (80 µl), las muestras fueron agitadas vigorosamente, y después de 5 min de incubación a 30 °C, se centrifugaron a 12000 × g durante 15 min a 4 °C. Se añadió isopropanol (200 µl) al sobrenadante para precipitar el ARN. Después de una incubación de 10 minutos a 30 °C, las muestras se centrifugaron a 12000 × g durante 15 min a 4 °C, se descartaron los sobrenadantes y se lavaron sus gránulos con 400 µl de etanol al 70%. Luego, las muestras se centrifugaron a 7500 × g durante 7 min a 4 °C y se descartaron los sobrenadantes.

Los precipitados resultantes se volvieron a suspender en 5 µl de agua libre de ribonucleasa (RNasas), se incubaron durante 10 minutos a 60 °C y luego durante 5 minutos en hielo. El ARN fue cuantificado por Picodrop (Picodrop Ltd., Saffron Walden, Reino Unido) y la concentración se determinó sobre la base de la absorbancia a 260 nm, se evaluó su pureza por la relación de absorbancia a 260/280 nm (~2,0 se consideró apropiado).

El ARN total (2 µg) se transcribió de forma inversa en una mezcla de reacción que contenía ditiotreitol 0,1 molar (M), desoxinucleótido 10 milimolar (mM) trifosfatos, 5X RT Buffer, Oligo DT, transcriptasa del virus de la leucemia murina Moloney (Invitrogen, Life

Technologies Corp., Carlsbad CA) y agua libre de RNasas en un volumen final de 20 µl. La transcripción inversa de la reacción en cadena de la polimerasa se realizó en un termociclador de punto final Veriti (Applied Biosystems Inc., Foster City CA) con los siguientes parámetros de ciclo térmico: 10 min a 25 °C, 50 minutos a 37 °C y luego mantenido a 4 °C.

El producto se amplificó en un termociclador en tiempo real (LineGene 9600, Bioer, Hangzhou, China) con cebadores para STAR, 3 β HSD, P450 y sentido y antisentido del cebador de actina en una mezcla de reacción (15 µl) que contenía 0,5 µM de los cebadores (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA), FastStart™ PCR Master Mix (Roche- Sigma Aldrich, Darmstadt, Alemania) y agua libre de ARNasa. Se determinaron los niveles de expresión de ARNm de STAR, 3 β HSD y P450 utilizando el método Ct comparativo relativo a la expresión del cebador de actina de limpieza.

Las secuencias de los cebadores fueron las siguientes:

Fo-STAR-sheep: 5´CGC GAC GTT TAA GCT GTG TG 3´; Re-STAR-sheep: 3´ CCA GCT GAG AAC CTA GGA GAG 5´;

Fo-3βHSD-sheep: 5´ GAA GTT CGG GAG GAA TTT TCT AAG C 3´; Re-3βHSD-sheep: 3´ GCA CAC TAG CCT GGA CAC AG 5´;

Fo-CytP450-sheep: 5´ TTG GAG GAT GTC AAG GCC AAT 3´; Re-CytP450-sheep 3´ ACG GAG ATA GGG TGG AGT CTT AG 5´.

Análisis estadístico

El número de CL se analizó mediante un ANOVA con un test *a posteri* de Bonferroni. La concentración de P4 de las ovejas diagnosticadas preñadas a los 17 d luego de la IATF, se analizó mediante análisis factorial con medidas repetidas en el tiempo.

El porcentaje de área inmunomarcada con anticuerpos anti-STAR y anti-3 β HSD y el número de células luteales grandes se analizó mediante ANOVA de mínimos cuadrados (least squares ANOVA) con un test *a posteri* de Bonferroni.

Los datos de la PCR se transformaron matemáticamente para adaptarse a la normalización cuando fue necesario. La prueba de Tukey post-hoc se empleó cuando fue necesario para definir las diferencias de tratamiento entre las medias de cada gen. Las correlaciones entre la expresión relativa a actina de los ARNm para STAR, 3 β HSD y P450 y los tratamientos hormonales se probaron mediante la prueba paramétrica de Pearson.

La significación estadística se fijó en $P \leq 0,05$. Se consideró una tendencia a la significación cuando $0,05 < P \leq 0,1$ El programa estadístico utilizado fue el R commander (2016).

4.2- Sección Experimental II

El objetivo de esta sección fue evaluar el efecto del tratamiento con GnRH o hCG a los 4 días luego de la IATF sobre la eficiencia reproductiva en ovejas Merino (*Objetivo específico 3*). Para cumplir con este objetivo se realizó el ***Ensayo III***, evaluándose los siguientes parámetros: el porcentaje de preñez, las pérdidas embrionarias, el tamaño del embrión, la prolificidad y el peso al nacimiento de los corderos.

Ensayo III

Lugar y época de estudio

Se realizó durante la estación reproductiva (otoño-invierno) del año 2016, en las instalaciones del Campo Experimental Pilcaniyeu del INTA Bariloche, provincia de Río Negro (70° 28’ 30’’ longitud oeste y 41° latitud sur; Área de Sierras y Mesetas Occidentales, Patagonia Norte).

El cuidado y el tratamiento de los animales experimentales se realizaron de acuerdo con las normas emitidas por la National Academy Science, Washington DC, EE. UU. (National Research Council, 2011) y aprobadas por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUAL) de la FCV-UNLP; Número de protocolo: 53-6-15T.

Animales y diseño experimental

Se seleccionaron ovejas de raza Merino (n= 288) clínicamente sanas, con un PV de 48,7±5,3 y CC de 2,5±0,4. Los animales seleccionados permanecieron en pastoreo sobre pastizales naturales con libre acceso al agua durante todo el período de estudio.

Todas las ovejas recibieron un tratamiento de sincronización de estros mediante doble dosis de un análogo de prostaglandina (PG; 125 µg de Cloprostenol, Ciclase®, Syntex, Argentina) distanciadas por 14 días.

A las 54-56 h luego de la segunda aplicación de PG se realizó la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) por vía vaginal con semen fresco. El procedimiento se realizó de igual manera que el Ensayo I de la Sección experimental I. *Veasé en “**Animales y diseño experimental**”.* La identificación de los carneros Merino (n= 5) utilizados en la IATF fue necesaria porque las ovejas fueron parte de un programa de mejoramiento

genético. El número de eyaculados/carnero utilizado fue entre 1-4. El número de ovejas inseminadas por el carnero fue: Carnero A: 75 ovejas; B: 115 ovejas; C: 35 ovejas; D: 34 ovejas; E: 29 ovejas. Cada oveja recibió la dosis seminal de un carnero, al azar. El día de la IATF se consideró el día 0 del ensayo.

A los 4 d luego de la IATF, las ovejas inseminadas fueron divididas al azar en tres Grupos experimentales:

1) ***Grupo GnRH (n= 99)***: recibieron 4 µg i.m. de un análogo de GnRH, Buserelina (Receptal®, Laboratorio Intervet, Argentina);
2) ***Grupo hCG (n= 92):*** recibieron 300 UI i.m. de hCG (Gonacor®, Laboratorio Ferring, Argentina);
3) ***Grupo Control (n= 97):*** recibieron 1 ml de solución fisiológica, i.m.

Diagnóstico de gestación, pérdidas embrionarias y tamaño del embrión

Para determinar el porcentaje de preñez, las pérdidas y el crecimiento embrionario se realizaron ecografías transrectales a los 33 y 90 d posteriores a la IATF. Se utilizó un transductor lineal de 6 MHz (Aquila Vet, Paises Bajos).

Treinta y tres d luego de la IATF, se evaluó la LCC mediante 10 imágenes ecográficas por cada Grupo experimental y luego se analizó con el Software del ecógrafo.

Las pérdidas embrionarias se evaluaron mediante control ecográfico a los 33 d luego de la IATF mediante la interpretación de las imágenes observadas, considerando: Oveja *Preñada*: cuando se presentaba una imagen ecográfica en la que se observó el embrión con signos vitales; *Oveja* n*o preñada:* la imagen ecográfica se presentaba con el útero sin líquido y contenido embrionario; *Oveja con pérdida de preñez*: una imagen

ecográfica en la que se observó contenido de líquido uterino sin presencia embrionaria o sólo la presencia de la membrana amniótica. Además, se evaluó la pérdida gestacional entre los días 33 y 90 posteriores a la IATF.

Control de parición

A partir del d 146 de gestación se llevó a cabo el control de parición de una muestra representativa de cada Grupo Experimental (GnRH: n= 46; hCG: n= 44; Control: n= 47) mediante recorridas diarias del potrero de parición. En cada nacimiento, se registró la identidad de la madre, día de parición (largo gestacional), PVn de los corderos, sexo y tipo de nacimiento (simple o doble). Los corderos fueron identificados mediante caravanas plásticas tipo Allflex.

Análisis estadístico

El efecto de los tratamientos en las variables de respuesta (tasas de preñez y de pérdidas gestacionales) fue analizado por regresión logística múltiple con distribución binomial. El análisis de varianza se utilizó para comparar la LCC del embrión, la prolificidad y el PVn de los corderos entre los Grupos Experimentales. La comparación post-hoc se realizó utilizando las pruebas posteriores de Bonferroni. Además, el efecto del carnero utilizado en IATF y la CC de las ovejas al momento de la inseminación sobre la tasa de preñez se analizó mediante regresión logística múltiple con distribución binomial. El programa utilizado para el análisis de los datos fue R Commander (2016).

La significación estadística se fijó en $P \leq 0,05$. La tendencia significativa fue aceptada con un $0,05 < P \leq 0,1$.

5. RESULTADOS

5.1- Sección Experimental I

Efecto del tratamiento con GnRH o hCG a los 4 días posinseminación sobre la inducción ovulatoria según la presencia folicular, las características histológicas y funcionales de los cuerpos lúteos y la concentración de progesterona en ovejas Merino.

Ensayo I: Año 1

Inducción ovulatoria según la presencia folicular

El número de folículos de 2-5 mm previo al momento de la aplicación de los tratamientos fue similar en todos los Grupos experimentales (**Tabla 3**; P> 0,05).

Los Grupos GnRH y hCG tuvieron un mayor número de CL acc comparados con el Grupo Control (1,1±0,0 vs. 0,0±0,0, P≤ 0,01; **Tabla 3**). Ademas, no hubo diferencias significativas en la cantidad de CL acc inducidos entre el Grupo GnRH y hCG (1,0±0,4, número de CL acc/número de ovejas tratadas con GnRH= 12/12 *vs*. 1,1±0,3 número de CL acc/ número de ovejas tratadas con hCG= 13/12; P> 0,05).

Tabla 3. **Población folicular y número de cuerpos lúteos presentes en ovejas, tratadas a los 4 días posinseminación a tiempo fijo con 4 µg de un análogo de hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), 300 UI de gonadotrofina coriónica humana (hCG) o 1 ml de solución fisiológica (Control).**

Estructuras ováricas		Grupo Experimental			P
		GnRH (n= 12)	hCG (n= 12)	Control (n= 12)	
Diámetro de los folículo	2 mm	6,4±3,8	6,7±4,0	6,4±2,7	0,9
	3 mm	3,1±2,9	3,1±1,8	2,2±1,5	0,6
	4 mm	1,3±0,8	1,0±0,0	1,6±0,9	0,2
	5 mm	1,2±0,5	1,3±0,7	1,6±0,5	0,2
Cuerpo lúteo	posovulario	1,1±0,4	1,0±0,3	1,1±0,3	0,6
	accesorio	1,0±0,4[b]	1,1±0,3[b]	0,0±0,0[a]	0,0001

Los valores se expresan como Medias ± error estándar de la media. Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas (P≤ 0,05)

El tamaño del folículo del cual se generó el CL acc fue de 3, 4 o 5 mm *vs*. 4 o 5 mm en los Grupos GnRH y hCG, respectivamente. La ubicación del CL acc se correspondió con la del folículo de mayor tamaño presente en el ovario previo a la aplicación de los tratamientos hormonales, indistintamente si el folículo estaba ubicado ipsilateral o contralateral al CL po.

Concentración sérica de progesterona

En las ovejas preñadas, las concentraciones medias de P4 en los d 7, 10, 13 y 17 luego de la IATF fueron mayores en el grupo hCG comparadas con el Grupo GnRH y el Grupo Control (P≤ 0,05, **Figura 2**). No hubo diferencias en la concentración de P4 entre los grupos GnRH y Control (P> 0,05).

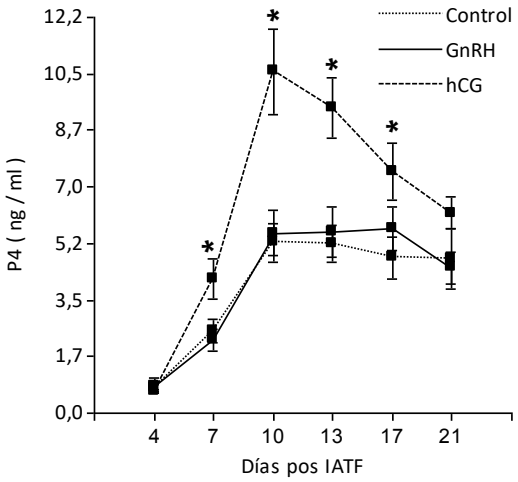

Figura 2. Concentración de progesterona (P4) obtenida de ovejas preñadas los días 4, 7, 10, 13, 17 y 21 luego de la inseminación a tiempo fijo (IATF), en respuesta al tratamiento con 4 µg de un análogo de hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH; n= 8; línea continua), 300 UI de gonadotrofina coriónica humana (hCG; n= 8; línea discontinua) o 1 ml de solución fisiológica (Control; n= 11; línea de puntos) 4 días luego de la IATF. (*) indica diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (P≤ 0,05).

La concentración sérica de P4 obtenida en cada uno de los días evaluados fueron similares entre si independientemente del tamaño del folículo del cual se generó el CL acc, tanto en ovejas preñadas y tratadas con GnRH o hCG (P> 0,05, **Figura 3**, respectivamente).

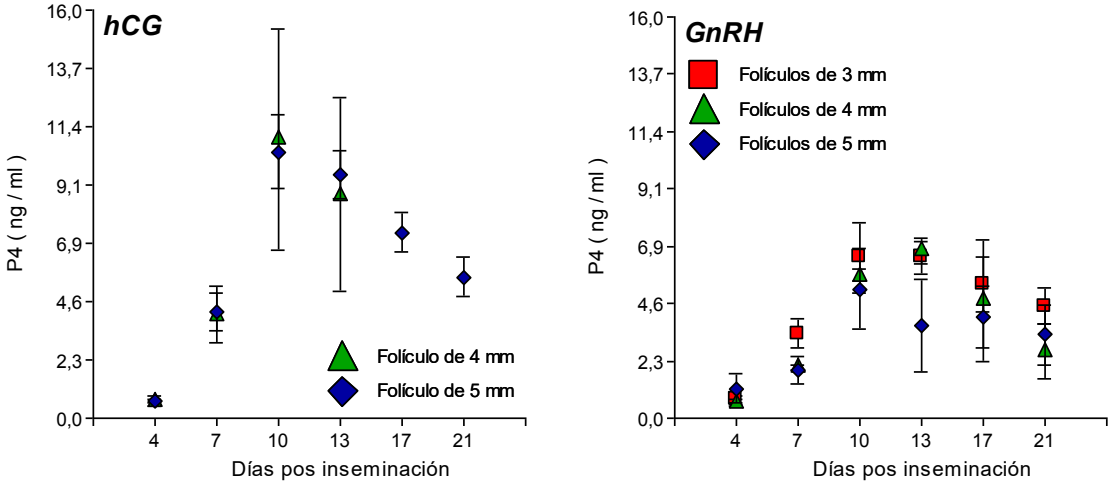

Figura 3. Concentración de progesterona (P4) obtenida en ovejas preñadas los días 4, 7, 10, 13, 17 y 21 luego de la inseminación a tiempo fijo (IATF), en respuesta al tratamiento con 4 µg de un análogo de hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH; n= 8) o 300 UI de gonadotrofina coriónica humana (hCG; n= 8) 4 días luego de la IATF en relación al tamaño del folículo del cual se generó el cuerpo lúteo accesorio.

Ensayo I: Año 2

Inducción ovulatoria según la presencia folicular

El número de folículos de 2–5 mm previo al momento de la aplicación de los tratamientos fue similar en todos los grupos (**Tabla 4**; P> 0,05).

Los grupos experimentales GnRH y hCG presentaron un mayor número de CL acc en comparación con el Grupo Control (0,7±0,4 vs 0,0±0,0, P< 0,01). No hubo diferencias en el número de CL acc inducidos entre el Grupo GnRH y hCG (0,5±0,5 vs. 0,8±0,4; P> 0,05; **Tabla 4**).

El tamaño del folículo del cual se generó el CL acc fue de 3, 4 y 5 mm en los grupos GnRH y hCG, y no hubo diferencias entre los grupos (P> 0,05). La ubicación de los CL acc se correspondió con la del folículo de mayor tamaño presente en el ovario al momento de aplicar los tratamientos hormonales, indistintamente si estaba ipsilateral o contralateral al CL po.

Tabla 4. Población folicular y número de cuerpos lúteos presentes en ovejas, tratadas a los 4 días posinseminación a tiempo fijo con 4 µg de un análogo de hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), 300 UI de gonadotrofina coriónica humana (hCG) o 1 ml de solución fisiológica (Control).

Estructuras ováricas		Grupo Experimental			P
		GnRH (n= 12)	hCG (n= 12)	Control (n= 12)	
Diámetro de los folículo	2 mm	7,2±5,3	6,7±2,9	6,7±3,2	0,9
	3 mm	2,2±1,2	1,9±1,1	2,4±1,2	0,7
	4 mm	1,1±0,3	1,4±0,5	1,3±0,7	0,8
	5 mm	1,2±0,6	1,0±0,0	1,0±0,0	0,5
Cuerpo lúteo	posovulatorio	1,1±0,3	1,1±0,3	1,0±0,0	0,6
	accesorio	0,5±0,5[b]	0,8±0,4[b]	0,0±0,0[a]	0,0001

Los valores se expresan como Medias ± error estándar de la media. Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (P≤ 0,05).

Concentración de progesterona

En ovejas preñadas, la concentración sérica de P4 del Grupo hCG fue mayor en los d 10, 14, 17, 21, 28 y 35, en comparación con los animales preñados de los Grupos GnRH y Control (P≤ 0,05) **(Figura 4)**.

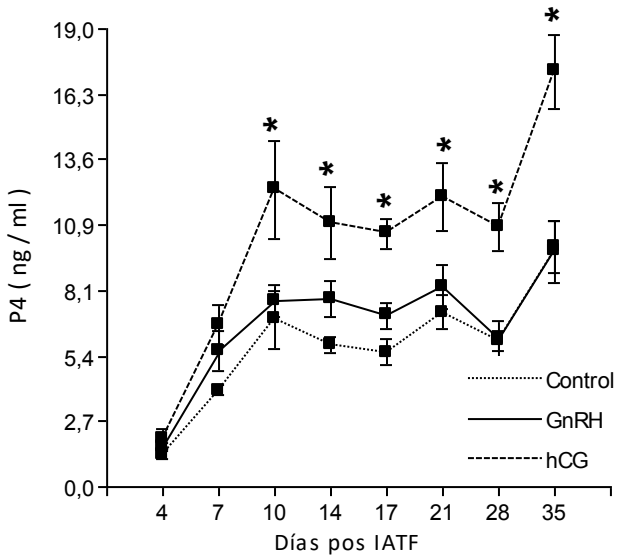

Figura 4. Concentración de progesterona (P4) obtenida de ovejas preñadas los 4, 7, 10, 14, 17, 21, 28 y 35 días luego de la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF), en respuesta al tratamiento con 4 µg de hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH; n= 9; línea continua), 300 UI de gonadotrofina corionica humana (hCG; n= 7; línea discontinua), o solución fisiológica (Control; n= 10; línea de puntos) 4 días luego de la IATF. (*) indica diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (P≤ 0,05).

La concentración de P4 en las ovejas preñadas y tratadas con la hCG que generaron CL acc fue mayor comparada con las ovejas que no generaron CL acc (P≤ 0,05; **Figura 5**). No se observaron diferencias en las concentraciones de P4 en el Grupo GnRH entre las ovejas que generaron CL acc y las que no generaron CL acc (P> 0,05; **Figura 5**).

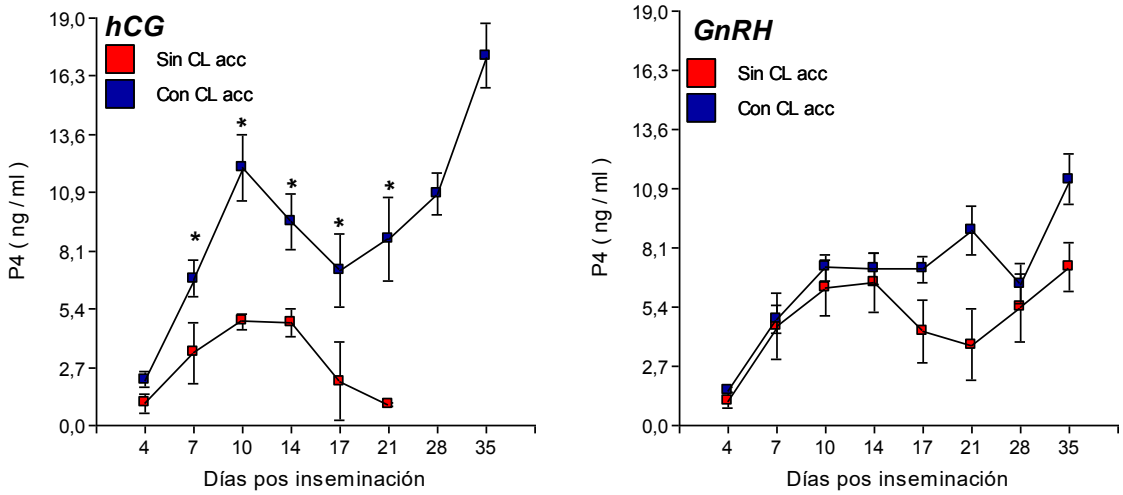

Figura 5. Concentración de progesterona (P4) en ovejas tratadas con hCG o GnRH a los 4 días posinseminación a tiempo fijo que generaron 1 CL accesorio (con CL acc) y que no generaron CL accesorio (sin CL acc). Grupo hCG: Con CL acc, n=10; Sin CL acc, n=2. Grupo GnRH: Con CL acc, n=6; Sin CL acc, n=6. * indica diferencias estadísticamente significativas (P≤ 0,05).

La concentración sérica de P4 obtenida en cada uno de los días evaluados fueron similares entre si independientemente del tamaño del folículo del cual se generó el CL acc, tanto en ovejas preñadas y tratadas con GnRH o hCG (P> 0,05; **Figura 6**).

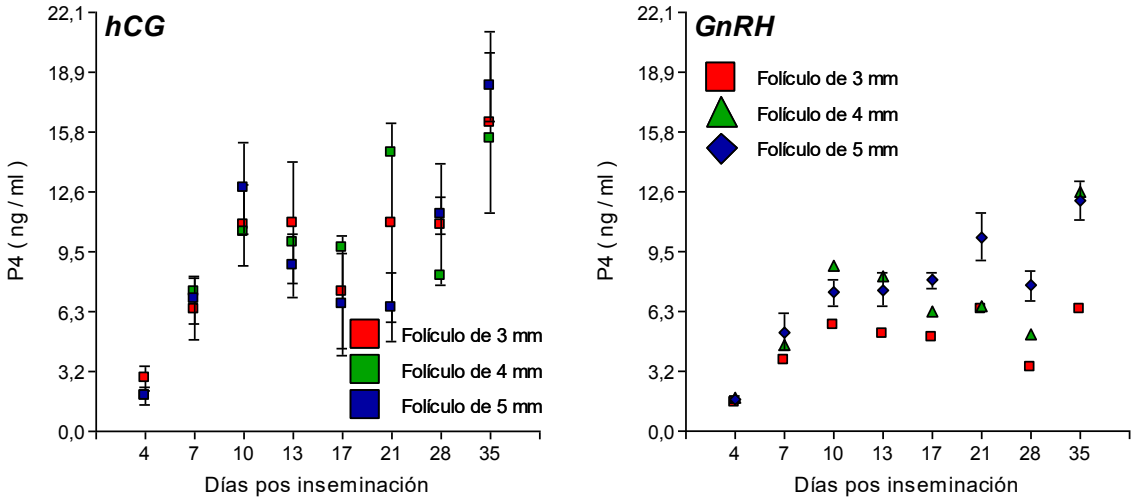

Figura 6. Concentración de progesterona (P4) en ovejas tratadas con 300 UI de gonadotrofina coriónica humana (hCG) o 4 µg de hormona liberadora de gonadotrófinas (GnRH) a los 4 días luego de la inseminación artificial a tiempo fijo según tamaño del folículo del cual se generó el CL accesorio.

En ovejas preñadas el mantenimiento del CL acc se observó hasta el d 21 del ciclo estral, en conjunto con el CL po. En los animales no preñados donde se observó la regresión del CL po a los 21 d del ciclo, también ocurrió la regresión conjunta del CL acc.

Concentración de LH

La concentración sérica de LH fue mayor entre las 2-6 h luego del tratamiento (momento en que fueron recolectadas las muestras sanguíneas) con GnRH comparada con los Grupos Control y hCG (10,6±5.2; 2,4±1,3; 3,1±2,4 ng/ml, respectivamente; P≤ 0,05; **Figura 7**). El aumento de la concentración de LH en el Grupo GnRH se observó solamente en las ovejas que generaron CL acc (12,1±1,6 y 7,1±2,3 ng/ml, respectivamente; P≤ 0,1).

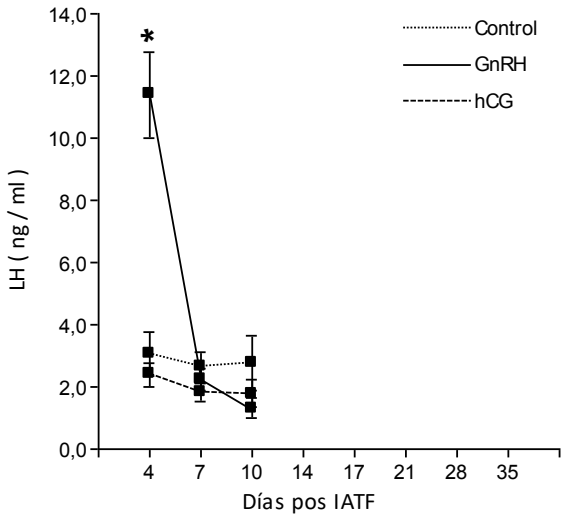

Figura 7. Concentración media de la hormona luteinizante (LH) en los 4, 7 y 10 días luego de la inseminación a tiempo fijo (IATF) en ovejas tratadas con 4 µg de un análogo de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH; n= 12; línea continua), 300 UI de gonadotrofina coriónica humana (hCG; n= 12; línea discontinua) o 1 ml de solución fisiológica (Control; n= 12; línea de puntos) a los 4 días luego de la IATF. (*) indica diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (P≤ 0,05).

Ensayo II

Inducción ovulatoria según la presencia folicular

El número de folículos de 2-5 mm al momento de la aplicación de los tratamientos fue similar en todos los grupos (**Tabla 5**; P> 0,05).

Los Grupos experimentales GnRH y hCG tuvieron un mayor número de CL acc comparado con el Grupo Control (1,2±0,4 vs. 0,0±0,0, P≤ 0,05). Además, no hubo diferencias en el número de CL acc inducidos entre el Grupo GnRH y el Grupo hCG (1,2± 0,5 vs. 1,3±0,5; P> 0,05).

Tabla 5. Población folicular y número de cuerpos lúteos presentes en ovejas tratadas a los 4 días posinseminación a tiempo fijo con 4 µg de un análogo de hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), 300 UI de gonadotrofina coriónica humana (hCG) o 1 ml de solución fisiológica (Control).

Estructura ovárica		Grupo Experimental			P
		GnRH (n= 10)	hCG (n= 10)	Control (n= 9)	
Diámetro del Folículo	2 mm	6,3±4,2	7,4±4,2	5,3±3,4	0,2
	3mm	1,3±1,5	1,2±1,2	0,9±1,0	0,4
	4mm	0,8±0,6	1,1±0,7	0,8±1,0	0,3
	5mm	0,7±0,7	0,8±0,6	0,9±0,9	0,6
Cuerpo lúteo	posovulatorio	1,2±0,4	1,3±0,5	1,4±0,5	0,5
	accesorio	1,2±1,2[b]	1,3±0,5[b]	0,0±0,0[a]	0,0001

Los valores se expresan como Medias ± error estándar de la media. Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas (P≤ 0,05).

El tamaño del folículo del cual se generó CL acc fue de 3, 4 y 5 mm en los grupos GnRH y hCG y no hubo diferencias entre los Grupos (P> 0,05). La ubicación de los CL acc se correspodío con la del folículo de mayor tamaño presente en el ovario, indistintamente si estaba ipsilateral o contralateral al CL po.

El tamaño de los CL po no difirió entre los grupos (GnRH: 0,90±0,05 cm; hCG: 0,90±0,06 cm; Control: 0,90±0,05 cm; P> 0,05). El tamaño de los CL acc tampoco difirió entre los tratamientos (GnRH: 0,90±0,07; hCG: 0,90±0,07; P> 0,05).

Concentración de progesterona

En ovejas preñadas, la concentración sérica de P4 del grupo hCG fue mayor en el d 14 posterior a la IATF, en comparación con los animales preñados de los Grupos GnRH y Control (P≤ 0,05; **Figura 8**).

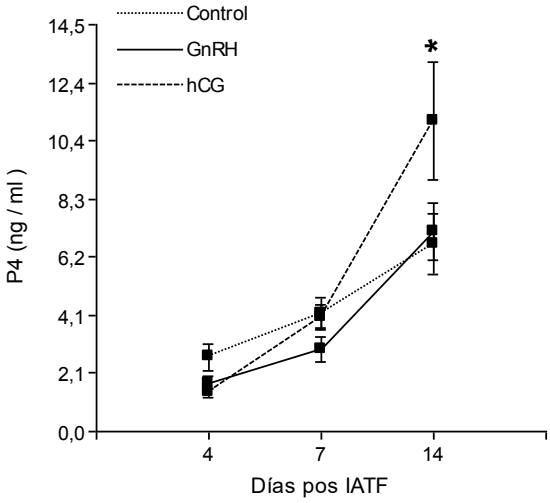

Figura 8. Concentración de progesterona (P4) en los días 4, 7 y 14 días luego de la inseminación a tiempo fijo (IATF) en ovejas tratadas con 4 µg de un análogo de hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH; n= 10; línea continua), 300 UI de gonadotrofina coriónica humana (hCG; n= 10; línea discontinua) o 1 ml de solución fisiológica (Control; n= 9; línea de puntos) a los 4 días luego de la IATF. (*) indica diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (P≤ 0,05).

Características histológicas y funcionales de los cuerpos lúteos

El número total de células luteales grandes, tanto en los CL po como CL acc, fue mayores en los animales tratados con hCG comparado con los animales del Grupo GnRH y el Grupo control (P≤ 0,05) (**Tabla 6; Figura 9**).

Tabla 6. Número de células luteales grandes en el tejido en los cuerpos lúteos a los 14 días posinseminación luego del tratamiento con GnRH, hCG o solución fisiológica a los 4 días luego inseminación artificial.

Células lúteales grandes		Grupo Experimental			P valor
		GnRH	hCG	Control	
Cuerpo lúteo	posovulatorio	72,6±2,0[b]	81,8±1,9[c]	65,5±2,4[a]	0,0001
	accesorio	73,6±1,9[a]	81,3±2,2[b]	nd	0,005

Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (P≤ 0,05).

nd: no hay datos.

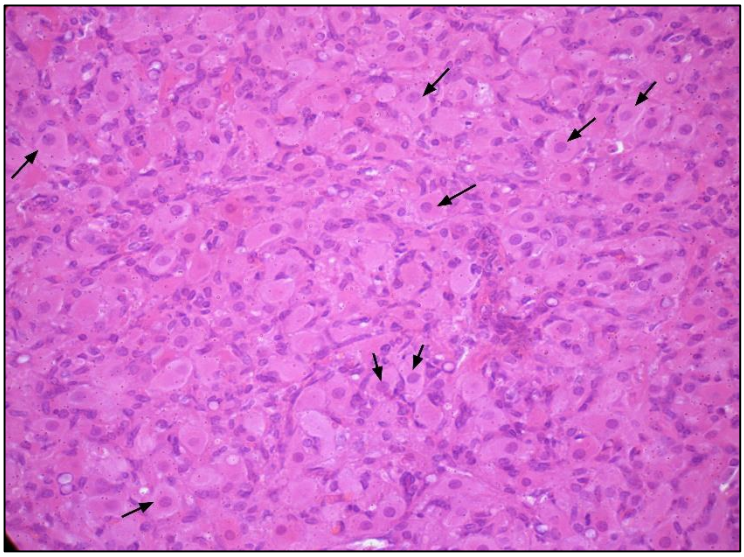

Figura 9. Imagen microscópica representativa del tejido luteal de una oveja del Grupo Control observada bajo un aumento de 40x. Se obsevan las células luteales grandes, indicadas con flechas negras.

En la **Figura 10** se observan imágenes representativas de los cortes histológicos de CL inmunomarcados con anticuerpos anti STAR y anti 3 β HSD.

El área positiva (área inmunomarcada) para 3 β HSD y STAR fue mayor en el Grupo hCG comparado con los Grupos GnRH y Control (P≤ 0,05) cuando se consideró el

tejido luteal total (tejido del CL po y CL acc). Los animales tratados con hCG presentaron una mayor área positiva para 3 β HSD y STAR en los CL acc comparada con el grupo GnRH (P≤ 0,05; **Figura 11**). Sin embargo, la expresión de 3 β HSD fue mayor en el Grupo hCG comparada con el Grupo GnRH y Control (P≤ 0,05; **Figura 11**), a diferencia de la expresión de STAR fue mayor en los grupos GnRH y hCG comparado con el Grupo Control (P≤ 0,05; **Figura 11**).

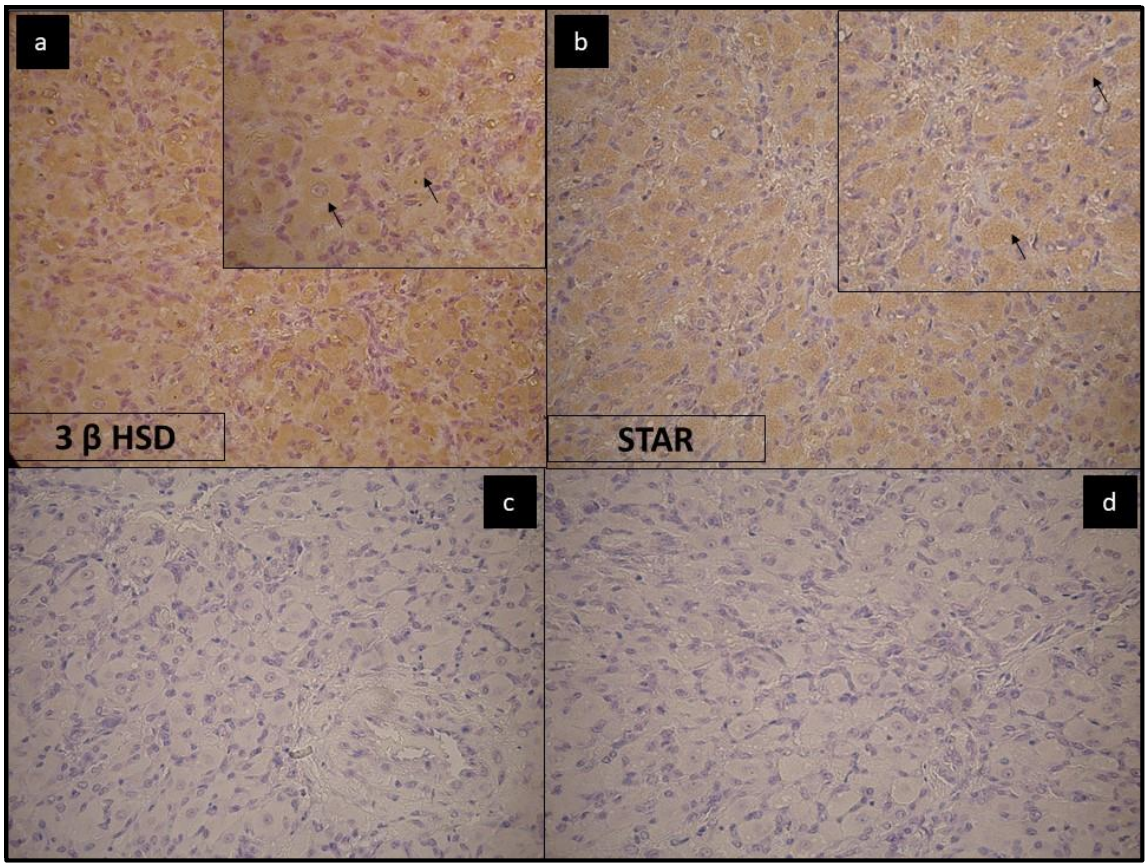

Figura 10. Imágenes representativas del marcado inmunohistoquímico de muestras de cuerpos lúteos, para la enzima 3 β hidroxideshidrogenasa (3 β HSD; a) y el transportador STAR (b) y sus respectivos controles negativos (c y d). La flecha indica la marcación en células luteales.

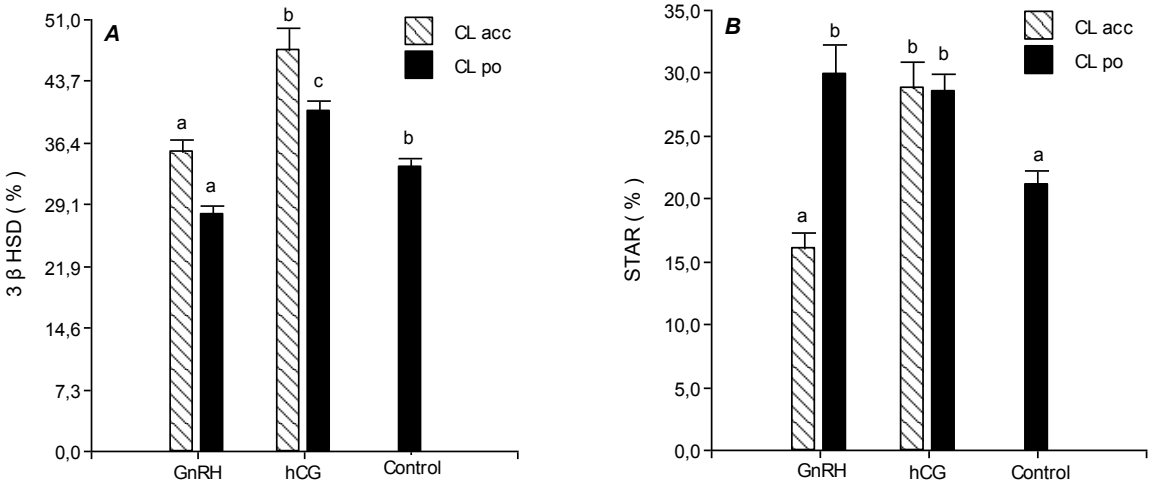

Figura 11. Área positiva inmunomarcada con anticuerpos para la enzima 3 β hidroxideshidrogenasa (3 β HSD; *A*) y el transportador STAR (*B*) sobre los cuerpos lúteos posovulatorios (CL po, barras sólidas negras) y cuerpos lúteos accesorios (CL acc, barras con líneas en diagonal) en ovejas tratadas con la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH; 4 µg de Buserelina; n= 3); la gonadotrofina coriónica humana (hCG; 300 UI; n= 3) o solución fisiológica (Control; 1 ml; n= 3) a los 4 días posinseminación. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P≤ 0,05).

Se analizó la expresión génica de las principales proteínas involucradas en la síntesis de P4 (STAR, 3 β HSD y P450), considerando los distintos tratamientos (GnRH, hCG y Control) y tipos de CL (CL po y CL acc).

El tratamiento con hCG evidenció una mayor expresión génica tendencial de los tres principales miembros de la síntesis de P4 en los CL acc comparado con el Grupo GnRH (**Figura 12**; P≤ 0,1). No se observó una diferencia estadística en la expresión génica de STAR y P450 en los CL po entre los tres tratamientos (P> 0,05) (**Figura 12**). Se evidenció una tendencia significativa al aumento en la expresión génica de la 3 β HSD

de los CL po en el Grupo Control respecto a los otros dos grupos de tratamiento (P< 0,1).

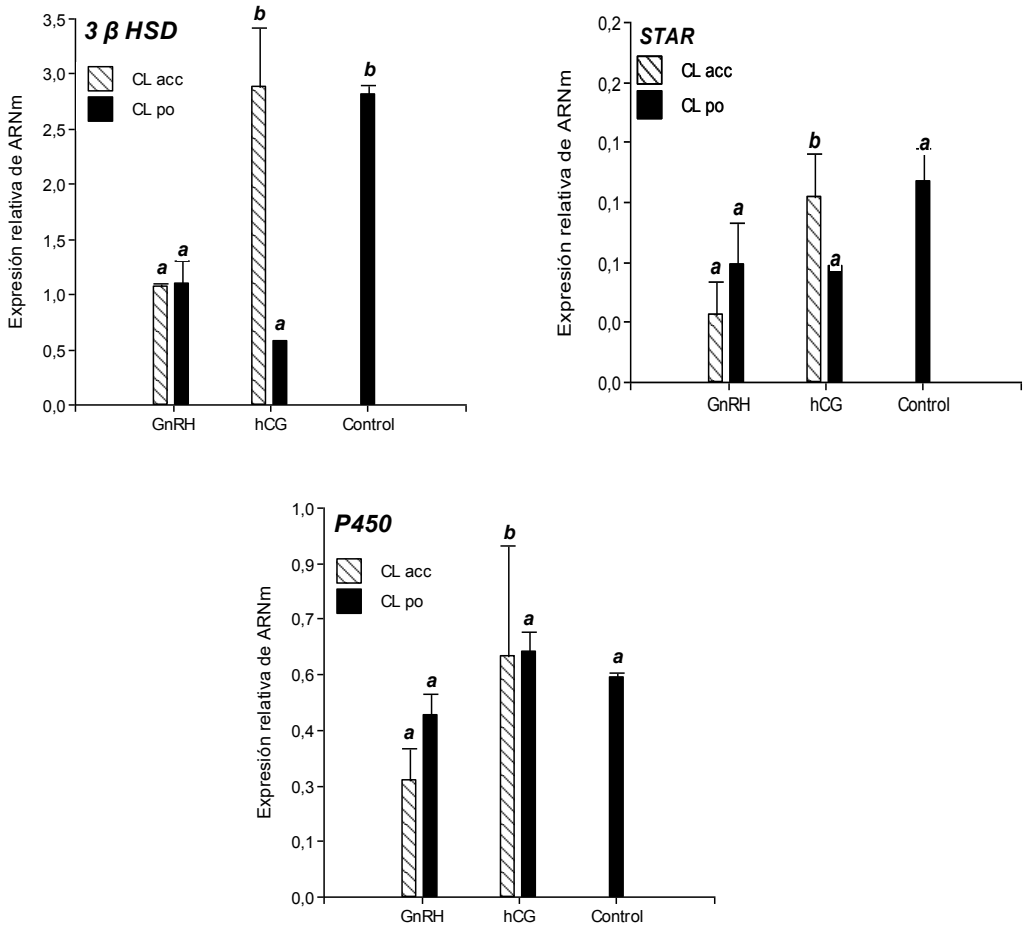

Figura 12. Expresión génica diferencial de los genes 3 β HSD, STAR y P450, normalizados a actina, determinados por qRT-PCR en biopsias de cuerpos lúteos posovulatorios (CL po; barras sólidas) y accesorios (CL acc; barras con líneas en diagonal) de ovejas luego de la administración de GnRH, hCG o solución fisiológica (Control) a los 4 días posinseminación. Letras diferentes indican diferencias con tendencia estadísticamente significativas (P≤ 0,1).

5.2- Sección Experimental II

Efecto del tratamiento con GnRH o hCG a los 4 días posinseminación sobre la eficiencia reproductiva en ovejas Merino.

Ensayo III

Eficiencia reproductiva

Los resultados sobre la eficiencia reproductiva en los grupos GnRH, hCG o Control se presentan en la **Tabla 7**. No se observaron diferencias en la tasa de preñez entre grupos (P> 0,05). Las pérdidas de preñez en el d 33 luego de la IATF fueron menores en el grupo hCG en comparación con los grupos GnRH y Control (P≤ 0,05). Las pérdidas de preñez entre el d 33 y el d 90 luego de la IATF fueron no significativas (P> 0,05). La LCC del embrión (d 33) no aumentó en los grupos GnRH o hCG en comparación con el grupo Control (P> 0,05). Sin embargo, fue menor en el Grupo GnRH en comparación con el Grupo Control (P≤ 0,05). La prolificidad tendió a ser mayor en el Grupo GnRH en comparación con los Grupos hCG y Control (P≤ 0,1). El PVn de los corderos de nacimientos simples no difirió entre los grupos (P> 0,05). El PVn de los corderos de nacimientos dobles en el Grupo GnRH tendió a ser mayor que en el Grupo Control (P≤ 0,1).

Tabla 7. Eficiencia Reproductiva en ovejas Merino tratadas con hCG, GnRH o solucion fisiológica (Control) en el día 4 posinseminación artificial a tiempo fijo (IATF).

Parametros Reproductivos		Grupo Experimental			*P*
		GnRH n= 99	hCG n= 92	Control n= 97	
Tasa de preñez d 33 (%)		58,6 (58/99)	57,6 (53/92)	65,0 (63/97)	0,6
Pérdida de preñez d 33 (%)		3,0[b] (3/99)	0,0[a] (0/92)	7,2[b] (7/97)	0,04
Tasa de preñez d 90 (%)		58,6 (58/99)	57,6 (53/92)	63,9 (62/97)	0,6
Pérdida de preñez entre d 33- 90 (%)		0,0 (0/99)	0,0 (0/92)	1,0 (1/97)	0,5
LCC del embrión (cm; n= 12)		1,7±0,2 [a]	1,8±0,2[ab]	1,9±0,3[b]	0,03
Prolificidad		1,2 [c]	1,0 [a]	1,1 [b]	0,06
PVn (kg)	**Simple (n= 100)**	4,4±0,7 (28)	4,3±0,6 (38)	4,5±0,6 (34)	0,4
	Doble (n= 22)	3,6±0,2[b] (14)	0,0±0,0[c] (0)	3,2±0,2[a] (8)	0,09

[a, b, c]: Diferentes letras en la misma fila indican P≤ 0,05 (significación estadística) o P≤ 0,1 (significación estadística tendencial). d: días. LCC: Longitud cráneo caudal del embrión. PVn: peso vivo al nacimiento del cordero.

Factores asociados: fertilidad de los carneros y condición corporal de las ovejas

Se evidenció un efecto de los carneros utilizados en la IATF sobre la tasa de preñez (46,5; 59,6; 67,6; 69,4 y 76,0% para los Caneros A, B, C, D, E, respectivamente; P≤ 0,05). Debido a este efecto, las ovejas se agruparon en aquéllas inseminadas con carneros de alta o baja fertilidad (alta, carneros que produjeron > 65% de preñez, n= 3; baja, carneros que produjeron ≤ 65% de preñez, n= 2). Se presentó una diferencia significativa en la tasa de preñez entre las ovejas inseminadas con carneros de fertilidad alta o baja en el grupo hCG (P≤ 0,05; **Tabla 8**). Sin embargo, esta diferencia no se observó en los grupos GnRH o Control (P> 0,05).

Tabla 8. Tasa de preñez a los 33 días posinseminación en ovejas Merino tratadas con GnRH, hCG o solución fisiológica (Control) a los 4 días pos inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) considerando la fertilidad de los carneros.

Carneros	Grupo Experimental			Total % (n= 288)
	GnRH % (n= 99)	hCG % (n= 92)	Control % (n= 97)	
Alta fertilidad	66,7[a] (24/36)	80,0[a] (24/30)	65,6[a] (21/32)	70,4[a] (69/98)
Baja fertilidad	54,0[a] (34/63)	46,8[b] (29/62)	63,1[a] (41/65)	54,7[b] (104/190)

Alta fertilidad: carneros que produjeron > 65% de preñez (n= 3); baja fertilidad carneros que produjeron ≤ 65% de preñez (n= 2) de preñez. Letras diferentes en la misma columna indican P≤ 0,05.

Las ovejas se agruparon en CC alta y baja al momento de la IATF (alta:> 2; baja: ≤ 2). La tasa de preñez en ovejas con alta CC tendió a ser más alta en comparación con las ovejas con baja CC (P≤ 0,1; **Tabla 9**).

La tasa de preñez en ovejas con alta CC no fue diferente entre los grupos experimentales. Sin embargo, las ovejas con baja CC y tratadas con GnRH tuvieron una tasa de preñez más alta que las ovejas tratadas con hCG o solución salina (interacción de CC por tratamiento; P≤ 0,05; **Tabla 9**).

Tabla 9. **Porcentaje de preñez a los 33 días en ovejas Merino tratadas con GnRH, hCG o solución fisiológica (Control) a los 4 días posinseminación artificial a tiempo fijo (IATF) de acuerdo a la condición corporal (CC) de las ovejas al servicio.**

CC	Grupo Experimental			Total % (n= 288)
	GnRH % (n= 99)	hCG % (n= 92)	Control % (n= 97)	
CC > 2	54,2[a] (45/83)	61,5[a] (48/78)	68,5[a](50/73)	60,2 (143/234)[A]
CC ≤ 2	81,3[a] (13/16)	35,7[b] (5/14)	50,0[b] (12/24)	52,4 (30/54)[B]

[a, b]: Letras diferentes en la misma fila indican P≤ 0,05. [A, B] Letras diferentes en la misma columna indican P≤ 0,1.

6. DISCUSIÓN

6.1- Sección Experimental I

Efecto del tratamiento con GnRH o hCG a los 4 días posinseminación sobre la inducción ovulatoria según la presencia folicular, las características histológicas y funcionales de los cuerpos lúteos y la concentración de progesterona en ovejas Merino.

Inducción ovulatoria según la presencia folicular para la formación de cuerpos lúteos accesorios

Los resultados obtenidos evidenciaron que la aplicación de GnRH o hCG en el d 4 luego de la IATF generan la formación de CL acc, confirmando la hipótesis propuesta. De acuerdo con estos resultados, Hashem y col. (2014) informaron la formación de un CL acc después de la administración de 4 µg de un agonista de GnRH en el d 7 luego del celo. Además, Lankford y col. (2010) informaron la presencia de dos o más CL acc luego de la aplicación de 200 UI de hCG a los días 4, 7 y 10 después del inicio del estro. Resultados similares fueron reportados por dos trabajos de Khan y col. (2007; 2009) luego de la aplicación de hCG a los 12 d postcelo. Estos datos en conjunto confirman la capacidad de estos tratamientos hormonales para inducir la ovulación y formación de uno o más CL acc luego de su aplicación durante la fase luteal. Sin embargo, los resultados demuestran que, la administración de GnRH no es capaz de inducir la formación de CL acc en todos los casos. Hay una variabilidad de la respuesta individual de los animales a la aplicación de los tratamientos que posiblemente pueda

deberse a las caraterísticas intrínsecas de cada oveja. A su vez, se observó en esta tesis que los animales que fueron tratados con GnRH y formaron CL acc presentaron un incremento de la LH. El incremento de la concentración sérica de LH fue reportado por Khan y col. (2007) luego de la aplicación de GnRH a los 12 d postservicio; sin embargo, no reporta informacion sobre la generación de CL acc.

En ovejas preñadas el mantenimiento del CL acc se observó hasta el d 21 del ciclo estral, en conjunto con el CL po. En los animales no preñados se observó la regresión del CL po a los 21 d del ciclo estral, y en forma conjunta la regresión del CL acc. En los bovinos se ha reportado que la mayoría de los CL acc inducidos por la hCG, persisten por un tiempo más corto, en comparación con el CL po (Rajamahendran y Sianangama, 1992; Stevenson y col., 2008). Otros autores coinciden reportando que el CL acc generado luego de la aplicación de hCG, parece similar al CL de corta duración descripto en el primer estro ovulatorio en vaquillonas prepuberales y vacas posparto (De rensis y col., 2010). Sin embargo, en el ovino, según los resultados presentados, no se encontraron diferencias en la vida media del CL acc hasta el d 21 del ciclo estral, con respecto a los CL po.

Al mismo tiempo, se ha informado que el aumento en la concentración de P4 es proporcional con el tamaño del CL (Kayacik y col., 2006). En un estudio llevado a cabo en vaquillonas tratadas con hCG en la fase luteal, se demostró que la hCG induce la formación de CL acc con hipertrofia del CL po (Rizos y col., 2012). Sin embargo, en el ovino, según los resultados presentados, se evidenció que los CL acc son semejantes en su morfología a los CL po.

Estos datos en conjunto confirman la capacidad de los tratamientos hormonales para inducir la formación de un CL acc de tamaño y vida media (durante la etapa de implantación embrionaria) similares al CL po en el ovino.

Los resultados de este trabajo proporcionan información inédita sobre el tamaño del folículo capaz de generar un CL acc, luego de la administración de GnRH o hCG. Ambos tratamientos hormonales pueden inducir la formación de un CL acc a partir de folículos de 3, 4 o 5 mm de diámetro. Los folículos que generaron CL acc fueron siempre los de mayor diámetro presentes al momento de realizarse los tratamientos hormonales. En el caso de que hubiera dos folículos grandes del mismo tamaño, sólo uno de ellos generó un CL acc. Esta información es consistente con observaciones previas en ovejas monovulares en las que el folículo ovulatorio es el folículo de mayor crecimiento presente en ambos ovarios en el momento de la luteólisis, alrededor de 2 a 4 días antes del inicio del celo (Gonzalez-Bulnes y col., 2001). Nuestros datos confirman que al igual que existe una gran variabilidad en el tamaño a partir del cual se puede seleccionar el folículo ovulatorio (Tsonis y col., 1984), también existe variabilidad en los folículos que son factibles de luteinizar ya que se indujeron CL acc a partir de folículos de 3, 4 o 5 mm. Por otra parte, estudios moleculares sobre los receptores de la LH demostraron que su ARNm se expresa en las células tecales internas de folículos antrales y que su nivel de expresión aumenta con el tamaño del folículo (Xu y col., 1995), confirmando la posibilidad de la acción de la LH sobre los fóliculos de diverso tamaño.

Concentración sérica de progesterona

La concentración sérica de P4 sólo aumentó luego de la administración de hCG, a los 4 d luego de la IATF, en comparación con el Grupo GnRH o Control. Esto coincide con los resultados de estudios previos, donde se informó que la aplicación de hCG en los días 6 o 9 (Ishida y col., 1999), 3, 4 y 5 ó 4 (Fukui y col., 2001), 4, 7 y 10 después del estro (Lankford y col., 2010) indujeron CL acc y aumentaron la concentración plasmática de P4 en comparación con grupos no tratados. También se determinó que la administración de hCG induce un aumento en la actividad similar a la LH (Seguin y col., 1977; Schmitt y col., 1996) durante un período de tiempo más largo (30 h) en comparación con la duración del aumento de la LH (5 h) provocado mediante una inyección de un agonista de GnRH (Chenault y col., 1990). Además, la tasa de internalización (tØ) de hCG unida al receptor de LH en las células lúteas ovinas (tØ=22.8 h) es mucho más lenta que la de la LH ovina (tØ=0.4 h), siendo esta la explicación más probable para las diferencias observadas. Es decir que la tasa más lenta de internalización del complejo receptor de hCG-LH sería la responsable del aumento de la secreción de P4 plasmática observada cuando las células lúteas ovinas son tratadas con hCG (Schmitt y col., 1996). Por lo tanto, además de inducir la formación de un CL acc, la hCG podría ejercer efectos luteotrópicos al estimular directamente la producción de P4 (Binelli y col., 2001), tanto en el CL acc como en el CL po (Sirjani y col., 2011).

Los resultados de esta tesis demuestran que la administración de GnRH a los 4 d luego de la IATF no aumenta la concentración de P4. Esto, contrasta con los hallazgos previos en los que el agonista de GnRH aplicado el día del estro (Sirjani y col., 2011; Cavalcanti y col., 2012) o el día 12 después del servicio (Beck y col., 1996; Cam y col.,

2002; Lashari y Tasawar, 2013), aumenta la concentración de P4 en plasma. En este mismo sentido, Webb y col. (1992) reportaron en vacas que el CL acc generado por la administración de la GnRH podría llegar a convertirse en una estructura completamente funcional, con un peso luteal y generar una concentración de P4 similar a los 7 días después de la inducción, comparado con el CL formado espontáneamente de edad similar. Pero no concuerdan con otros autores que han reportado que la administración de GnRH 12 o 10 d postservicio no incrementa la concentración de P4 (Beck y col., 1996; Ishida y col., 1999), siendo estos resultados similares a los obtenidos en esta tesis. Las discrepancias observadas probablemente se deban a diferencias en los modelos experimentales usados (raza, estado fisiológico, dosis usada, momento de aplicación).

Las posibles explicaciones para las diferencias observadas en esta tesis en las acciones de la hCG o GnRH podrían estar relacionadas con diferencias en la dinámica de la exposición a la LH, debido a la farmacocinética y farmacodinamia particular de cada hormona, lo que induciría la formación de un CL acc con diferentes capacidades esteroidogénicas (Schmitt y col., 1996; Maillo y col., 2014). La GnRH tiene un efecto principal indirecto sobre el ovario, actuando sobre los receptores hipofisarios para estimular la liberación de LH, que a su vez actúa sobre el ovario. Sin embargo, una acción directa de la GnRH sobre el ovario no puede descartarse ya que los receptores periféricos de GnRH se expresan en las células de la granulosa de los folículos preovulatorios y en las células luteales de la granulosa (Choi y col., 2006). La afinidad de la GnRH por estos receptores parece ser más débil que la afinidad por los receptores centrales, y se ha demostrado que su activación por los agonistas de la

GnRH tiene efectos antiproliferativos/proapoptóticos (So y col., 2008; Yu y col., 2011). En primates, la inducción de la ovulación con GnRH o un agonista de GnRH promovió el desarrollo de un CL con capacidades secretoras de P4 subóptimas en comparación con la inducción de la ovulación con hCG (Zelinsky-Wooten y col., 1991); en concordancia con los resultados de la presente tesis. Una de las explicaciones fisiológicas podría ser que, el incremento preovulatorio espontáneo de LH dura de 8 a 10 h, mientras que el inducido después de la administración de GnRH o agonista de GnRH dura solo de 3 a 5 h (Ambrose y col., 1998) produciendo, probablemente, un CL acc con poca capacidad esteroideogénica. En este sentido, Ambrose y col. (1998) postularon que la exposición prolongada de células de la teca y de la granulosa del folículo preovulatorio a altos niveles de LH podría ser crucial para el desarrollo posterior de un CL robusto y con alta capacidad secretoria de P4.

La concentración sérica de P4 en las ovejas tratadas con GnRH o hCG no se modificó de acuerdo con el tamaño del folículo a partir del cual se generaron los CL acc. Esto indicaría que, independientemente del tamaño folicular del que se origina el CL acc, se conforma un CL acc funcional. En contraste, Binelli y col. (2001) informaron que en los bovinos el tamaño del folículo dominante está asociado con el tamaño del CL po, lo que proporcionaría una mayor concentración de P4. Se deberían hacer más ensayos comparativos para ser concluyentes y determinar si no hay diferencias entre especies.

En el segundo año del Ensayo I, se observó que los animales tratados con hCG y que generaron CL acc incrementaron la concentración de P4 con respecto a los que no generaron CL acc. Sin embargo, este incremento en la P4 no se observa en el Grupo GnRH. Esto indicaría que en el ovino los CL acc inducidos por la hCG o la GnRH serian

distintos funcionalmente. Este punto se discutirá a continuación en la funcionalidad de los CL acc.

Características histológicas y funcionales de los cuerpos lúteos

La funcionalidad de los CL inducidos por los tratamientos hormonales posinseminación/servicio, se ha determinado a través de la concentración sérica de P4 (Beck y col., 1996; Ishida y col., 1999; Fukui y col., 2001; Lankford y col., 2010). En la bibliografía, se sostienen dos hipótesis sobre el aumento en la concentración sérica de P4; una se basa en que, a mayor cantidad de CL, mayor concentración de P4 debido a un incremento en el número de las células luteales (Lankford y col., 2010; Hashem y col., 2014; Coleson y col., 2015) y la otra en que el aumento de la concentración de P4 se debe a la cantidad y la capacidad del tejido esteroidogénico para producir P4 y no sólo al número de CL (Schmitt y col., 1996; Maillo y col., 2014). Los resultados de esta tesis, concuerdan con esta última hipótesis, ya que se demostró que a pesar de que las características histológicas difieren entre los tratamientos, los principales mediadores (3 β HSD, STAR, P450) que participan en la síntesis de P4 fueron diferentes sólo en los CL acc de los animales tratados con hCG. Esto también concuerda con los resultados de la inducción de CL acc y la concentración plasmática de P4.

Por un lado, el número de células luteales grandes fue superior en los CL po y acc de los animales tratados con hCG o GnRH, comparado con el Grupo Control. Además, entre los dos tratamientos hormonales, el número de las células luteales grandes de los CL po y acc fue mayor en el Grupo hCG. Similares resultados fueron encontrados en respuesta al tratamiento con hCG en los d 5 y 7,5 del ciclo estral en ovejas, en cuanto a

la proporción de células luteales grandes, aumentando el área del cuerpo lúteo capaz de sintetizar P4 (Farin y col., 1988). En vacas, luego de la aplicación de hCG a los 5 d postcelo o los 7 d pos IA, se observó un mayor tamaño de las células luteales (Schmitt y col., 1996), una mayor cantidad de células lúteales grandes y una reducción en el número de células luteales pequeñas, conjuntamente con un aumento del área, volumen y diámetro del CL (Rajamahendran y Sianangama, 1992). Por el contrario, un estudio en llamas demostró que el número de células luteales grandes no difirió entre animales tratados con el Factor de crecimiento nervioso de origen seminal plasmático (spβ-NGF, un potente factor ovulatorio y luteotrófico) o GnRH cuando el folículo tenía un tamaño mínimo de 8 mm (Silva y col., 2017). El incremento en el número de células luteales grandes podría deberse a una estimulación de la conversión de células luteales pequeñas a grandes (Farin y col., 1988).

La producción de P4 depende de las enzimas involucradas en su síntesis y se sabe que un incremento de la concentración de P4 sérica se correlaciona con un incremento en la expresión luteal de P450, STAR y 3 β HSD (Scotti y col., 2011). Los resultados de esta tesis no demostraron diferencias en la expresión de ARNm de 3 β HSD, STAR y P450 en el CL po entre los tratamientos, pero sí en el área inmunomarcada con los anticuerpos específicos para 3 β HSD y STAR. Esta diferencia en los resultados podría deberse a dos causas probables: 1) existe un incremento de dichas proteínas a pesar de que no haya mayor transcripción génica, es decir, existiría una regulación de tipo postranscripcional o, 2) simplemente se debe a una diferencia en el número de muestras procesadas para cada uno de los ensayos. Sin embargo, al considerar el CL acc, los animales tratados con hCG generaron un CL con diferentes capacidades

funcionales, manifestadas por un aumento de la expresión de las tres enzimas estudiadas en comparación con el Grupo GnRH. Resultados similares en vacas, fueron observados en el tratamiento de las células luteales con P4, reportándose un aumento del ARNm para STAR, P450 y 3 β HSD y sus productos proteícos (Rekawiecki y col., 2005). A su vez, investigaciones anteriores en bovinos habían demostrado que la P4 puede estimular su propia síntesis (Pate, 1996) mediante el aumento de la actividad de 3 β HSD (Caffrey y col; 1979; Kotwica y col, 1998; 2004). Un estudio reciente realizado en llamas demostró que si bien, el spβ-NGF incrementa la producción de P4 al incrementar la transcripción de P450 y STAR y por tanto el transporte de colesterol y la secreción de pregnenolona, no se observaron dichos efectos en las hembras tratadas con GnRH (Silva y col., 2017).

Además, los resultados de esta tesis dan respuesta a lo que según nuestro conocimiento aún no estaba claro; el aumento de la P4 plasmática luego del tratamiento con hCG o GnRH depende i) de la secreción del CL presente al momento de la aplicación, ii) de una secreción adicional de P4 proveniente de la estructura lútea inducida o iii) de una combinación de estas. Por un lado, Fricke y col. (1993) sostenian que las concentraciones plasmáticas de P4 probablemente se debían a los efectos de la hCG sobre la función del CL que estaba presente en el momento de la administración de la la hCG en vacas (6 d posteriores al celo). Por otro lado, Schmitt y col. (1996) reportaron que la administración de un agonista de la GnRH o hCG en vacas indujo un CL acc funcional responsable del incremento posterior de la P4 plasmática. Esta tesis demuestra resultados inéditos en los ovinos en la expresión de 3 β HSD, STAR y P450 en los CL acc, demostrando que los CL acc inducidos por la hCG son funcionalmente

diferentes a los CL acc inducidos por la GnRH, lo que finalmente se refleja en una mayor concentración sérica de P4. Esto, como fue discutido anteriormente, podría ser el resultado de las diferencias en la farmacodinamia y farmacocinética de estas dos hormonas que inducirían CL con capacidades esteroidogénicas distintas. Mayor información se debería disponer para determinar si se presentan diferencia morfológicas y funcionales entre especie, en relación a los CL acc generados según el tratamiento hormonal.

6.2- Sección Experimental II

Efecto del tratamiento con GnRH o hCG a los 4 días posinseminación sobre la eficiencia reproductiva en ovejas Merino.

Porcentaje de preñez

Los resultados no sostienen la hipótesis de que el tratamiento con GnRH o hCG a los 4 d luego de la IATF mejora el porcentaje de preñez. En coincidencia, Fukui y col. (2001) reportaron que la administración de hCG en el d 4 luego de la IA, no mejoró la fertilidad. Otros autores observaron resultados similares después de la aplicación de GnRH, hCG o eCG en la fase luteal media (Ishida y col., 1999; García-Pintos y Menchaca, 2017). En contraste, otros investigadores observaron un incremento del 10-20 % en el porcentaje de preñez cuando las ovejas fueron tratadas con hCG o GnRH al momento del servicio o en la fase luteal (7, 11 o 13 d postservicio o IA) (Kittok y col., 1983; Nephew y col., 1994; Beck y col., 1996; Khan y col., 2003; Cam y Kuran., 2004; Khan y col., 2007; Moeini y col., 2009; Mirzaei y col., 2014). La variabilidad entre los resultados puede

deberse a la utilización de diferentes protocolos, sistemas productivos o al estado nutricional o fisiológico de las hembras resultado de distintas condiciones experimentales. Además, la utilización de diferentes razas, momentos en el que se aplica el tratamiento o la dosis utilizada puede influir en la respuesta al tratamiento. El porcentaje de preñez general en este trabajo fue del 60,2 %; similares resultados han sido reportados con los mismos métodos de sincronizacion de celos (58 y 65 % de preñez cuando fueron tratadas con PG o esponjas + eCG, respectivamente) (Cueto y Gibbons, 2011). Estudios más recientes también muestran tasas de preñez similares utilizando semen fresco y doble dosis de PG luego de ser inseminadas a TF (56,9 %) o mediante detección de celos (51,1 %; Fierro y col., 2016, 2017). A pesar de que el porcentaje de preñez en el presente estudio fue similar a los valores de referencia, los tratamientos con GnRH o hCG no incrementaron el porcentaje de preñez respecto a los animales no tratados.

Factores asociados: fertilidad de los carneros y condición corporal de las ovejas

Aunque la fertilidad del carnero y la condición corporal sobre la tasa de preñez no se consideraron inicialmente como variables en el estudio, se encontraron resultados relevantes en su influencia sobre la tasa de fertilidad. Cuando se emplea la IA en el ganado bovino, a menudo se observan variaciones en la fertilidad de los toros. Dichas variaciones pueden generar diferencias en la tasa de concepción de hasta un 15% (De Kruif, 1987). En este estudio, el tratamiento con hCG en ovejas inseminadas con carneros de alta fertilidad aumentó la tasa de preñez en un 41,5 puntos porcentuales

(pp) en comparación con las ovejas inseminadas con carneros de baja fertilidad, mientras que la diferencia fue menor en los grupos de GnRH y Control (19,0 y 3,8 pp, respectivamente). Dado que la proporción de carneros de alta y baja fertilidad asignada a cada grupo fue similar, es dable de pensar que las diferencias encontradas podrían deberse a una variación en el número de pérdidas embrionarias obtenida con los diferentes carneros (Chenoweth, 2007). Es de destacar que el efecto de la fertilidad de los machos como un factor a considerar en los tratamientos hormonales luego de la IA sobre la eficiencia reproductiva en las ovejas no se ha encontrado en la literatura previamente.

El porcentaje de preñez se incrementa cuando las ovejas tienen una CC que excede un umbral mínimo (Kenyon y col., 2014). La tasa de preñez aumenta en ovejas con CC > 2 (Gibbons y col., 1993; Catalano y col., 2006). En este trabajo, la tasa de preñez en ovejas con baja CC, fue mayor en el grupo de GnRH en comparación con los grupos de hCG y Control. A pesar de la falta de estudios sobre la relación entre la CC y el tratamiento hormonal en ovejas, los estudios sí existen en vacas. La administración de hCG en el día 5 o eCG en el día 22 luego de la IA aumentó la tasa de concepción, especialmente en vacas con baja CC (Santos y col., 2001; Bartolome y col., 2012). Varios estudios han informado una relación entre la baja CC y la falla en la fertilidad, aparentemente asociado con la no progresión de una preñez posterior (López Gatius y col., 2002).

Pérdidas de preñez

La administración de hCG 4 d luego de la IATF reduce las pérdidas de preñez en el d 33 pos IATF comparado con el Grupo GnRH y Control. Este efecto es probable que éste relacionado con la formación del CL acc y al incremento de la concentración sérica de P4 observado en el Ensayo I (Fernández y col., 2018). Resultados contrarios, fueron encontrados luego de la aplicación de eCG 10 d luego de la IA durante el segundo mes de gestación, registrándose mayores pérdidas en los animales tratados comparados con el Grupo Control (García-Pintos y Menchaca, 2017). Sin embargo, otros estudios demostraron que la administración de hCG mejora la función luteal y el establecimiento de la preñez (Bartolome y col., 2005). Esto podría deberse a la acción luteotrófica de la hCG, produciendo el incremento de la concentración de P4 requerido para generar un ambiente uterino adecuado, mejorar la sobrevivencia embrionaria y por lo tanto reducir las pérdidas embrionarias en rumiantes. Con respecto a la administración de GnRH no se encontraron disminución de las pérdidas embrionarias comparado con el Grupo Control. Estos resultados se encuentran en disonancia con aquellos obtenidos por Hashem y col. (2014) en ovejas, donde la suplementación con GnRH 7 d luego del celo reduce las pérdidas de gestación (d 40 postcelo al parto) resultando en una tasa de parición más alta respecto al Control. Las pérdidas embrionarias o fetales que ocurren desde el d 25 de la gestación en la oveja se asocian con bajas concentraciones séricas de P4 (Dixon y col., 2007). Resulta importante identificar las causas asociadas a las pérdidas gestacionales durante los períodos tempranos de gestación, siendo éste el momento donde se registran la mayor cantidad de dichas pérdidas (Lonergan y col., 2016). Los escasos estudios en ovinos han determinado que el porcentaje de pérdidas ocurridas durante la gestación son muy variables, por tanto sería necesario hacer más

estudios para determinar qué otros factores además del tratamiento con gonadotrofinas podrían implementarse para lograr disminuir las pérdidas de preñez.

Tamaño del embrión

En el presente estudio, la administración de GnRH o hCG 4 d luego de la IATF no aumentó la LCC del embrión. De hecho, estudios previos en ovejas mostraron que la administración de GnRH 12 d luego de la IA no afectó el crecimiento ni el peso embrionario o fetal (Cam y col., 2002; Cam y Kuran, 2004). En contraste, Cam y Kuran (2002) demostraron que la administración de hCG 12 d luego del servicio aumentó el peso y la LCC del feto a los 45 d de gestación. Un estudio posterior también mostró que la administración de GnRH o hCG aumentó el peso y la LCC del embrión (Khan y col., 2007). Catalano (2013), observó un efecto en la LCC producto de la administración de hCG 12 d luego del servicio, pero no el peso del feto. Las razones de los efectos estimulantes de los tratamientos con GnRH o hCG sobre el crecimiento del “conceptus” no están todavía totalmente dilucidados. Se postula que el aumento de la LCC está relacionado con las mayores concentraciones de P4 y la mayor producción de INF τ, proveyendo un ambiente uterino enriquecido en nutrientes y en factores de crecimiento altamente beneficioso para el desarrollo fetal y el RMP (Nephew y col., 1994; Barnes, 2000; Khan y col., 2003; Hansen y col., 2013). Sin embargo, parece poco probable que la GnRH o hCG puedan estimular directamente el crecimiento del “conceptus”, ya que hasta ahora no hay evidencia que sugiera que el embrión ovino tenga sitios de unión para estas hormonas (Khan y col., 2007).

Prolificidad

La oveja Merino criada en condiciones extensivas de la Patagonia es monoovulatoria. Kleemann y col. (1990) encontraron una respuesta positiva de las pérdidas parciales en ovulaciones múltiples en ovejas Merino. Sin embargo, en esta tesis se observó que las ovejas tratadas con GnRH 4 d luego de la IATF mejoran marginalmente la tasa de prolificidad en comparación con los Grupos hCG y Control. Según Cam y col., 2002 es posible que el tratamiento hormonal con GnRH evite la mortalidad de preñeces dobles al estimular el crecimiento fetal. Estos resultados son coincidentes con otros autores, quienes determinaron que los tratamientos hormonales con GnRH o hCG aplicados a los 7 días posinseminación lograron mantener la gestación y disminuyeron la mortalidad embrionaria en las ovejas que ovularon doble (Cam y col., 2002). En este mismo sentido, otros autores demostraron un incremento de la prolificidad mediante la administración de hCG o GnRH en la fase luteal tardía (11-13 d luego del servicio o inseminación; Cam y Kuran, 2004; Olfati y Moghaddam, 2013; Rostami y col., 2016). Por el contrario, otros investigadores no hallaron un incremento en la prolificidad luego de la administración de GnRH o hCG pos IA (Khan y col., 2009). El mantenimiento de la gestación es posible gracias a los cambios producidos en útero por el efecto de la P4 que favorecen la sobrevivencia del embrión (Garrett y col., 1988; Kleemann y col., 1994). Sin embargo, debido a que los resultados sobre la prolificidad son aún variables, futuros trabajos deberían realizarse con el objetivo de evaluar el efecto de las gonadotrofinas sobre la sobrevivencia del embrión y por consiguiente el aumento del número de corderos viables al nacimiento.

Peso al nacimiento de los corderos

Los resultados de esta tesis demostraron que los tratamientos con GnRH o hCG 4 d luego de la IATF no aumentan el PVn de los corderos de preñeces simples. Coincidentemente se informó que no hubo diferencias en el PVn de los corderos de preñeces simples después de la administración con la GnRH (Cam y Kuran y col., 2004; Olfati y Moghaddam, 2013). En contraste, otros autores mostraron un aumento en el peso de los corderos de preñeces simples después de la administración de la GnRH o hCG (Moeini y col., 2009; Moeini y col., 2013; Mirzaei y col., 2014). Por otro lado, los resultados obtenidos en esta tesis demostraron que el PVn de los corderos de partos dobles tiende a ser mayor (400 g) en el tratamiento con GnRH en comparación con el grupo Control. En coincidencia, Lashari y Tasawar (2010) observaron un incremento en el peso de los corderos nacidos de partos dobles luego del tratamiento con GnRH al momento del servicio. En contraste, Cam y col. (2002) no encontraron diferencias en el PVn de los mellizos luego de la aplicación de GnRH a los 12 d postservicio. No está del todo claro el mecanismo por el cual la GnRH o hCG incrementan el peso de los corderos al nacimiento. El efecto positivo de estas dos hormonas sobre el peso final del feto estaría relacionado con el efecto de la P4 sobre el útero y el ambiente uterino necesarios para el crecimiento y desarrollo embrionario o fetal (Garrett y col., 1988).

En conclusión, debido a que los resultados observados en el peso al nacimiento son aún variables, futuros trabajos deberían llevarse a cabo a fin de ampliar y profundizar la relación de los tratamientos con hCG o GnRH con el peso al nacimiento de los corderos y de encontrar los factores intervinientes.

7. CONCLUSIONES

Sobre la base de los resultados obtenidos en la sección I se concluye que:

- La administración de hCG o GnRH a los 4 días luego de la inseminación artificial:
    - Inducen la formación de un cuerpo lúteo accesorio a partir de folículos iguales o mayores a 3 mm.
    - No modifican la concentración sérica de P4 de acuerdo con el tamaño del folículo a partir del cual se generaron los cuerpos lúteos accesorios.
    - No incrementa el tamaño del cuerpo lúteo posovulatorio o accesorio.
    - Aumentan el número de células luteales grandes en los cuerpos lúteos posovulatorios.
    - No modifican la expresión de enzimas esteroidogénicas (3 β HSD, STAR, P450) en los cuerpos lúteos posovulatorios.
- La administración de hCG a los 4 días luego de la IATF:
    - Incrementa la concentración sérica de progesterona mediante la formación de cuerpos lúteos accesorios, entre los días 7 y 35 posinseminación.
    - Incrementa el número de células luteales grandes y la expresión génica de las enzimas esteroidogénicas en los cuerpos lúteos accesorios, con respecto a los inducidos por la GnRH. Dichas caractéristicas se relacionan con el incremento de la concentración de progesterona sérica.

Sobre la base de los resultados obtenidos en la sección II se concluye que:

- La administración de hCG o GnRH en el día 4 luego de la IATF no aumentó el porcentaje de preñez ni el tamaño del embrión.
- El tratamiento con hCG reduce las pérdidas de preñez en el día 33 después de la inseminación.
- El tratamiento con GnRH tiende a aumentar la prolificidad y el peso al nacimiento de corderos mellizos.
- La eficiencia reproductiva después de los tratamientos hormonales se ve afectada por factores externos como la fertilidad de los carneros utilizados en la inseminación artificial o la condición corporal de las ovejas en la inseminación artificial:
    - El tratamiento con hCG en ovejas inseminadas con carneros de alta fertilidad aumenta el porcentaje de preñez.
    - El tratamiento con GnRH aumenta el porcentaje de preñez en ovejas con baja condición corporal.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Ábalos M, Acuña F, Cancino A, Aller J. Effect of GnRH analogue administration on Day 7 after natural mating on formation accessory corpus luteum, progesterone concentration and conception rate in llamas (Lama glama). Animal Reproduction Science. 2018; 190: 47-52.
- Ahmadi E, Mirzaei A. High twin lambing rate of synchronized ewes using progestagen combined with the gonadotropins injection in breeding season. Revue Médecine Vétérinaire. 2016; 167: 28-32.
- Ambrose J, Pires M, Moreira F, Diaz T, Binelli M, Thatcher W. Influence of deslorelin (GnRH-agonist) implant on plasma progesterone, first wave dominant follicle and pregnancy in dairy cattle. Theriogenology. 1998; 50: 1157-1170.
- Arshad U, Qayyum A, Hassan M, Husnain A, Sattar A, Ahmad N. Effect of resynchronization with GnRH or progesterone (P4) intravaginal device (CIDR) on Day 23 after timed artificial insemination on cumulative pregnancy and embryonic losses in CIDR-GnRH synchronized Nili-Ravi buffaloes. Theriogenology. 2017; 103: 104-109.
- Ataman M, Aköz M, Saribay M, Erdem H, Bucak M. Prevention of embryonic death using different hormonal treatments in ewes. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences. 2013; 37: 6-8.
- Azzarini M. Reproducción en ovinos en América Latina. Algunos resultados de la investigación sobre factores determinantes del desempeño reproductivo y su empleo en condiciones de pastoreo. Producción Ovina. 1992; 5: 7-56.

- Baird D. Luteotrophic control of the corpus luteum. Animal Reproduction Science. 1992; 28: 95-102.
- Balaro M, Santos A, Moura L, Fonseca J, Brandão F. Luteal dynamic and functionality assessment in dairy goats by luteal blood flow, luteal biometry, and hormonal assay. Theriogenology. 2017; 95: 118-126.
- Barnes F. The effects of the early uterine environment on the subsequent development of embryo and fetus. Theriogenology. 2000; 53: 649-658.
- Bartolome J, Melendez P, Kelbert D, Swift K, McHale J, Hernandez J, Silvestre F, Risco C, Arteche A, Thatcher W, Archbald L. Strategic use of gonadotrophin releasing hormone (GnRH) to increase pregnancy rate and reduce pregnancy loss in lactating dairy cows subjected to synchronization of ovulation and timed insemination. Theriogenology. 2005; 63: 1026-1037.
- Bartolome J, Wallace S, de la Sota R, Thatcher W. The effect of administering equine chorionic gonadotropin (eCG) and human chorionic gonadotropin (hCG) post artificial insemination on fertility of lactating dairy cows. Theriogenology. 2012; 78: 1110-1116.
- Bauersachs S, Wolf E. Immune aspects of embryo-maternal cross-talk in the bovine uterus. Journal of Reproductive Immunology. 2013; 97: 20-26.
- Bazer F. Uterine protein secretions: relationship to development of the conceptus. Journal of animal science. 1975; 41: 1376-1382.

- Becaluba M, Moscuzza H. Laparotomia en ruminates. 2018. [ON LINE] https://documents.tips/documents/laparotomias-en-rumiantes-vet-reticuloperitonitis-traumtica-anestesia-regional.html
- Binelli M, Thatcher WW, Mattos R, Baruselli P. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. Theriogenology. 2001; 56: 1451-1463.
- Beck N, Peters A, Williams S. The effect of GnRH agonist (buserelin) treatment on day 12 post mating on the reproductive performance of ewes. Animal Science.1994; 58: 243-247.
- Beck N, Jones M, Davies B, Mann G, Peters A. The effect of GnRH analogue (buserelin) treatment on day 12 post mating on ovarian structure and plasma progesterone and oestradiol concentration in ewes. Animal Science. 1996; 63: 407-412.
- Bridges G, Day M, Geary T, Cruppe L. Triennial Reproduction Symposium: deficiencies in the uterine environment and failure to support embryonic development. Journal of Animal Science. 2013; 91: 3002-3013.
- Bruno Galarraga M, Cueto M, Gibbons A, Accastello N, de la Sota R, Lacau I. Caracterización de las pérdidas de gestación en ovejas Merino en condiciones de cría extensiva. 37º Congreso de la Asociación Argentina de Producción Animal. Resumen RF 373. Revista Argentina de Producción Animal. 2014; 34, Supl 1: 22.
- Caffrey J, Nett T, Abel J, Niswender G. Activity of 3beta-hydroxy-delta5-steroid dehydrogenase/ delta5-delta4-isomerase in the ovine corpus luteum. Biology Reproduction. 1979; 20:279–87.

- Cam M, Kuran M, Yildiz S, Selcuk E. Fetal growth and reproductive performance in ewes administered GnRH agonist on day 12 post-mating. Animal Reproduction. 2002; 72: 73-82.

- Cam M, Kuran M, Yildiz S, Selcuk E. Fetal growth and reproductive performance in ewes administered GnRH agonist on day 12 post-mating. Animal Reproduction. 2002; 72: 73-82.

- Cam M, Kuran M. Effects of a single injection of hCG or GnRH agonist on day 12 post mating on fetal growth and reproductive performance of sheep. Animal Reproduction Science. 2004; 80: 81-90.
- Carson D, Bagchi I, Dey S, Enders A, Fazleabas A, Lessey B, Yoshinaga K. Embryo implantation. Developmental Biology. 2000; 223: 217-237.
- Carter F, Forde N, Duffy P, Wade M, Fair T, Crowe M, Evans A, Kenny D, Roche J, Lonergan P. Effect of increasing progesterone concentration from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. Reproduction, Fertility and Development. 2008; 20: 368-375.
- Castro A, Arashiro E, Zambrini F, Guimarães A, Esteves L, Fonseca J. Effect of hCG administration on accessory corpus luteum formation and area in estrous induced nulliparous Santa Inês ewes. Animal Reproduction. 2015; 12: 148.
- Catalano R. Efecto de la hormona gonadotropina corionica humana en tratamientos de induccion de celos sobre la respuesta reproductiva de borregas en anestro estacional. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. 2013.

- Catalano R, González C, Teruel M, Cabodevila J, Callejas S. Respuesta reproductiva de la oveja a la administración de gonadotrofina coriónica humana en el momento del servicio. Effect of administration of human chorionic gonadotropin at mating time on reproductive performance in ewes. Revista Veterinaria. 2006; 17: 94-97.
- Cavalcanti A, Brandão F, Nogueira L, Fonseca J. Effects of GnRH administration on ovulation and fertility in ewes subjected to estrous synchronization. Revista Brasileira de Zootecnia. 2012; 41: 1412-1418.
- Chenault J, Kratzer D, Rzepkowski R, Goodwin M. LH and FSH response of Holstein heifers to fertirelin acetate, gonadorelin and buserelin. Theriogenology. 1990; 34: 81-98.
- Chenoweth P. Influence of the male on embryo quality. Theriogenology. 2007; 68: 308-315.
- Choi J, Gilks C, Auersperg N, Leung P. Immunolocalization of gonadotropin releasing hormone (GnRH)-I, GnRH-II, and type I GnRH receptor during follicular development in the human ovary. Journal Clinical Endocrinology Metabolic. 2006; 91: 4562-4570.
- Coleson M, Sanchez N, Ashley A, Ross T, Ashley R. Human chorionic gonadotropin increases serum progesterone, number of corpora lutea and angiogenic factors in pregnant sheep. Reproduction. 2015; 150: 43-52.
- Cueto M, Gibbons A. Inseminación artificial cervical en ovejas sincronizadas con prostaglandinas. Revista Presencia. 2011; 58: 15-19.

- Cueto M, Gibbons A, Alberio R, Taddeo H, Gonzalez-Bulnes A. Timing of emergence of ovulatory follicles in polyovulatory goats. Animal Reproduction Science 2006; 91:275-284.
- De Kruif A. Factors influencing the fertility of a cattle population. Journal Reproduction and Fertility. 1978; 54: 507-518.
- De Rensis F, López-Gatius F, Garcia-Ispierto I, Techakumpu M. Clinical use of human chorionic gonadotropin in dairy cows: an update. Theriogenology. 2010; 73: 1001-1008.
- Dias L, Sales J, Viau P, Barros M, Nicolau S, Simões L, Oliveira C. Although it induces synchronized ovulation, hCG reduces the fertility of Santa Ines ewes submitted to TAI. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2018; 70: 122-130.
- Dixon A, Knights M, Winkler J, Marsh D, Pate J, Wilson M, Inskeep E. Patterns of late embryonic and fetal mortality and association with several factors in sheep. Journal of Animal Science. 2007; 85: 1274-1284.
- Dursun Ş. Gonadotrophin stimulation of ewes that are not pregnant following multiple matings during the season. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences. 2019; 43: 39-43.
- Edey T. Embryo Mortality. In Sheep Breeding, Eds G. J. Tomes, D. E. Robertson, R. J. Lightfoot & W. Haresign. Butterworths, London. 1979: 315-325.

- Ellinwood W, Nett T, Niswender G. Maintenance of the corpus luteum of early pregnancy in the ewe. I. Luteotropic properties of embryonic homogenates. Biology of Reproduction. 1979; 21: 281-288.
- Farin C, Moeller C, Mayan H, Gamboni F, Sawyer H, Niswender G. Effect of luteinizing hormone and human chorionic gonadotrophin on cell populations in the ovine corpus luteum. Biology Reproduction. 1988; 38: 413-421.
- Farin C, Sawyer H, Niswender G. Analysis of cell types in the corpus luteum of the sheep. Journal Reproduction and Fertility. 1989; 76: 181-187.
- Fernández Abella D. Principios de la fisiología reproductiva ovina. Montevideo. Hemisferio Sur. 1993: 247.
- Fernández J, Bruno Galarraga M, Cueto M, Lacau I, Soto A, De La Sota R, Gibbons A. Tratamientos hormonales para incrementar la eficiencia reproductiva en los ovinos. Revista de investigaciones agropecuaria. 2016; 42: 145-152.
- Fernández J, Bruno Galarraga M, Soto A, de la Sota R, Cueto M, Lacau I, Gibbons A. Hormonal therapeutic strategy on the induction of accessory corpora lutea in relation to follicle size and on the increase of progesterone in sheep. Theriogenology. 2018;105: 184-188.
- Fernández J, Bruno Galarraga M, Soto A, de la Sota R, Cueto M, Lacau-Mengido I, Gibbons A. Effect of GnRH or hCG administration on Day 4 post insemination on reproductive performance in Merino sheep of North Patagonia. Theriogenology. 2019; 126: 63-67.

- Fernández J, Bruno Galarraga M, Cueto M, Gibbons A. Efecto de la aplicación de tratamientos hormonales post inseminación sobre la tasa de preñez en el ovino. Memorias del IX Curso de Actualización en Producción Ovina. 2015; 83-85.
- Fierro S, Vinoles C, Olivera-Muzante J. Concentrations of steroid hormones, estrous, ovarian and reproductive responses in sheep estrous synchronized with different prostaglandin-based protocols. Animal Reproduction Science. 2016;167: 74-82.
- Fierro S, Viñoles C, Olivera-Muzante J. Long term prostaglandin based-protocols improve the reproductive performance after timed artificial insemination in sheep. Theriogenology. 2017; 90: 109-113.
- Forde N, Beltman M, Duffy G, Duffy P, Mehta J, O'gaora P, Crowe M. Changes in the endometrial transcriptome during the bovine estrous cycle: effect of low circulating progesterone and consequences for conceptus elongation. Biology of Reproduction. 2011; 84: 266-278.
- Forde N, Carter F, Fair T, Crowe M, Evans A, Spencer T, Lonergan P. Progesterone-regulated changes in endometrial gene expression contribute to advanced conceptus development in cattle. Biology of Reproduction. 2009; 81: 784-794.
- Fraenkel L, Cohn F. Experimentelle untersuchungen uber den einfluss des corpus luteum auf de insertion des eies. Anatomy Anz. 1901; 20: 294-300.
- Fricke P, Reynolds L, Redmer D. Effect of human chorionic gonadotropin administered early in the estrous cycle on ovulation and subsequent luteal function in cows. Journal of Animal Science. 1993; 71: 1242-1246.

- Fukui Y, Itagaki R, Ishida N, Okada M. Effect of different hCG treatments on fertility of estrus-induced and artificially inseminated ewes during the non-breeding season. Journal of Reproduction and Development. 2001; 47: 189-195.
- García-Pintos C, Menchaca A. Pregnancy establishment and maintenance after the administration of equine chorionic gonadotropin (eCG) associated or not with gonadotropin-releasing hormone (GnRH) after insemination in sheep. Animal Production Science. 2017; 58: 1802-1806.
- Garrett J, Geisert R, Zavy M, Morgan G. Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. Journal Reproduction and Fertility. 1988; 84: 437-446.
- Gibbons, A. Determinación de los factores que afectan la eficiencia reproductiva de las majadas. Presencia. 1993; 28: 38-40.
- Gómez-Brunet A, Santiago-Moreno J, Montoro V, Garde J, Pons P, Gonzalez-Bulnes A, López-Sebastián A. Reproductive performance and progesterone secretion in estrus-induced Manchega ewes treated with hCG at the time of AI. Small Ruminant Research. 2007; 71: 117-122.
- Gonzalez-Bulnes A, Santiago-Moreno J, García-García R, del Campo A, López-Sebastian A. Origin of the preovulatory follicle in Mouflon sheep (Ovis gmelini musimon) and effect on growth of remaining follicles during the follicular phase of oestrous cycle. Animal Reproduction Science. 2001; 65: 265-272.

- Hansen T, Romero J, Antoniazzi, A, Bott R, Ashley R, Webb B, Henkes L, Smirnova N. Endocrine conceptus signaling in ruminants. Animal Reproduction. 2013; 10: 311-321.
- Hashem N, El-Azrak K, El-Din A, Taha T, Salem M. Effect of GnRH treatment on ovarian activity and reproductive performance of low-prolific Rahmani ewes. Theriogenology. 2014; 83: 192-198.
- Ishida N, Okada M, Sebata K, Minato M, Fukui Y. Effect of GnRH and hCG treatments for enhancing corpus luteum function to increase lambing rate of ewes artificially inseminated during the non-breeding season. Journal of Reproduction Development. 1999; 45: 73-79.
- Jocelyn H, Setchell B. Regnier de Graaf on the human reproductive organs. An annotated translation of Tractatus de Virorum Organis Generationi Inservientibus and De Mulierub Organis Generationi Inservientibus Tractatus Novus. 1972.
- Kayacik V, Salmanoğlu M, Polat B, Özlüer, A. Evaluation of the corpus luteum size throughout the cycle by ultrasonography and progesterone assay in cows. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences. 2006; 29: 1311-1316.
- Kenny N, Farin C, Niswender G. Morphometric quantification of mitochondria in the two steroidogenic ovine luteal cell types. Biology Reproduction. 1989; 40: 191-196.
- Kenyon P, Maloney S, Blache D. Review of sheep body condition score in relation to production characteristics. New Zealand Journal Agricultury Research. 2014; 2: 38-64.

- Khafaji S. Application of Different Progesterone Protocols on Some Reproductive Hormones during Pregnancy in Awassi Ewes. Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 2018; 10: 1364-1368.
- Khan T, Beck N, Khalid M. The effect of hCG treatment on day 12 post-mating on ovarian function and reproductive performance of ewes and ewe lambs. Animal Reproduction Science. 2009; 116: 162-168.
- Khan T, Beck N, Khalid M. The effects of GnRH analogue (buserelin) or hCG (Chorulon) on day 12 of pregnancy on ovarian function plasma hormone concentrations conceptus growth and placentation in ewes and ewe lambs. Animal Reproduction Science. 2007; 102: 247-257.
- Khan T, Hastie P, Beck N, Khalid M. hCG treatment on day of mating improves embryo viability and fertility in ewe lambs. Animal Reproduction Science. 2003; 76: 81-89.
- Killen I, Caffery G. Uterine insemination of ewes with the aid of a laparoscope. Australian Veterinary Journal. 1982; 59: 95-98.
- Kittok R, Stellflug J, Lowry S. Enhanced progesterone and pregnancy rate after gonadotropin administration in lactating ewes. Journal Animal Science. 1983; 56: 652-655.
- Kleemann D, Walker S, Walkley J, Smith D, Grimson R, Seamark R. Fertilization and embryo loss in Booroola Merino× South Australian Merino ewes: effect of the F gene. Theriogenology. 1990; 33: 487-498.

- Kleemann D, Walker S, Seamark R. Enhanced fetal growth in sheep administered progesterone during the first three days of pregnancy. Journal Reproduction Fertility. 1994; 102: 411-417.
- Kleemann D, Walker S, Hartwich K, Lok Fong R, Seamark R, Robinson R, Owens J. Fetoplacental growth in sheep administered progesterone during the first three days of pregnancy. Placenta. 2001; 22: 14-23.
- Kleemann D, Walker S. Fertility in South Australian commercial Merino flocks: sources of reproductive wastage. Theriogenology. 2005; 63: 2416-2433.
- Kotwica J, Miszkiel G, Skarzynski D, Bogacki M. Effect of progesterone on its own synthesis in bovine corpus luteum. Biology Reproduction. 1998; 58: 338.
- Kotwica J, Rekawiecki R, Duras M. Stimulatory influence of progesterone on its own synthesis in bovine corpus luteum. Bull Institute Veteternary Pulawy. 2004; 48:139-145.
- Lankford L, Yates D, Halalsheh R, Black P, Hallford D, Ross T. Effects of human chorionic gonadotropin on serum progesterone concentrations, embryonic survival, and lambing rates in ewes. American Society of Animal Science. Western Section. 2010; 153.
- Lashari M, Tasawar Z. The effect of GnRH (Dalmarelin) given on day 12 post-mating on ovarian function and embryo development in lohi sheep at southern punjab. Pakistan Life. 2013; 11: 165-170.

- Lashari M, Tasawar Z. The effect of GnRH given on day of mating on ovarian function and reproductive performance in Lohi sheep. Pakistan Veterinary Journal. 2010; 30: 29-33.
- LaVoie, H. Luteal steroidogenesis. En Meidan R The life cycle of the corpus luteum. 1ra edición. Suiza, Ed Springer, 2017, p. 37-55.
- Lonergan P, Forde N, Spencer T. Role of progesterone in embryo development in cattle. Reproduction, Fertility and Development. 2016; 28: 66-74.
- López-Gatius F, Santolaria P, Yaniz J, Rutllant J, López-Béjar M. Factors affecting pregnancy loss from gestation day 38 to 90 in lactating dairy cows from a single herd. Theriogenology. 2002; 57: 1251-1261.
- Macmillan W, Knight T, Macmillan K. Effects of gonadotrophin releasing hormone (buserelin) on sheep fertility. Proceeding New Zealand. Society Animal Production. 1986; 47: 161-163.
- Magnus V. Ovariets betydning for svangerskabet med soerligt hensyn til corpus luteum. Norsk Mag Loegevidensk.1901; 62: 1138-1142.
- Maillo V, Duffy P, O'Hara L, De Frutos C, Kelly A, Lonergan A, Rizos D. Effect of hCG administration during corpus luteum establishment on subsequent corpus luteum development and circulating progesterone concentrations in beef heifers. Reproduction, Fertility and Development. 2014; 26: 367-374.
- Maythem A, Ziyad T. Effect of GnRH given at insemination and 10 days later on reproductive performance and progesterone levels in ewes. Journal of Veterinary Research. 2018; 22: 315-321.

- McPhee I, Tiberghien M. Assessment of pregnancy in sheep by analysis of plasma progesterone using an amplified enzyme immunoassay technique. Veterinay Research. 1987; 121: 63-65.
- Mirzaei A, Rezaei M, Asadi J. Reproductive Performance After hCG or GnRH Administration of Long-Term Progestagen Treatment of Fat Tailed Ewes During Seasonal Anoestrus. Journal of Faculty Veterinary Medicine. Istanbul University. 2014; 40: 176-182.
- Moeini M, Alipour F, Moghadam A. The effect of human chorionic gonadotropin on the reproduction performance in Lory sheep synchronized with different doses of pregnant mare serum gonadotrophin outside the breeding season. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances. 2009; 4: 9-15.
- Moeini M, Alipour F, Sanjabi M. Efficacy of CIDR or FGA Sponges with hCG Treatments on the Conception Rate and Prolificacyin Lori Ewes Out of the Breeding Season. Iranian Journal of Applied Animal Science. 2013; 3: 521-525.
- Moor R, Rowson L. The corpus luteum of the sheep: effect of the removal of embryos on luteal function. Journal of Endocrinology. 1966; 34: 497-502.
- Mousavy S, Sookhtehzari A, Vojgani M. Efficacy of GnRH or CIDR on out of season reproductive performance of ewe. Journal of Veterinary Research. 2009; 64: 96-72.
- Nancarrow C. Embryonic mortality in the ewe and doe. En: Zavy M, Geisart R Embryonic Mortality in Domestic Species. Edicion I. Londres, Inglaterra. 1994. pp 79–97.

- National Research Council. 8va Edición. 2011. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. The National Academies Press. [Online] https://grants.nih.gov/grants/olaw/guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals.pdf
- Nephew K, Cárdenas H, McClure K, Ott T, Bazer F, Pope W. Effects of administration of human chorionic gonadotropin or progesterone before maternal recognition of pregnancy on blastocyst development and pregnancy in sheep. Journal Animal Science. 1994; 72: 453-458.
- Newcombe J, Peters A. The buserelin enigma; How does treatment with this GnRH analogue decrease embryo mortality?. Journal of Veterinary Science and Technology. 2014; 5: 2157-7579.
- O'Hara L, Forde N, Kelly A, Lonergan P. Effect of bovine blastocyst size at embryo transfer on Day 7 on conceptus length on Day 14: can supplementary progesterone rescue small embryos?. Theriogenology. 2014; 81: 1123-1128.
- O'Shea J, Cran D, Hay M. Fate of the theca interna following ovulation in the ewe. Cellular Tissue Research. 1980; 210: 305-319.
- Olfati A, Moghaddam G. Effects of GnRH agonist (cinnarelin) on Reproductive performance in synchronized Iranian crossbred ewes during the breedins season. Slovak Journal Animal Science. 2013; 46: 1-6.
- Ott T, Zhou Y, Mirando M, Stevens C, Harney J, Ogle T, Bazer F. Changes in progesterone and oestrogen receptor mRNA and protein during maternal recognition

of pregnancy and luteolysis in ewes. Journal of molecular endocrinology. 1993; 10: 171-183.

- Pate J. Intercellular communication in the bovine corpus luteum. Theriogenology. 1996; 45:1381–1397.
- R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2016. [ONLINE] http://www.Rproject.org/.
- Rajamahendran R, Sianangama P. Effect of human chorionic gonadotrophin on dominant follicles in cows: formation of accessory corpora lutea, progesterone production and pregnancy rates. Journal Reproduction Fertility. 1992; 95: 577–584.
- Rekawiecki R, Nowik M, Kotwica J. Stimulatory effect of LH, PGE2 and progesterone on StAR protein, cytochrome P450 cholesterol side chain cleavage and 3β hydroxysteroid dehydrogenase gene expression in bovine luteal cells. Prostaglandins & other lipid mediators. 2005; 78: 169-184.
- Reynolds L, Redmer D. Utero-placental vascular development and placental function. Journal of animal science. 1995; 73: 1839-1851.
- Riaz H, Sattar A, Arshad M, Ahma, N. Effect of synchronization protocols and GnRH treatment on the reproductive performance in goats. Small Ruminant Research. 2012; 104: 151-155.
- Rizos D, Scully S, Kelly A, Ealy A, Moros R, Duffy P, Al Naib A, Forde N, Lonergan P. Effects of human chorionic gonadotrophin administration on Day 5 after oestrus

on corpus luteum characteristics, circulating progesterone and conceptus elongation in cattle. Reproduction, Fertility and Development. 2012; 24: 472-481.

- Robinson R, Woad K. Luteal angiogenesis. En The life cycle of the corpus luteum 1ra Edicion. Springer, Cham. 2017, p. 1-21.
- Rostami B, Hajizadeh R, Shahir M, Aliyari D. The effect of post-mating hCG or progesterone administration on reproductive performance of Afshari Booroola-Merino crossbred ewes. Tropical Animal Healthy Production. 2016; 3: 1-6.
- Russel A, Doney J, Gunn R. Subjective assessment of body fat in live sheep. Journal Agricultury Science. 1969; 72: 451-454.
- Sangha G, Sharma R, Guraya S. Biology of corpus luteum in small ruminants. Small Ruminant Research. 2002; 43: 53-64.
- Satterfield M, Bazer F, Spencer T. Progesterone regulation of preimplantation conceptus growth and galectin 15 (LGALS15) in the ovine uterus. Biology of Reproduction. 2006; 75: 289-296.
- Satterfield M, Song G, Hayashi K, Bazer F, Spencer T Progesterone regulation of the endometrial WNT system in the ovine uterus. Reproduction, Fertility and Development. 2008; 20: 935-946.
- Santos J, Thatcher W, Pool L, Overton M. Effect of human chorionic gonadotropin on luteal function and reproductive performance of high-producing lactating Holstein dairy cows. Journal of Animal Science. 2001; 79: 2881-2894.

- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez J. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. Nature methods. 2012; 9: 676-682. [ONLINE] http://fiji.sc
- Schmitt E, Diaz T, Barros C, de la Sota R, Drost M, Fredriksson E, Staples C, Thorner R, Thatcher W. Differential response of the luteal phase and fertility in cattle following ovulation of the first-wave follicle with human chorionic gonadotropin or an agonist of gonadotropin-releasing hormone. Journal Animal Science. 1996; 74: 1074–1083.
- Scotti L, Irusta G, Abramovich D, Tesone M, Parborell F. Administration of a gonadotropin-releasing hormone agonist affects corpus luteum vascular stability and development and induces luteal apoptosis in a rat model of ovarian hyperstimulation syndrome. Molecular and cellular endocrinology. 2011; 335: 116-125.
- Seguin B, Oxender W, Britt J. Effect of human chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone on corpus luteum function and estrous cycle duration in dairy heifers. American journal of veterinary research. 1977; 38: 1153-1156.
- Shemesh M. Actions of gonadotrophins on the uterus. Reproduction-Cambridge. 2001; 121: 835-842.
- Short R. Implantation and the maternal recognition of pregnancy. Foetal Autonomy, 1969; 2: 31.
- Silva M, Ulloa-Leal C, Valderrama X, Bogle O, Adams G, Ratto M. Nerve growth factor from seminal plasma origin (spβ-NGF) increases CL vascularization and level

of mRNA expression of steroidogenic enzymes during the early stage of corpus luteum development in llamas. Theriogenology. 2017; 103: 69-75.

- Sirjani M, Shahir M, Kohram H, Shahneh A. Effect of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) treatment on multiple births in Afshari ewes. African Journal of Biotechnology. 2011; 10: 12358-12362.
- Smith S. Female sex steroid hormones: from receptors to networks to performance actions on the sensorimotor system. Progress in neurobiology. 1994; 44: 55-86.
- So W, Cheng J Poon S, Leung P. Gonadotropin-releasing hormone and ovarian cancer: a functional and mechanistic overview. FEBS Journal. 2008; 275: 5496-5511.
- Spencer T. Early pregnancy: Concepts, challenges, and potential solutions. Animal Frontiers. 2013; 3: 48-55.
- Spencer T, Bazer F. Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy. Frontier Bioscience. 2002; 7: 1879-1898.
- Spencer T, Johnson G, Bazer F, Burghardt R. Fetal-maternal interactions during the establishment of pregnancy in ruminants. Society of Reproduction and Fertility supplement. 2007; 64: 379-396.
- Stevenson J, Tenhouse D, Portaluppi M, Eborn, Kacuba S, De Jarnette J. Interventions after artificial insemination: conception rates, pregnancy survival, and ovarian responses to gonadotropin-releasing hormone, human chorionic gonadotropin, and progesterone. Journal Dairy Science. 2006; 90: 331–340

- Stevenson J, Tiffany S, Inskeep E. Maintenance of pregnancy in dairy cattle after treatment with human chorionic gonadotropin or gonadotropin-releasing hormone. Journal Dairy Science. 2008; 91: 3092–3101.
- Stocco D, Clark B. The role of the steroidogenic acute regulatory protein in steroidogenesis. Steroids. 1997; 62: 29-36.
- Stronge A, Sreenan J, Diskin M, Mee J, Kenny D, Morris D. Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. Theriogenology. 2005; 64: 1212-1224.
- Thatcher W, Moreira F, Pancarci S, Bartolome J, Santos J. Strategies to optimize reproductive efficiency by regulation of ovarian function. Domestic Animal Endocrinology. 2002; 23: 243-254.
- Thimonier J. Progesterone level analysis for the determination of the physiological status of female farm animals. Productions Animales. 2000; 13: 177-83.
- Tomac J, Cekinović Đ, Arapović J. Biology of the corpus luteum. Periodicum biologorum. 2011; 113: 43-49.
- Tsonis C, Cahill L, Carson R, Findlay J. Identification at the onset of luteolysis of follicles capable of ovulation in the ewe. Journal Reproduction Fertility. 1984; 70: 609-614.
- Türk G, Gür S, Sönmez M, Bozkurt T, Aksu E, Aksoy H. Effect of exogenous GnRH at the time of artificial insemination on reproductive performance of Awassi ewes synchronized with progestagen–PMSG–PGF2 a combination. Reproduction Domestic Animals. 2008; 43: 308-313.

- Webb R, Gong J, Law A, Rusbridge S. Control of ovarian function in cattle. Journal Reproduction Fertility. 1992; 45: 141-156.
- White L, Keisler D, Dailey R, Inskeep E. Characterization of Ovine Follicles Destined to Form Subfunctional Corpora Lutead. Journal of animal science. 1987; 65: 1595-1601.
- Wilkins J. Contribution of embryo loss to reproductive performance in Merino ewes. Ph.D. Tesis. University of Western, Australia. 1991.
- Wilmut I, Sales D, Ashworth C. Maternal and embryonic factors associated with prenatal loss in mammals. Journal Reproduction Fertility. 1986; 76: 851–864.
- Wiltbank M. Cell types and hormonal mechanisms associated with midcycle corpus luteum function. Journal of Animal Science. 1994; 72: 1873–1883.
- Wiltbank M, Souza A, Carvalho P, Cunha A, Giordano J, Fricke P, Diskin M. Physiological and practical effects of progesterone on reproduction in dairy cattle. Animal. 2014; 8: 70-81.
- Xu Z, Allen Garverick H, Smith G, Smith M, Hamilton S, Youngquist R. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. Biology Reproduction. 1995; 53: 951-957.
- Yu B, Ruman J, Christman G. The role of peripheral gonadotropin-releasing hormone receptors in female reproduction. Fertility Sterility. 2011; 95: 465-473.

- Zamiri M, Hosseini M. Effects of human chorionic gonadotropin (hCG) and phenobarbital on the reproductive performance of fat-tailed Ghezel ewes. Small Ruminant Research. 1998; 30: 157-161.
- Zelinski-Wooten M, Lanzerdorf S, Wolf D, Chandrasecker A, Stouffer R. Titrating luteinizing hormone surge requirements for ovulatory changes in primate follicles. I. Oocyte maturation and corpus luteum function. Journal Clinical Endocrinology Metabolic. 1991; 73: 577-583.
- Zheng J, Fricke P, Reynolds L, Redmer D. Evaluation of growth cell proliferation and cell death in bovine corpora lutea throughout the estrous cycle. Biology Reproduction. 1994; 51: 623-632.
- Zonturlu A, Kaçar C, Kaya S, Emre B, Korkmaz Ö, Arı U. Effect of double GnRH injections on reproductive parameters in Awassi ewes receiving long-term progesterone. Journal of Applied Animal Research. 2018; 46: 1103-1107.