

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**



Trabajo de Tesis realizado para optar por el título de Doctor en Ciencias Veterinarias

**EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS DE SINCRONIZACIÓN DE CELOS CON
PROGESTERONA Y BENZOATO DE ESTRADIOL PARA INSEMINACIÓN
ARTIFICIAL A TIEMPO FIJO EN OVINOS**

**Autor: MV. María Verano Gómez
Director: MV, MSc, PhD, DECAR, Rodolfo Luzbel de la Sota
Codirector: MV, Dr CsVet, Andrés Telésforo Soto**

**Lugar de Trabajo: Instituto de Investigaciones en Reproducción Animal (INIRA),
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata**

La Plata, 21 de diciembre de 2020

DEDICATORIA

A Martín, Ludmila y Federica; los amores de mi vida

AGRADECIMIENTOS

- Mi profundo agradecimiento a la Facultad de Ciencias Veterinarias y a la Universidad Nacional de La Plata por brindarme la experiencia de estudiar, aprender e investigar en la Institución.
- A mi director, Dr. Rodolfo Luzbel de la Sota, quien me enseñó a que el tren pasa una vez y hay que dispuesto a tomarlo.
- A mi codirector, Dr. Andrés Telésforo Soto, con el que aprendí que a la paciencia hay que comprenderla para poder utilizarla y que rumiar nos ayuda a pensar.
- A los jurados, por sus aportes y apoyo.
- A la Dra. María Alejandra Stornelli, quien con su pregunta impulsó mi carrera hacia la investigación.
- A mi gran amiga y colega, MV. Ana Lorena Migliorisi, quien estuvo a mi lado siempre, incluso cuando viajó a la Antártida Argentina me animó a no abandonar.
- A mis compañeros de la Cátedra de Reproducción Animal y de la Facultad, quienes soportaron todos mis estados de ánimo y los de las ovejas.
- A la Dra. Nora Mestorino por su colaboración en el análisis farmacocinético.
- A los docentes y no docentes de la cátedra de Producción Animal de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, quienes me permitieron utilizar las instalaciones para los experimentos y siempre estuvieron dispuestos a ayudarme.
- Al Dr. Rodolfo Goya y la Sra. Yolanda Sosa por abrirme las puertas del INIBIOLP-FCM-UNLP.

- A mis exestudiantes y actuales colegas que fueron parte del equipo: Marcela, Laura, Diana, Claudia, Joaquín, Lautaro, Romina, Silvana, Esteban, Pancho, Julieta, Lihuel, Teresita, Soledad, y a aquellos que fueron, aunque más no sea unas horas para ayudar.
- A la Sra. Adriana Hanton y su esposo, el MV. Eduardo Battistessa, por abrirme las tranqueras de su campo y hacer que me sienta como en casa. Así como a todos los que forman parte del Establecimiento Santa Clara y fueron partícipes involuntarios de mis ideas: Leo, Rafa, Zamba, Peralta, Robert...
- A mis padres y hermanos, quienes me enseñaron a pelear por lo que creo justo y me apoyaron incondicionalmente.
- A mis hijas y sus besos, quienes me dan la energía para seguir.
- A mi marido y su apoyo incondicional a mis horarios de regreso, mis viajes y mis horas de computadora. Gracias por tanto...
- A las ovejas en general y a la “Marta” en particular...

“- ¿Ovejas?”

-Sí- dijo, y me pasó el cigarrillo, que se había fumado hasta la mitad. Yo le di una calada y lo apagué en el cenicero-. La aventura comienza”

“En el norte de China y ciertas regiones de Mongolia no es tan raro eso de que te entre una oveja en el cuerpo...”

“Se cree que las ovejas que pueden entrar en el cuerpo de los humanos son inmortales. Y la persona que lleva una oveja en su interior también lo es.”

Haruki Murakami

La caza del carnero salvaje

LISTA DE PUBLICACIONES

TRABAJOS PRESENTADOS EN CONGRESOS

1. Gómez MV, Soto AT, Mestorino N, Migliorisi AL, de la Sota RL. 2016. Evaluación del perfil sérico de progesterona en ovejas luego de la colocación de un dispositivo intravaginal de silicona liberador de progesterona nuevo o usado. XVII Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas. FCV-UNR. Casilda, Santa Fe. 22-23 de septiembre. pp 579-580.

PARTICIPACIONES EN CAPÍTULO DE LIBROS O LIBROS

1. Soto AT, Gómez MV, de La Sota RL. 2004. Fecundación, gestación y parto. Diagnóstico de gestación. In: Reproducción ovina y caprina. EG Aisen (Ed). Intermédica, Buenos Aires, Argentina. ISBN: 950-555-278-5. pp. 216.
2. Soto AT, Gómez MV, Pastorelli VR. 2020. Reproducción en pequeños rumiantes. Cómo evaluar la eficiencia reproductiva de la majada y del hato caprino. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata. ISBN: 978-950-34-1867-3. PP. 58.

ÍNDICE

	Página
DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	III
LISTA DE PUBLICACIONES	VI
LISTA DE ABREVIATURAS	XI
LISTA DE TABLAS	XIII
LISTA DE FIGURAS	XIV
LISTA DE ECUACIONES.....	XVI
RESUMEN.....	XVII
SUMMARY	XIX
PRÓLOGO	01
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	02
Aspectos fisiológicos de la reproducción ovina	04
Acción del fotoperíodo y regulación neuroendocrina	05
Regulación endócrina del ciclo estral.....	09
Dinámica folicular	12
Regulación hormonal de las ondas foliculares	13
Protocolos de sincronización de celos y ovulación	15
Prostaglandina F2 alfa	15
Protocolos de sincronización de celos con PGF	16
Progesterona y progestágenos	18
Vías de administración	19
Protocolos de sincronización de celos con progestágenos o progesterona	20

Gonadotrofina coriónica equina	22
17 β estradiol y sales de estradiol	24
GnRH.....	28
CAPITULO I.....	31
<i>Evaluación del perfil sérico de progesterona en ovejas luego de la colocación de un dispositivo intravaginal de silicona liberador de progesterona nuevo o usado</i>	<i>31</i>
Introducción.....	31
Materiales y métodos.....	33
Experimento I.....	33
Diseño experimental.....	33
Determinación de progesterona.....	35
Análisis estadístico	35
Resultados	37
Discusión.....	41
Conclusiones	43
CAPITULO II	44
<i>Estudio del Crecimiento Folicular y el Momento de Ovulación en un Tratamiento Corto de Sincronización de Celo Con DIV, PGF y BE.....</i>	<i>44</i>
Introducción.....	44
Materiales y métodos.....	46
Experimento II	46
Diseño experimental.....	46
Estudio del crecimiento folicular	47
Determinación de progesterona.....	48

Análisis estadístico	48
Resultados	49
Materiales y métodos.....	53
Experimento III	53
Diseño experimental.....	53
Estudio del crecimiento folicular	55
Determinación de progesterona.....	55
Análisis estadístico	55
Resultados	56
Discusión	59
Conclusiones	61
CAPITULO III.....	62
<i>Eficiencia reproductiva de un tratamiento corto de sincronización de celos con aplicación de BE o GnRH e IATF</i>	<i>62</i>
Introducción.....	62
Materiales y métodos.....	64
Experimento IV	64
Diseño experimental.....	64
Protocolos de sincronización de celos.....	65
Extracción y evaluación de semen	66
Inseminación artificial.....	67
Diagnóstico de gestación.....	68
Temperatura y humedad ambiental	68
Costo de la sincronización de celos.....	69

Análisis estadístico	69
Resultados	69
Discusión	73
Conclusiones	74
CAPITULO IV	75
<i>Conclusiones generales</i>	75
BIBLIOGRAFÍA	78
BIOGRAFIA	102

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	DENOMINACIÓN
AC	Núcleo arcuato
ACaeCG	Anticuerpos antieCG
BE	Benzoato de estradiol
CC	Condición corporal
CCC	Centro cíclico
CE	Ciclo estral
CL	Cuerpo lúteo
CT	Centro tónico
CON	Grupo control
d	Día
DIV	Dispositivo intravaginal
DFM	Diámetro del folículo mayor
E ₂	Estradiol
eCG	Gonadotropina coriónica equina
EIV	Esponja intravaginal
EM	Eminencia media
FCV	Facultad de Ciencias Veterinarias
FSH	Hormona folículo estimulante
FGA	Acetato de fluorogestona
FM	Folículo mayor
GnIH	Hormona Inhibidora de Gonadotropinas

GnRH	Hormona liberadora de gonadotrofinas
h	Horas
IA	Inseminación artificial
IATF	Inseminación artificial a tiempo fijo
IM	Intramuscular
IO	Intervalo ovulación
FM	Folículo mayor
LH	Hormona luteinizante
mg	Miligramos
μg	Microgramos
MAP	Acetato de medroxiprogesterona
MGA	Acetato de melengestrol
MSA	Área septal medial hipotalámica
P ₄	Progesterona
PGF	Prostaglandina F _{2α}
POA	Área preóptica
PVN	Núcleo paraventricular
REP	Réplica
RIA	Radioinmunoensayo
SC	Sincronización de celos
SN	Servicio natural
TRT	Tratamiento
UI	Unidades internacionales

LISTA DE TABLAS

Capítulo	Página
2.1 Parámetros reproductivos obtenidos con DIV de 1°, 2° y 3° uso	33
2.2. Parámetros farmacocinéticos de las concentraciones P ₄ tras la aplicación de DIV nuevo y usado (cuadrado medio mínimo ± error estándar) en ovejas (n=40)	38
3.1. Diámetro del folículo mayor (DFM) al retiro del DIV y preovulatorio-y valores mínimos, máximo y promedio del intervalo retiro DIV-ovulación (IO)	51
3.2. Diámetro del folículo mayor (DFM) al retiro del DIV y preovulatorio medio y valores mínimos, máximos y promedio del intervalo retiro DIV-ovulación (IO).....	58
4.1. Número y porcentaje de ovejas sincronizadas, inseminadas y con diagnóstico de gestación (DG) de las REP 1 y 2.....	70
4.2. Razón de probabilidad de preñez respecto de las variables explicativas usadas en el modelo de regresión logística para inseminación artificial.....	71
4.3. Número y porcentaje de ovejas sincronizadas, inseminadas (IA) o con servicio natural, y con diagnóstico de gestación (DG) en la REP1	71
4.4. Razón de probabilidad de preñez respecto de las variables explicativas usadas en el modelo de regresión logística para servicio natural.....	72
4.5. Razón de probabilidad de preñez respecto de las variables explicativas usadas en el modelo de regresión logística para servicio natural e inseminación artificial	72
4.6. Cuadrados medios mínimos y errores estándares del índice de temperatura-humedad máximo (ITH-Max), mínimo (ITH-Min), días acumulados de ITH _≥ 72 (DAITH _≥ 73) y días acumulados de ITH _≥ 79 (DAITH _≥ 79)	72
4.7. Costos de IA y de preñez por oveja y TRT y relación costos entre TRT.....	73

LISTA DE FIGURAS

Capítulo	Página
1.1. Fotoperíodo y regulación neuroendocrina en la oveja	06
1.2. Modelo esquemático de la regulación neuroendócrina melatonina-GnIH-GnRH en el hipotálamo.....	08
1.3. Inmunomarcación a GnRH en la eminencia media.....	09
1.4. Desarrollo folicular y patrones hormonales durante el ciclo estral ovino.....	15
1.5. Estructura química de la PGF	16
1.6. Composición química de la molécula de progesterona.....	18
1.7. Composición química de la molécula de estradiol.....	25
2.1. Diseño Experimento I	35
2.2.A.Concentraciones séricas de P ₄ (ng/ml) luego de la inserción de un DIV nuevo	39
2.2.B.Concentraciones séricas de P ₄ (ng/ml) luego de la inserción de un DIV usado	40
2.3. Área bajo la curva de las concentraciones de P ₄ (ng hora/ml)	41
3.1. Diseño Experimento II.....	47
3.2. Experimento II. Crecimiento del folículo mayor desde colocación de DIV hasta el momento de la ovulación (cuadrados medios mínimos ± error estándar)	50
3.3. Experimento II. Crecimiento del folículo mayor desde su emergencia hasta el momento de la ovulación (cuadrados medios mínimos ± error estándar).....	51
3.4. Experimento II. Momento de ovulación luego del retiro del DIV.....	52

3.5. Experimento II. Concentraciones séricas de P ₄ desde el d5 al d17 de los diferentes tratamientos	53
3.6. Diseño Experimento III.....	55
3.7. Experimento III. Crecimiento del folículo mayor desde colocación de DIV hasta el momento de la ovulación (cuadrados medios mínimos ± error estándar)	56
3.8. Experimento III. Crecimiento del folículo mayor desde su emergencia hasta el momento la ovulación (cuadrados medios mínimos ± error estándar)	57
3.9. Experimento III. Momento de ovulación luego del retiro del DIV	58
3.10. Experimento III. Concentraciones séricas de P ₄ desde el retiro de DIV hasta el d19 de los diferentes tratamientos	59
4.1. Diseño Experimento IV.....	66
4.2. Pistola monodosis utilizada para realizar la IA cervical	67

LISTA DE ECUACIONES

Ecuación 1. Área bajo la curva extrapolada al infinito.....	36
Ecuación 2. Tiempo medio de residencia.....	37
Ecuación 3. Costo de protocolo de sincronización de celos.....	69

TITULO: EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS DE SINCRONIZACIÓN DE CELOS CON PROGESTERONA Y BENZOATO DE ESTRADIOL PARA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL A TIEMPO FIJO EN OVINOS

PALABRAS CLAVES: Ovinos, sincronización inseminación a tiempo fijo, benzoato de estradiol, progesterona.

RESUMEN

Esta tesis tuvo tres objetivos principales: 1) Evaluar la utilización y reutilización de DIV con una concentración inicial de 160 mg de P₄; 2) Determinar la mejor dosis y momento de aplicación de BE dentro de un protocolo de SC para inducir la ovulación, en base al estudio de la dinámica folicular y momento de ovulación y 3) Evaluar la aplicación de un protocolo de SC a base de DIV, BE y PGF asociado a IATF como alternativa válida a los protocolos de SC de EIV y eCG. Para lograr el cumplimiento de los tres objetivos se realizaron cuatro experimentos. Los principales resultados obtenidos fueron, por un lado, que la reutilización de un DIV con una concentración inicial de 160 mg de P₄ no sería efectiva debido que el DIV reutilizado poseería un tercio de la P₄ de un DIV nuevo lo que produciría concentraciones plasmáticas de P₄ <2 ng/ml durante un periodo de TRT de 7 d. Por otro lado, la colocación de un DIV durante cinco días y la aplicación de una dosis de 100 µg de BE y de PG al retiro resultó en la mejor combinación para la obtención de un folículo preovulatorio, así como la ausencia de quistes foliculares, en comparación con la aplicación de una dosis de 200 µg de BE. Así mismo, el diámetro folicular al retiro de DIV, el diámetro folicular preovulatorio medio y el intervalo en horas desde el retiro de DIV al momento de la ovulación fueron similares al comparar la aplicación de BE a las 0, 24 o 36h de retirado el DIV, por lo que la aplicación de BE al momento del retiro del DIV permite eliminar un encierre de los animales. Por último, si bien el porcentaje de preñez obtenido con el TRT de BE fue similar a los obtenidos con eCG y GnRH (45,31%, 53,42% y 52,11%; p >0,05), el costo de preñez por TRT del BE fue 3,0 veces menor que el de

la eCG o de 1,8 menor que la GnRH. En base a lo anteriormente expuesto se puede inferir que la aplicación de BE dentro de un protocolo de SC permitiría la sustitución de la dosis tradicional de eCG con la consiguiente reducción del costo sin desmedro de dicho porcentaje.

TITLE: EVALUATION OF PROGESTERONE AND ESTRADIOL BENZOATE FOR ESTRUS SYNCHRONIZATION AND FIXED-TIME ARTIFICIAL INSEMINATION PROTOCOLS IN SHEEP

KEY WORDS: Sheep, synchronization, fixed timed insemination, estradiol benzoate, progesterone. dissertation had three main objectives

SUMMARY

This dissertation had three main objectives: 1) to study the utilization and reutilization of intravaginal P₄ releasing devices (IVD) with an initial concentration of 160 mg; 2) to determine based on the study of follicular dynamics and time of ovulation the best dose and moment of EB application in an estrus synchronization protocol to induce ovulation, and 3) to study if the application of a IVD-based protocol, BE and PGF associated with IATF would be a valid alternative to the classic sponge and eCG protocols. To achieve these three objectives, four experiments were carried out. The main results obtained in this dissertation were that the insertion of an IVD for five days and the application of a dose of 100 µg of BE and PG upon withdrawal results in the best combination for obtaining an ovulatory follicle, as well as the absence of follicular cysts. In comparison with the application of a dose of 200µg of BE. Likewise, the follicular diameter at IVD removal, the mean preovulatory follicular diameter, and the interval in hours from IVD removal to ovulation were similar when comparing EB application at 0, 24 or 36h after IVD removal. Therefore, the application of EB at the time of the withdrawal of the IVD allows to eliminate the roundup of the animals. Finally, although the pregnancy percentage obtained with the BE TRT was similar to those obtained with eCG and GnRH (45.31%, 53.42% and 52.11%; $p > 0.05$), the cost of pregnancy by TRT of BE was 3.0 times lower than that of eCG or 1.8 lower than GnRH. Based on the foregoing, it can be inferred that the application of BE within a SC protocol would allow the substitution of the traditional dose of eCG with the consequent reduction in cost without detriment to said percentage.

PRÓLOGO

La aplicación de protocolos de sincronización de celos en ovinos tradicionalmente utiliza como base una o dos aplicaciones de prostaglandina $F_{2\alpha}$ separadas por 11-14 días o dispositivos intravaginales con progesterona o progestágenos durante 5-7 días o 12-14 días y asociados con eCG. Los protocolos que utilizan por 5-7 días los dispositivos intravaginales con progesterona natural permiten su reutilización disminuyendo los costos por animal tratado durante la sincronización de celos, sin afectar el porcentaje de preñez de la majada.

Por otro lado, la implementación de la inseminación artificial a tiempo fijo como herramienta biotecnológica permite el mejoramiento genético de la majada. Así mismo, el uso de la inseminación artificial está relacionado con el tipo de protocolo de sincronización de celos utilizado ya que es uno de los factores determinantes del momento de inseminación.

En bovinos, el uso de benzoato de estradiol como componente de un protocolo de sincronización de celos e inseminación artificial a tiempo fijo ha sido estudiado de manera profusa lo que resultó en una estandarización en la dosis y momento de aplicación luego de retirado el dispositivo intravaginal, la cual favorece la sincronización del pico preovulatorio de LH y de la ovulación, con valores de preñez aceptables. En pequeños rumiantes, en cambio, su aplicación dentro de un protocolo de sincronización de celos ha sido escasamente estudiada, por lo que la investigación en relación con la dosis y momento de aplicación correctos dentro de un protocolo de sincronización de celos es necesaria para el desarrollo de nuevos protocolos de sincronización de celos en hembras ovinas.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las técnicas de reproducción asistida más utilizadas en ovinos son la sincronización de celos (SC) y la inseminación artificial (IA). Los protocolos tradicionales de SC utilizan dos dosis de prostaglandina F2 alfa (PGF) con un intervalo de 7-14 días (d) entre ambas aplicaciones (Cueto y Gibbons, 2011; Fierro y col., 2013; Fierro y Olivera-Muzante, 2017; Menchaca y Rubianes, 2004) o emplean dispositivos intravaginales (DIV) impregnados con progesterona (P₄) o esponjas intravaginales (EIV) con progestágenos durante 12-14 d junto con la administración intramuscular (IM) de gonadotropina coriónica equina (eCG) en dosis y momento variable (Driancourt, 2001; Quintero-Elisea y col., 2011; Salomón y col., 1990). El empleo de eCG promueve el desarrollo folicular y la ovulación, pero provoca una respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos, por lo que es necesario aumentar la dosis en años siguientes (Bodin y col., 1997; Chemineau y col., 1999).

La implementación de un programa de IA permite llevar a cabo un proceso de mejora genética en la majada, en la cual la eficiencia de este proceso está estrechamente relacionada con la elección del protocolo de SC (Viñoles, 2011). La IA a tiempo fijo (IATF), frente a la IA con detección de celos, evita el uso de los machos retajos para la detección de los celos, el encierre y manejo diario de las hembras para separar las ovejas en celo y elimina la tinción de la lana por los machos marcadores, así como a una disminución del estrés animal al minimizar el número de encierros (Cueto y Gibbons, 2011). Todo esto conlleva a una mejora en la eficiencia en el tiempo profesional y del personal (Alejo Menchaca y Rubianes, 2004; Cueto y Gibbons, 2011). Sin embargo, el éxito de un programa de IATF es dependiente, entre otros factores, de la utilización de un protocolo eficiente de SC que garantice un porcentaje de preñez de entre 60-70% (Menchaca y Rubianes, 2004).

A partir de los nuevos conocimientos sobre la fisiología reproductiva y en particular en la dinámica folicular ovárica en los ovinos, ocurrieron modificaciones sustanciales en los tiempos de duración de los protocolos de SC mediante el empleo de DIV o de EIV, así como en el uso combinado de diferentes hormonas, en los tiempos de aplicación y en la reutilización de los DIV (Bartlewski y col., 2003; Fierro y col., 2017; Karaca y col., 2009; Martemucci y D'Alessandro, 2010, 2011; Menchaca y Rubianes, 2004; Rubianes y col., 1997; Takada y col., 2009; Ungerfeld y Rubianes, 2002; Uribe-Velásquez y col., 2011; Vilariño y col., 2010, 2011, 2013; Viñoles y col., 2001). En bovinos se aplican diferentes protocolos con la utilización de benzoato de estradiol (BE) o la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) en combinación con PGF para inducir y sincronizar la ovulación (Bo y col., 1994, 1995, 2000, 2003, 2006; Cavalieri y col., 2002; Martínez y col., 2005), así como la utilización por segunda o tercera vez de los DIV (Colazo y col., 2004, 2007; Van Cleeff y col., 1992).

Desde hace más de dos décadas, tanto en Uruguay como en Argentina se llevan a cabo investigaciones básicas y aplicadas en la utilización de protocolos cortos de 5-7 d con DIV nuevos y reusados (Gómez y col., 2010; Menchaca, 2006; Menchaca y col., 2007; Soto, Gómez, y Pastorelli, 2015; Ungerfeld y Rubianes, 1999, 2002; Vilariño y col., 2007a, 2007b, 2011, 2013; Viñoles y col., 2001) . Sin embargo, la disponibilidad de resultados de investigación sobre la aplicación de BE y GnRH como inductores de la ovulación en la especie ovina es escasa (Castilho y col., 2015; Martemucci y D'Alessandro, 2010, 2011; Menchaca, 2006).

En el presente capítulo se abordarán los aspectos fisiológicos reproductivos de la hembra ovina, la regulación neuroendócrina, la dinámica folicular; finalizando con hormonas y análogos de las mismas utilizados en los diferentes protocolos de SC.

Aspectos Fisiológicos de la Reproducción Ovina

Los ovinos son considerados animales poliéstricos estacionales de fotoperíodo de días cortos, con un patrón reproductivo anual regulado por la melatonina y comprendido por una época o estación reproductiva, una estación no reproductiva o contra estación y dos estaciones de transición (Hafez, 2007; Senger, 2006a). La estación reproductiva es la época donde la hembra presenta ciclos estrales (CE) regulares asociados con celo y ovulación, y se extiende, en la mayoría de las razas desde mediados del verano a principios del invierno dependiendo de diversos factores como la raza, la latitud y el estado nutricional (Hafez, 2007). La estación no reproductiva, en cambio, se caracteriza por la ausencia de CE, de folículos preovulatorios y de ovulaciones (Goodman, 1994; Morello y Chemieau, 2004).

El CE ovino tiene una duración de 17 ± 2 d y se divide en una fase luteal, que se extiende desde la ovulación hasta la luteólisis y una fase folicular, que comprende el período entre la luteólisis y la ovulación (Goodman, 1994; Morello y Chemieau, 2004). El celo o estro (d 0) dura entre 24 y 36 h y la ovulación ocurre a las 24-27 h de iniciado el estro (Goodman, 1994; Hafez, 2007). La tasa de ovulación varía entre 1 a 3 folículos por ciclo de acuerdo a la condición corporal (CC), la raza o cruza, la estación del año y la presencia de genes prolíficos como el gen Booroola (Goodman, 1994; Hafez, 2007; Souza col., 2001; Stellflug y col., 1997), el gen de la proteína BMP-15 o el gen Lacaune, entre otros (Luna Palomera y Alonso Morales, 2014).

El uso de la ultrasonografía y de la medición de las concentraciones séricas de hormonas, tales como hormona folículo-estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH), estradiol (E_2) y P_4 han permitido estudiar la dinámica folicular; estableciendo que el crecimiento folicular ocurre a través de un patrón de ondas de crecimiento y regresión, de manera similar a lo que ocurre en bovinos (Bartlewski y col., 1998, 1999a, 1999b, 1999c; 2000; 2011;

Driancourt, 2001; Ginther y col., 1995; Johnson y col., 1996; Rubianes, 2000; Souza y col., 1997).

Acción del Fotoperíodo y Regulación Neuroendocrina

El CE ovino está regulado por el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal, el cual es estimulado por la cantidad de horas (h) luz diaria (Senger, 2006a). Las variaciones en la intensidad y cantidad de horas luz (estímulo físico) son captadas por la retina, donde ese estímulo físico es transformado en una señal química (neurotransmisores), la cual es redirigida hacia el núcleo supraquiasmático y luego al ganglio cervical superior. Es aquí donde las neuronas postganglionares realizan sinapsis con neuronas inhibitoras, quienes toman contacto con los pinealocitos de la epífisis (Senger, 2006b), en donde el mensaje nervioso actúa modulando la síntesis de la melatonina (Abecia y col., 2011). La acción inhibitoria sobre los pinealocitos disminuye durante las horas de oscuridad, permitiendo la síntesis y liberación de melatonina, provocando un aumento en la producción y secreción de GnRH (Figura 1.1; Senger, 2006b). Esta acción la realizaría a través de la modulación de la expresión de la hormona inhibitoria de gonadotropina (GnIH; Ubuka y col., 2005).

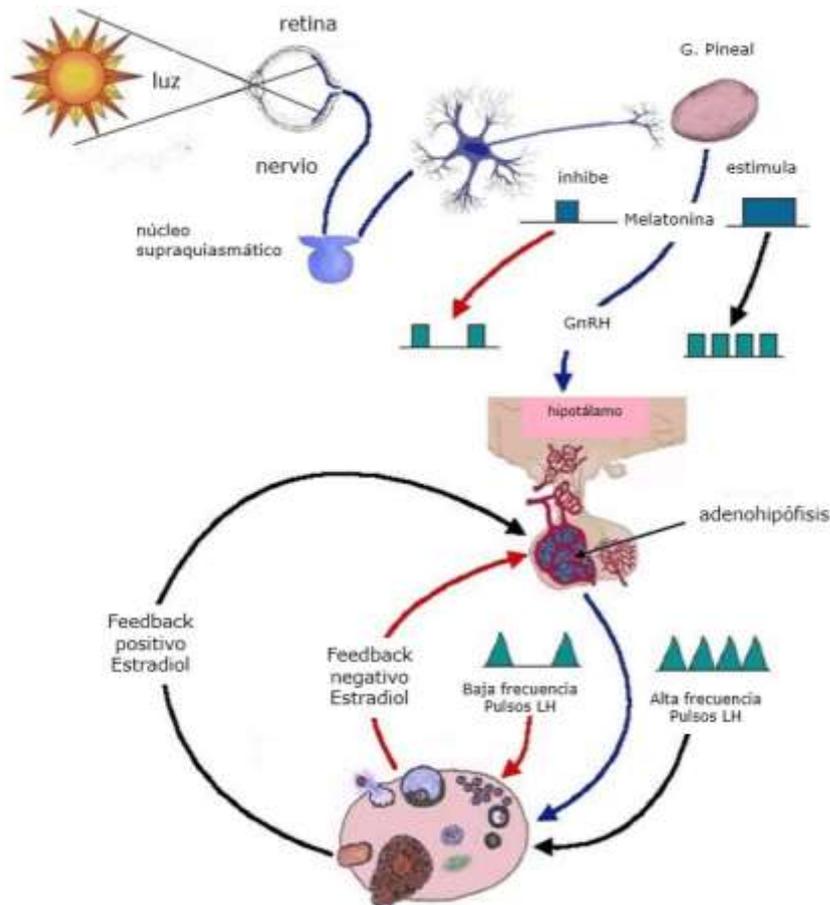


Figura 1.1. Fotoperíodo y regulación neuroendocrina en la oveja (Adaptado de Karsch, 1984 y de (Malpaux y col., 2002)

La GnIH es un péptido sintetizado por neuronas hipotalámicas (Fukusumi y col., 2001; Tsutsui y col., 2000; Yoshida y col., 2003) involucrado en los mecanismos de regulación de la síntesis de gonadotrofinas, de la conducta y autonómicos (Qi y col., 2009; Ubuka y col., 2012a, 2012b). La GnIH inhibe la secreción de gonadotrofinas al disminuir la actividad de las neuronas GnRH y al ejercer una regulación directa sobre la síntesis y secreción de gonadotrofinas hipofisarias (Ubuka y col., 2012a, 2012b) tanto en ovinos (Sari y col., 2009) como en los bovinos (Kadokawa y col., 2009). En los ovinos, las neuronas GnIH se distribuyen principalmente en el área dorso medial hipotalámica y en el núcleo paraventricular (PVN; Clarke y col., 2008) y sus fibras se distribuyen en el área septal, área preóptica (POA), eminencia media (EM), núcleo arcuato (AC) y PVN, entre otros (Ubuka y col., 2012a, 2012b). Las fibras GnIH particularmente se distribuyen en el POA y área septal medial hipotalámica

(MSA), coincidiendo con áreas de alta concentración de neuronas GnRH (Advis y col., 1985; Caldani y col., 1988; Clarke y col., 2008; Dees y col., 1981; Hamada y col., 1992; Lehman y col., 1986; Leshin y col., 1988; Zuccolilli y col., 1994), y en la EM, coincidiendo con una densa red de fibras GnRH vinculada estrechamente con el sistema porta hipofisiario (Advis y col., 1985; Caldani y col., 1988; Clarke y col., 2008; Dees y col., 1981; Hamada y col., 1992; Lehman y col., 1986; Leshin y col., 1988; Zuccolilli y col., 1994). Las neuronas GnIH también se vinculan con otros tipos neuronales como neuronas oxitócicas, DOPA, pro-opiomelanocortin, factor liberador de corticotrofina y kisspeptinas, lo cual crea un complejo sistema regulatorio neuroendocrino que modula la respuesta reproductiva (Beltramo y col., 2020; Ieda y col., 2020; Qi y col., 2009; Figura 1.2).

Las neuronas GnIH del PVN hipotalámico expresan receptores a melatonina por lo cual esta hormona actuaría directamente a través de su receptor en la inducción de la expresión de GnIH (Ubuka y col., 2005). En mamíferos cuya actividad reproductiva se encuentra regulada por el fotoperíodo, se constataron variaciones estacionales en el número de células GnIH y en la expresión de GnIH cuando fueron sometidos a cambios en el número de horas luz o a la aplicación de melatonina exógena (Revel, y col., 2008; Ubukay col., 2012a, 2012b). En los ovinos, el incremento en la melatonina, dado por los días cortos (Dardente y col., 2008), inhibe la expresión de GnIH, y durante la contra estación reproductiva la GnIH se incrementa en el sistema porta hipofisiario (Smith y col., 2012) lo cual coincide con el hallazgo de que las fibras GnIH se disponen en una densa red en la EM (Clarke y col., 2008). Además, las neuronas GnIH tienen receptores de 17β E₂, al igual que las neuronas Kiss, por lo cual estas neuronas responderían a la acción de esta hormona induciendo una respuesta sobre las neuronas GnRH (Ubuka, y col., 2012a, 2012b). En mamíferos reproductivamente estacionales, los patrones de expresión de GnIH y sus correspondientes receptores en el hipotálamo varían a lo largo del

ciclo estral, siendo su máxima expresión durante el diestro y su menor expresión en el estro (Li y col., 2012; Figura 1.2).

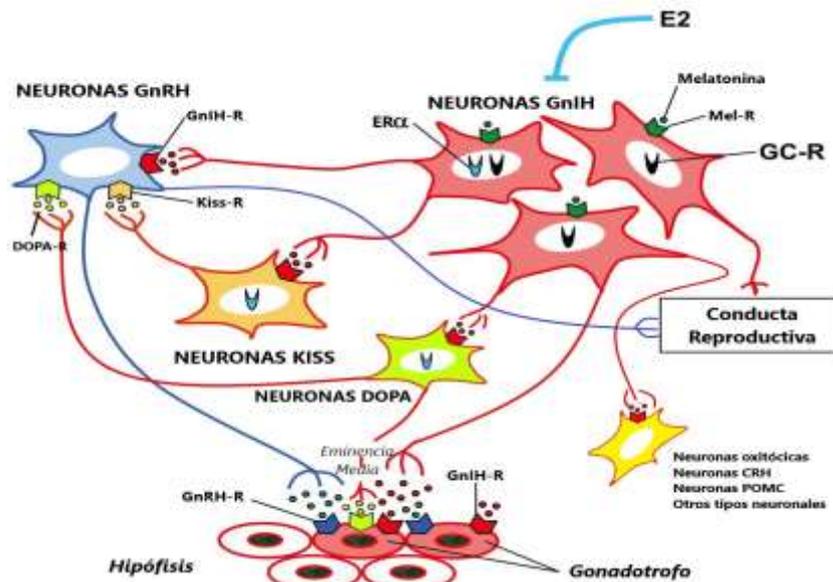


Figura 1.2. Modelo esquemático de la regulación neuroendócrina melatonina-GnIH-GnRH en el hipotálamo. Las neuronas GnIH proyectan sus axones hacia las neuronas GnRH como a la EM. Los receptores de GnIH se encuentran tanto en las neuronas GnRH como en el gonadotrofo. La GnIH inhibe la síntesis de gonadotropina y la actividad de las neuronas GnRH e inhibe la actividad gonadotrófica de la hipófisis. La GnIH regula la actividad de las neuronas GnRH a través de su acción sobre las neuronas Kiss por medio de las kisspeptinas. Las fibras neuronales de las neuronas GnIH se proyectan hacia otros tipos neuronales (dopamina, pro-opiomelanocortina (POMC), neuropeptido Y, orexina, hormona concentradora de melanina (MCH), factor liberador de corticotrofina (CRH) y neuronas oxitócicas en el encéfalo. La expresión de GnIH es regulada por la melatonina, E2 y situaciones de stress ya que las neuronas GnIH expresan receptores a melatonina (Mel-R), glucocorticoides (GC-R), y a estrógenos (Er α ; adaptado de Karsch, 1984 y Malpoux y col., 2002).

La GnRH es un péptido sintetizado por neuronas hipotalámicas que estimulan la síntesis de gonadotropinas y regula la conducta reproductiva. Las neuronas GnRH se disponen en forma aislada o formando pequeños grupos en la parte ventral del hipotálamo, desde las áreas septales hasta la parte anterior de la región infundibular de los rumiantes (Advis y col., 1985; Caldani y col., 1988; Dees y col., 1981; Hamada y col., 1992; Lehman y col., 1986; Leshin y col., 1988; Zuccolilli y col., 1994). La mayor concentración de neuronas GnRH se halla en el POA y en el área medial preóptica (52% - 62%), área hipotalámica anterior (16% - 25%) y MSA (Advis y col., 1985; Caldani y col., 1988; Hamada y col., 1992; Lehman y col., 1986; Leshin y col., 1988; Zuccolilli y col., 1994). Sin embargo, existe una discordancia en la proporción de neuronas halladas en el hipotálamo medio basal de los rumiantes donde se plantea desde la

inexistencia de las mismas en el bovino (Leshin y col., 1988) hasta un 15% en los ovinos (Caldani y col., 1988; Dees y col., 1981; Lehman y col., 1986). Las fibras GnRH se distribuyen en dos vías principales. Una vía recorre la pared del tercer ventrículo hacia el infundíbulo atravesando sucesivamente los núcleos periventricular, PVN y AC, núcleos compartidos con neuronas y fibras GnRH, (Ubuka y col., 2012b) y la otra vía, conformada por la mayor parte de las fibras, desciende hacia la EM y forma una densa red que rodea los capilares primarios del sistema porta-hipofisiario (Advis y col., 1985; Caldani y col., 1988; Dees y col., 1981; Hamada y col., 1992; Lehman y col., 1986; Leshin y col., 1988; Zuccolilli y col., 1994) llegando en parte hasta el tallo de la pituitaria en contacto con las células de la parte intermedia de la glándula hipófisis (Hamada y col., 1992; Zuccolilli y col., 1994; Figura 1.3A y Figura 1.3B). La concentración de fibras inmunorreactivas a GnRH presentes en la EM varía en diferentes estadios fisiológicos (lactancia/seca), durante la época reproductiva (cíclicas y anéstricas) y el ciclo estral (diestro y ovulación; Lehman y col., 1986; Polkowska y col., 1980).

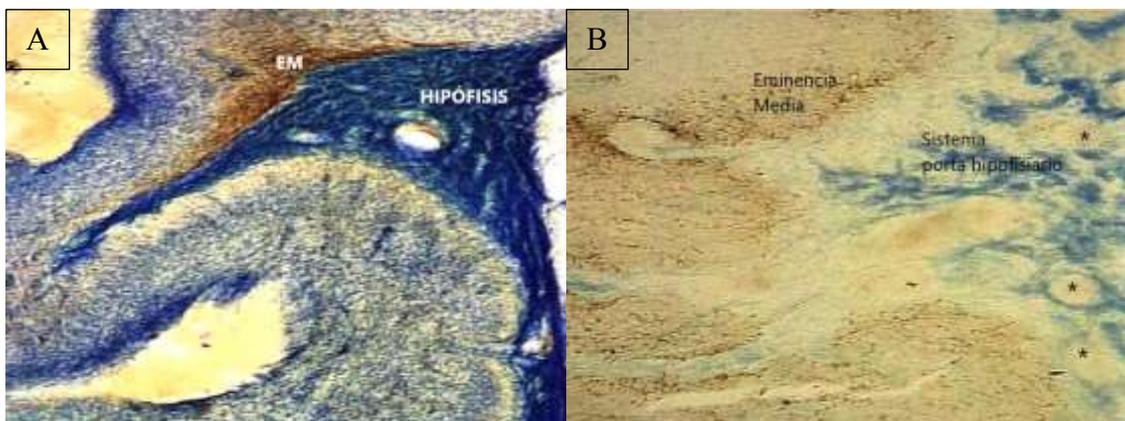


Figura 1.3. Inmunomarcación a GnRH en la eminencia media **A**: Zona inmunorreactiva de fibras y GnRH libre (coloración marrón) en la EM en contacto con la hipófisis (40X). **B**: fibras y GNRH-ir libre en la EM en contacto con los vasos sanguíneos del sistema porta hipofisiario (100X). Los asteriscos indican vasos sanguíneos. (Soto, 2011)

Regulación Endócrina del Ciclo Estral

La secreción de GnRH es controlada a través de dos centros ubicados en el hipotálamo, el centro tónico (CT) y el centro cíclico o preovulatorio (CCC). El CT, conformado

principalmente por el núcleo ventromedial y el AC, provoca la liberación de GnRH como pulsos constantes de baja amplitud (5pg/ml) que estimulan la liberación de pulsos de baja amplitud de LH (Senger, 2006c). El CCC, formado por el núcleo supraquiasmático, el POA y el área hipotalámica anterior, produce la liberación de pulsos basales de GnRH hasta que recibe el estímulo positivo apropiado que provoca la liberación de pulsos de GnRH de elevada amplitud y frecuencia en un corto período de tiempo (Senger, 2006c). Durante el proestro, la FSH y la LH se incrementan debido a la liberación de GnRH. La FSH y la LH actúan en el ovario estimulado el desarrollo folicular y la producción de E₂ por parte de los folículos. En el estro, el folículo dominante produce mayor cantidad de E₂ junto con inhibina, la cual actúa disminuyendo la liberación de FSH. El aumento de E₂ y las concentraciones basales de P₄ forman el estímulo necesario para la liberación del pico preovulatorio de GnRH 14 h previas a la ovulación (Bartlewski y col., 2011), el cual produce el pico preovulatorio de LH y la ovulación (Hafez, 2007; Senger, 2006c; Figura 1.4).

Luego de la ovulación, la cavidad folicular comienza a llenarse de sangre transformándose en cuerpo hemorrágico (Morello y Chemieau, 2004) el cual desarrolla a cuerpo lúteo (CL) a través del proceso de luteinización, bajo la acción de la LH sobre las células de la teca interna y de la granulosa del folículo ovulatorio (Senger, 2006d). Las células de la teca interna desarrollan a células luteales pequeñas y las de la granulosa a células luteales grandes (Senger, 2006d). Ambos tipos celulares sintetizan y secretan P₄, diferenciándose en que las células luteales grandes producen la mayor cantidad de P₄ y no son sensibles a la LH (Morello y Chemieau, 2004; Senger, 2006d). La P₄ ejerce un efecto inhibitorio sobre el eje hipotalámico-hipofisiario, inhibiendo la síntesis y secreción de GnRH, FSH y LH; siendo la hormona responsable de la preparación uterina para la implantación, del mantenimiento de la gestación y del desarrollo mamario previo al parto, (Hafez, 2007; Senger, 2006a). Además

regula la expresión de receptores involucrados en la regulación del CE y en la secreción de PGF (Hansen y col., 2017).

Al final de la fase luteal, si no hay presencia de señales embrionarias como el interferón tau, lo que ocurre dentro del mecanismo de reconocimiento materno de la gestación (Meidan y col., 2017), se produce la luteólisis, proceso irreversible por medio del cual el CL pierde su funcionalidad, degenera y las concentraciones sanguíneas de P_4 caen abruptamente (Meidan y col., 2017; Senger, 2006d). La luteólisis se compone de dos fases de regresión, una funcional y otra estructural (McCracken y col., 1999). La fase de regresión funcional corresponde a la disminución en la secreción de P_4 y ocurre antes que la fase de regresión estructural. La fase de regresión estructural se caracteriza por la apoptosis de células luteales con disminución del tamaño del CL (Meidan y col., 2017).

Las hormonas que controlan la luteólisis son la P_4 , el E_2 , la oxitocina luteal y la PGF uterina. La P_4 previene la luteólisis hasta el día 10-12 del CE en donde pierde la habilidad de bloquear la formación de receptores de oxitocina en el útero, momento en el cual el E_2 folicular promueve el desarrollo de los mismos (Goodman, 1994; Macmillan y col., 2003; Senger, 2006a). La oxitocina hipotalámica y luteal se acopla a su receptor endometrial y activa a la fosfolipasa A_2 que actúa junto con COX-2, una peroxidasa y la enzima PGF-sintetasa sobre el ácido araquidónico de los fosfolípidos de membrana convirtiéndolo en PGF, que difunde desde la vena uterina a la arteria ovárica en cantidades suficientes para inducir la luteólisis. Este transporte local es necesario ya que los pulmones ovinos metabolizan el 99% de la PGF a metabolito inactivo (Bazer, 2015). La PGF produciría la luteólisis a través de tres mecanismos de acción. Por un lado, actuaría sobre las células luteales grandes activando la fosfolipasa C, el sistema de proteína quinasa C y la síntesis de PGF a través de la vía PG endoperóxido sintetasa, dando como resultado un incremento en la producción de PGF luteal (Diaz y col., 2002; Pate y Keyes, 2001). El segundo mecanismo de acción se relaciona con la reducción de la

esteroideogénesis ya que ejerce su acción sobre las células endoteliales del CL que liberan endotelina, la cual actúa sobre las células luteales grandes inhibiendo la síntesis de P₄. Por último, la acción vasoconstrictora sumatoria de la PGF y de la endotelina 1 resulta en la apoptosis facilitando la regresión luteal (Meidan y col., 2017), comenzando de esta manera un nuevo ciclo estral (Hafez, 2007; Morello y Chemieau, 2004; Senger, 2006a).

Dinámica Folicular

Previo a la implementación de la ultrasonografía reproductiva en los pequeños rumiantes, los estudios sobre la dinámica folicular se realizaron mediante el empleo de técnicas invasivas como procedimientos histológicos (Brand y de Jong, 1973; Cahill y col., 1979; Contreras-Solís y col., 2007) o quirúrgicos por medio de laparotomía (Smeaton y Robertson, 1971) o laparoscopia (Bister y col., 1999; Noel y col., 1993). Se ha determinado que los ovarios de la oveja poseen entre 12.000 y 86.000 folículos primordiales y entre 100 y 400 folículos en crecimiento, de los cuales sólo el 10% es visible en la superficie ovárica (Cahill y col., 1979). Brand y de Jong (1973) sugirieron la existencia de dos ondas de desarrollo folicular durante el CE ovino luego de determinar las fluctuaciones de concentraciones circulantes de E₂.

Una onda folicular se define como la emergencia de un grupo de folículos antrales de 3mm de diámetro, de los cuales uno o más alcanzan un diámetro de ≥ 5 mm (Bartlewski y col., 1999a; Evans y col., 2000; Ginther y col., 1995; Menchaca y Rubianes, 2004). El número de ondas foliculares por CE varía entre 2 y 5 en los pequeños rumiantes, con un predominio de 3 ondas foliculares en los ovinos (Bister y col., 1999; Evans y col., 2000; Ginther y col., 1995). La dinámica folicular ha sido demostrada en animales pre-púberes (Rawlings y col., 2003), en ovejas durante el ciclo interovulatorio (Evans, 2003; Evans y col., 2000; Rubianes, 2000; Souza y col., 1997), en la contra estación (Bartlewski y col., 1998), en la gestación temprana, en el puerperio (Bartlewski y col., 2000), durante el inicio de la estación reproductiva (Bartlewski y

col., 1999b) y durante el período de transición que ocurre luego de la finalización de la época reproductiva (Bartlewski y col., 1999c).

Evans (2003) describe el desarrollo folicular en los ovinos con las siguientes características:

- a) Al menos un folículo ≥ 5 mm de diámetro se presenta en cada onda folicular
- b) El crecimiento del folículo mayor (FM) de cada onda ocurre durante 5-7 d, con una tasa de crecimiento aproximada de 1mm/d
- c) El diámetro máximo del FM de cada onda difiere entre ondas foliculares,
- d) A medida que transcurre la fase luteal, aumenta la concentración sérica de P_4 lo que provoca que el diámetro máximo del folículo de mayor tamaño sea menor; que el recambio folicular se vea favorecido y que el intervalo entre ondas sea más corto que durante la fase luteal temprana,
- e) La mayoría de los folículos que ovulan son aquellos que presentaban el mayor diámetro el día que se produjo la luteólisis,
- f) En la mayoría de las ovulaciones dobles, los folículos ovulatorios provienen de la misma onda folicular
- g) Las ovulaciones dobles ocurren en un rango menor a 12 h.

Regulación Hormonal de las Ondas Foliculares

El desarrollo de las ondas foliculares ocurre principalmente a expensas de la liberación hormonal de FSH, LH y E_2 . La secreción de FSH y LH se encuentra regulada por los CT y CCC (Noakes y col., 2008; Senger, 2006a). El CT es el responsable de la secreción basal de las hormonas gonadotrópicas y el CCC controla la secreción masiva en un corto tiempo de las gonadotrofinas, principalmente de la LH (Noakes y col., 2008).

Se ha descrito que la emergencia de las ondas foliculares durante el CE de los ovinos coincide con el incremento transitorio de las concentraciones plasmáticas de FSH 2-3 días previos a la emergencia de cada onda folicular (Ginther y col., 1995; Figura 1.4) El incremento transitorio de FSH estimularía la etapa inicial del crecimiento del folículo antral (Bartlewski y col., 1999a; 2011; Ginther y col., 1995; Rubianes y Menchaca, 2003). Alrededor de los dos días luego de la emergencia de la primera onda se produce un descenso en las concentraciones plasmáticas de FSH, sin embargo, se mantienen elevados hasta cinco días luego de la emergencia de la segunda onda (Viñoles y col., 1999). Paralelamente a la disminución de FSH se incrementa la concentración plasmática de E_2 (Bartlewski y col., 2011; Rubianes y Menchaca, 2003) originada del folículo de mayor tamaño (Bartlewski y col., 1999a). Durante la fase luteal, la elevada concentración de P_4 provoca un feed-back negativo sobre la liberación de gonadotrofinas. Este efecto inhibitorio sobre la LH actúa en detrimento del crecimiento y tamaño folicular del folículo de mayor tamaño, acelerando el recambio folicular (Rubianes y col., 1996). Con el inicio de la luteólisis ocurre un descenso abrupto de las concentraciones plasmáticas de P_4 que provoca, en conjunto con las elevadas concentraciones de E_2 sintetizado por el folículo de mayor tamaño, el incremento en la frecuencia pulsátil en la síntesis y liberación de GnRH y en consecuencia de LH hasta que se produce el pico preovulatorio de LH y la ovulación consecuente (Senger, 2006d).

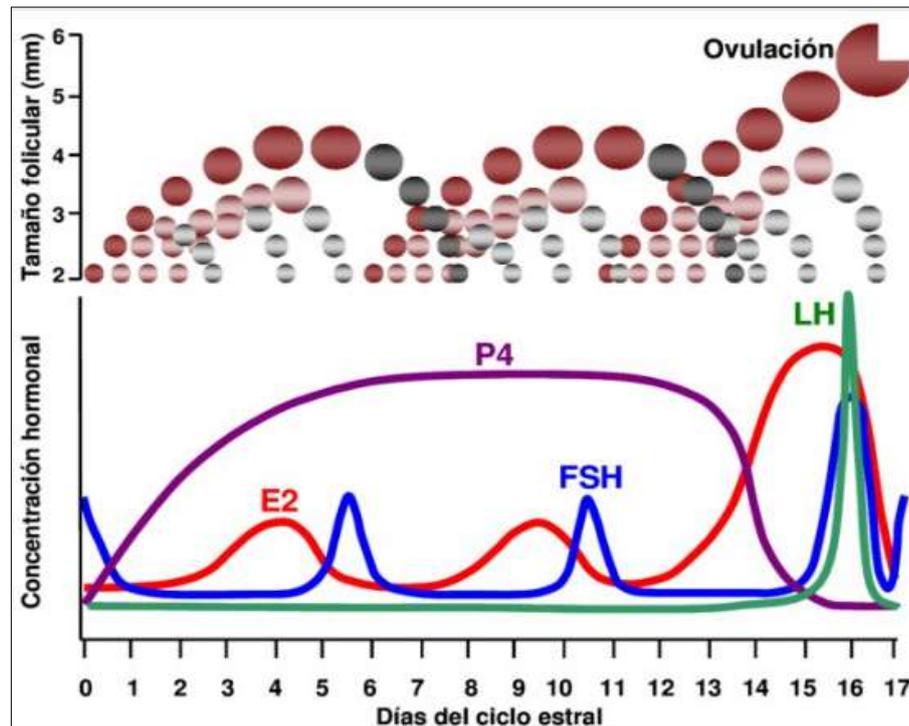


Figura 1.4. Desarrollo folicular y patrones hormonales durante el ciclo estral ovino (Adaptado de Simonetti, 2008).

Protocolos de Sincronización de Celos y Ovulación

Existen métodos naturales que permiten controlar la reproducción en los ovinos basados en el manejo del ambiente, ya sea a través del control de la exposición a las horas luz o de la exposición a un macho durante el período de transición, maniobra conocida como efecto macho (Abecia y col., 2011). Los métodos farmacológicos, por otro lado, se basan en la aplicación de hormonas exógenas que actúan sobre el patrón reproductivo anual (melatonina) o modificando la fase luteal del CE (P₄ o progestágenos, PGF; Abecia y col., 2011). El manejo de la fase luteal es el principal método utilizado para controlar y sincronizar la ovulación de las ovejas; ya sea por el uso de PGF como de P₄ o progestágenos.

Prostaglandina F_{2α}

La PGF es un ácido graso insaturado compuesto por 20 átomos de carbono, derivado del ácido araquidónico. Contiene un anillo ciclopentano y dos cadenas laterales con un grupo oxhidrilo en la posición 9 ((Senger, 2006a; Figura 1.5).

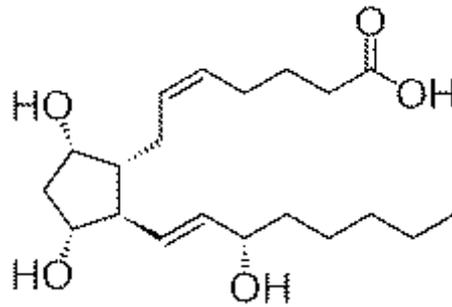


Figura 1.5. Estructura química de la PGF (Fvasconcellos, 2008)

Protocolos de sincronización de celos con PGF

La PGF es utilizada en pequeños rumiantes a partir de la identificación de PGF uterina como agente luteolítico en la oveja (Díaz y col., 2002; Pate y Keyes, 2001). La aplicación de PGF o análogos a partir del día 3-5 del CE puede inducir la luteólisis, seguido del estro y la ovulación (Acritopoulou y Haresign, 1980; Mellin y Busch, 1976). La aplicación de PGF en una majada cíclica con un estado reproductivo desconocido resulta en un elevado número de hembras en celo (Acritopoulou y Haresign, 1980) aunque el inicio del estro, momento del pico preovulatorio de LH y la ovulación varían según el status individual (Acritopoulou y Haresign, 1980), ya que dependerá del momento de la fase luteal en la que es aplicada, lo que se relaciona con la liberación de P₄, LH y FSH así como con el desarrollo folicular y la dosis utilizada (Abecia y col., 2011; Acritopoulou y Haresign, 1980; Fierro y col., 2013; Rubianes y col., 2003). La aplicación IM de PGF o sus análogos sintéticos puede ser a dosis única o dos dosis separadas por 9-14 d (Abecia y col., 2011; Acritopoulou y Haresign, 1980; Cueto y Gibbons, 2011; Fierro y col., 2013; Fierro y Olivera-Muzante, 2018; Menchaca y Rubianes, 2004), presentándose una alta proporción (80-90%) de hembras con manifestación de celos durante los cuatro días siguientes a la segunda aplicación de PGF (Abecia y col., 2011; Cueto y Gibbons, 2011; Menchaca y Rubianes, 2004), por lo cual se sugiere el empleo de machos retajos para la detección de celos para la posterior IA (Olivera-Muzante y col., 2011). Sin embargo, Cueto y Gibbons (2011) obtuvieron un 70 % de fertilidad (hembra preñada/hembra IA) luego

de sincronizar con una doble aplicación de PGF (125 µg cloprostenol) separadas por 14 d y realizar IATF a las 53-56 h con semen fresco por vía cervical.

Por otra parte, ha sido descripto que la refractariedad del CL a la PGF comprende solamente los dos primeros días posteriores a la ovulación (Rubianes y col., 2003). Menchaca y Rubianes (2004) propusieron un protocolo de SC denominado Synchrovine® (Cámara Nacional de Registros, Montevideo Uruguay) consistente en la aplicación de 2 dosis de PGF con un intervalo de 7 d; basándose en la duración de la onda folicular (5-7 d) y en el período de refractariedad del CL (primeros 2 d post ovulación). La disminución del intervalo entre dosis tiene como objetivo obtener una mayor sincronización de las ovulaciones luego de la segunda dosis de PGF (Menchaca y Rubianes, 2004; Vilariño y col., 2017). Sin embargo, el porcentaje de preñez varió entre el 30-65 %, dependiendo de la vía y el momento de IA (Fierro y col., 2013; Menchaca y Rubianes, 2004; Olivera-Muzante y col., 2011a; Vilariño y col., 2017). Modificaciones en el protocolo original tales como la disminución de la dosis, la separación en 8 d entre aplicaciones o la aplicación de GnRH, no arrojaron mejoras en los valores de fertilidad (Olivera-Muzante y col., 2011b). Sin embargo, aumentar el período entre aplicaciones a 12 - 14 d podría mejorar parámetros reproductivos luego de IATF, ya que el desarrollo del folículo pre-ovulatorio ocurre bajo la influencia de elevadas concentraciones de P₄ (Fierro y col., 2013).

En resumen, la PGF puede ser utilizada en una única aplicación o en dos aplicaciones separadas por 7 d o por 9-14 d. Aunque los protocolos de SC con PGF o análogos poseen como ventajas el bajo costo por dosis, la rápida y fácil aplicación y la concentración de celos durante un período corto tiempo, la PGF tiene el impedimento de ser utilizada en contra estación reproductiva, ya que sólo es efectiva ante la presencia de un CL sensible a la acción de la PGF. En majadas donde la CC es baja o hay un alto número de ovejas en anestro, la eficiencia global de las PGF se reduce sustancialmente; por lo tanto, su uso está limitado a majadas con un alto porcentaje de ovejas ciclando durante la época reproductiva. La utilización de IATF en estos

protocolos aún no está estandarizada debido a que los resultados han sido variables dependiendo del número de días que separan las aplicaciones, de la vía y momento de la IA.

Progesterona y progestágenos

La P_4 es una hormona esteroidea formada por un núcleo de ciclopentanoperhidrofenantreno, con grupos funcionales cetona y metilo (Figura 1.6).

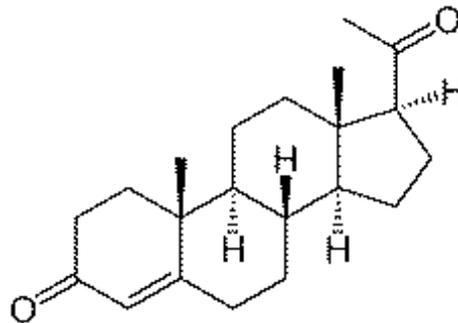


Figura 1.6. Composición química de la molécula de progesterona (NEUROTicker, 2007b)

La P_4 es secretada por las células luteales (Hansen y col., 2017) y la placenta (Senger, 2006a), y su secreción es estimulada por la LH (Hafez, 2007; Senger, 2006d). Es transportada en la sangre unida a una globulina hacia los tejidos blanco, actuando sobre el endometrio, glándula mamaria y el hipotálamo (Hafez, 2007; Senger, 2006b). Al llegar a las células blanco difunde a través de la membrana celular y nuclear, gracias a su solubilidad lipídica (Senger, 2006b). Se une a su receptor nuclear específico, iniciando la síntesis de mRNA específico y la síntesis de proteínas (Senger, 2006b). La P_4 actúa en el útero incrementando el número de glándulas secretorias endometriales, inhibiendo la motilidad del miometrio y promoviendo el mantenimiento de la gestación; en las glándulas mamarias provoca el desarrollo del tejido secretor (Senger, 2006a). Mediante un mecanismo de feed-back negativo sobre el hipotálamo y la hipófisis, la P_4 inhibe la síntesis y liberación de GnRH, LH y FSH (Hafez, 2007; Noakes y

col., 2008), y la ovulación (Hafez, 2007). Finalmente, es metabolizada en el hígado y excretada por orina y heces (Senger, 2006b).

Los progestágenos más utilizados en los procesos de SC en pequeños rumiantes son dos: el acetato de medroxiprogesterona (MAP) y el acetato de fluorogestona (FGA), los cuales se aplican a través de esponjas intravaginales (EIV), y en menor medida el norgestomet, el cual es aplicado mediante implantes.

Vías de administración

Dutt & Casida (1948) demostraron que la aplicación de 10 mg/d de P₄ por vía IM provocaba el bloqueo del celo y la ovulación en ovejas cíclicas, iniciando de esta manera una serie de investigaciones con el objetivo de controlar el ciclo estral de los ovinos mediante la administración de P₄ o progestágenos aplicados por vía oral (Dziuk, 1965; Southcott y col., 1962), IM (Bindon y Roberts, 1964; Robinson, 1956), vaginal (Robinson, 1964, 1967; Robinson y col., 1970; Robinson y col., 1968) o como implantes subcutáneos (Ainsworth y Wolynetz, 1982; Dziuk y col., 1968; Hunter, 1982; Luther y col., 2007; Oliveira y col., 2001; Wildeus, 2000).

La aplicación por vía IM de 10 mg/d de P₄, durante 12 a 15 d consecutivos, o de 20 mg/d de P₄ día por medio, demostró una mejor SC que la inclusión de progestágenos en la ración diaria, ya que el celo se reanudó tres días más tarde de finalizado el tratamiento (TRT), aunque con una fertilidad muy baja (30-50 %; Hunter, 1982; Robinson, 1956). Tanto la administración oral como la administración IM presentaron como inconvenientes el costo de la droga y el encierre diario de los animales (Durán del Campo, 1980) por lo que se iniciaron estudios sobre la utilización de pesarios o EIV impregnados con P₄ o con progestágenos (Robinson, 1964; Robinson y col., 1968) y DIV siliconados impregnados con P₄ (Rathbone y col., 1998).

Protocolos de sincronización de celos con progestágenos o P₄

Durante la década de los 60, se desarrollaron los primeros protocolos de SC mediante el uso de EIV o implantes auriculares impregnados con P₄ o progestágenos (Robinson, 1964; Robinson y col., 1970, 1968).

Estos protocolos se basan en la duración de la fase lútea, por lo que los EIV o DIV con P₄ o progestágenos permanecen por un lapso de 12-14 d y se aplica una dosis de 250-400 UI de eCG vía IM 24-48 h previas al retiro o al momento del retiro del DIV (Wildeus, 2000). De esta manera, la concentración plasmática de P₄ se incrementa durante los primeros 6 d a concentraciones superiores a 2 ng/ml (Ainsworth y Downey, 1986; Rubianes y col., 1996) mientras que en los últimos 6 o 4 d del protocolo ocurre un descenso de las mismas a concentraciones ~1ng/ml (Ainsworth y Downey, 1986), lo cual difiere de lo que ocurre fisiológicamente, ya que durante la fase luteal las concentraciones de P₄ séricas aumentan lentamente y al momento de la luteólisis disminuyen en forma abrupta (Goodman, 1994). Las concentraciones plasmáticas subluteales de P₄ provocan un recambio folicular más lento y promueven un excesivo desarrollo y persistencia del folículo dominante; lo cual se manifiesta a través de un mayor tamaño folicular, un aumento en la vida media del folículo (Viñoles y col., 2001, 1999) y en que la ovulación ocurre a partir de ovocitos envejecidos (Flynn y col., 2000; Viñoles y col., 2001). Estas alteraciones resultan en una menor fertilidad respecto a las ovulaciones no inducidas artificialmente (Johnson y col., 1996; Ungerfeld y Rubianes, 1999; Viñoles y col., 2001).

A partir de la confirmación de la presencia de ondas foliculares durante el CE ovino, se realizaron experiencias de SC basándose en el tiempo transcurrido entre la emergencia de una y otra onda folicular (Rubianes, 2000; Ungerfeld y Rubianes, 1999; Viñoles y col., 2001). Estos protocolos de SC, denominados protocolos cortos, se diferencian de los tradicionales por presentar principalmente un período de exposición a la P₄ exógena o progestágenos de 5-7 d,

evitando concentraciones plasmáticas subluteales de P₄ por períodos prolongados de tiempo. Las concentraciones plasmáticas supraluteales de P₄ disminuyen la tasa de crecimiento y el tamaño del folículo dominante y favorecen el recambio folicular, asegurando la presencia de un folículo “joven” al momento de la ovulación (Rubianes y col., 1996). Ungerfeld y Rubianes (1999, 2002) concluyeron que la utilización de protocolos de SC en ovejas en contra estación reproductiva, basados en el uso de EIV impregnadas con MAP o FGA, o DIV (CIDR-G[®], InterAg, Hamilton, New Zealand) durante 6 d, la aplicación IM de 330-400 UI de eCG al momento del retiro y servicio natural (SN), es efectiva en la inducción de celos (94 % MAP; 91 % FGA y 95 % DIV) con un aceptable porcentaje de preñez (62 % MAP; 67 % FGA y 60% DIV). Por otra parte, Vilariño y col. (2007a) compararon, durante la contra estación reproductiva, un TRT largo de 14 d y un TRT corto de 6 d en ovinos mediante el uso de CIDR-G[®], ambos con la aplicación IM de 330 UI de eCG al retiro del DIV e IATF laparoscópica a las 54 h de retirado el DIV. No hubo diferencias significativas en el porcentaje de preñez (78 vs 78,4 %) ni en la prolificidad (1,3 vs 1,4) para el TRT largo vs TRT corto, respectivamente. Por su parte, Viñoles y col. (2001) compararon un TRT de SC en ovejas durante la época reproductiva utilizando un TRT largo con EIV-MAP durante 12 d y un TRT corto de 6 d con o sin aplicación de eCG al momento del retiro y SN y concluyeron que la obtención de un porcentaje de preñez ~65 % luego de utilizar TRT largos se relacionó con un recambio folicular más lento que provoca la ovulación de folículos dominantes persistentes; así como que el uso de eCG no tuvo ventajas al ser asociada a TRT largos (67 % de preñez), y fue en detrimento al combinarse con TRT cortos (58 % de preñez; p<0,03). La utilización de TRT cortos sin eCG resultó en una mayor tasa de preñez (87 %), posiblemente por la ovulación de folículos jóvenes o por no provocar una ovulación anticipada. Resultados similares se obtuvieron al utilizar EIV-MAP o EIV-FGA durante 5-7 d, con la aplicación IM de PGF y 250-300 UI de eCG al momento del retiro del pesario y el uso de IATF con semen fresco por vía cervical a las 50-55 h de

retiradas las EIV (60 %; Gómez y col., 2010), o SN luego de la detección de celo (87 %; Karaca y col., 2009).

La implementación de protocolos cortos sin la aplicación de PGF exógena durante la época reproductiva induce dispersión de celos (36-144 h) debido a que la regresión luteal se produce en diferentes momentos (Menchaca y col., 2004; Viñoles y col., 2001). La aplicación de PGF 24 h previas o al momento del retiro del DIV producen un elevado porcentaje de ovejas en celo (~83 %), con un porcentaje de preñez al primer servicio de ~67 % (Dixon y col., 2006). En cabras, la aplicación de una dosis de PGF al inicio de un TRT corto de SC indujo la regresión del CL en el 91,3 % de los animales con un porcentaje de preñez del 49,3 % y del 63,7 % luego de una IATF a las 48 y a las 54 h, respectivamente (Menchaca, 2006). Vilariño y col. (2007b) evaluaron la respuesta de la aplicación de PGF al inicio o al final de un TRT corto (6 d) en ovejas en fase luteal temprana (1-5 d posteriores al estro) o tardía (6-12 d posteriores al estro) y concluyeron que la administración de PGF al momento de la colocación del DIV en ovejas en fase luteal temprana resulta en un menor porcentaje de hembras en celo en comparación con el grupo de fase luteal tardía (48,9 vs. 92,2 %; $p < 0,05$); mientras que no existió diferencia significativa entre grupos al aplicar la PGF al retiro del DIV (79,8 vs 79,2 %).

Gonadotropina coriónica equina

La eCG es una hormona placentaria glicoproteica sintetizada por las copas endometriales equinas en el primer tercio de gestación, cuya función es inducir el desarrollo de CL accesorios para el mantenimiento de la gestación. Está formada por dos subunidades (α y β), la unidad β es codificada por el mismo gen que codifica a la LH equina, de la que se diferencia por el grado de glicosilación. Posee una vida media de 5 d (Dieleman y col., 1993) y en tejidos de origen no equino tiene la capacidad de unirse a receptores de FSH y LH (Murphy, 2018).

En los pequeños rumiantes, la utilización de P₄ o progestágenos se complementa con una aplicación IM de eCG, independientemente del tipo de TRT de SC utilizado (largo o corto) y de la época (reproductiva o contra estación; Abecia y col., 2011; Drion y col., 2001; Menchaca y Rubianes, 2004; Wildeus, 2000). El uso reiterado de eCG en cabras y ovejas provoca una disminución de su eficacia, ya que la administración repetida de esta gonadotrofina resulta en una respuesta humoral inmune anti-eCG. Esta respuesta humoral responde incluso a una aplicación de eCG previa de un año (Chemineau y col., 1999). Bodin y col. (1997), realizaron un estudio a partir de la sincronización con EIV-FGA y una aplicación IM de 500-550 UI de eCG en ovejas con TRTs previos y sin ningún TRT previo de sincronización (control) y determinaron que la tasa de unión de anticuerpos anti-eCG (ACaeCG) en los animales control fue del 1-2 %, mientras que en los animales tratados la media de la tasa de unión fue del 14,7%. Así mismo, concluyeron que la presencia residual de ACaeCG aumenta con la edad de las hembras e induce efectos negativos en la fertilidad de la siguiente IA.

Drion y col. (2001) analizaron los efectos producidos por la repetición de protocolos de SC mediante el uso de EIV-FGA y la aplicación de 250 UI de eCG en hembras nulíparas y 400 UI en hembras primíparas/múltiparas, durante 4 años consecutivos en dos hatos caprinos durante la estación reproductiva. La repetición de los tratamientos provocó un aumento en la respuesta inmunológica a la eCG, lo que produciría un retraso en la presentación de celo y del pico de LH, conllevando un descenso de la fertilidad. Aunque en ambos hatos se observó el incremento en la producción de ACaeCG, los parámetros reproductivos (estro y fertilidad) difirieron entre los grupos de animales, sugiriendo una posible influencia de las hembras o factor individual debido a que los hatos presentaron diferencias significativas en la tasa de unión previa al tratamiento ($p=0,02$). Esto fue corroborado por Maurel y col (2003), quienes obtuvieron un menor porcentaje de parición en las hembras con mayor tasa de ACaeCG residual en comparación con aquellas que presentaban bajas concentraciones de ACaeCG. Esta

disminución en el porcentaje de parición pudo ocurrir por un retraso en el estro y en la presentación del pico preovulatorio de LH. Forcada y col. (2010) compararon los resultados de un tratamiento superovulatorio en ovejas con concentraciones mayores o menores a 3 µg/ml de ACaeCG y SN. La tasa de fecundación (fecundados/recuperados), en las hembras con elevadas concentraciones de ACaeCG previos, fue menor en comparación con ovejas que poseían bajas concentraciones de ACaeCG (1°TRT: 58 y 80 %, 2°TRT: 17 y 81 %, 3°TRT: 45 y 100 %; respectivamente).

17 β estradiol y sales de estradiol

El 17β E₂ es una hormona esteroidea que, al igual que la P₄ presenta un núcleo básico común, el núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno (Figura 1.7). Es el principal estrógeno y es producido principalmente por las células de la teca interna y la granulosa del folículo ovárico (Hafez, 2007). Es transportado por proteínas de unión en la circulación sanguínea hasta el órgano blanco, donde actúa y luego es metabolizado por vía hepática y excretado por orina o heces (Hafez, 2007; Senger, 2006b). Actúa sobre el SNC de manera de inducir la conducta estral en la hembra; en el hipotálamo actúa estimulando o inhibiendo la liberación de LH y FSH. En el útero estimula el crecimiento celular de endometrio y miometrio e incrementa la amplitud y frecuencia de las contracciones al potenciar los efectos de la oxitocina y la PGF (Hafez, 2007; Senger, 2006d, 2006b). Así mismo, actúa sobre la glándula mamaria estimulando el crecimiento glandular y en el tracto reproductivo produciendo el característico comportamiento estral, estimulando la secreción de todo el aparato reproductivo y la motilidad uterina (Hafez, 2007; Senger, 2006c).

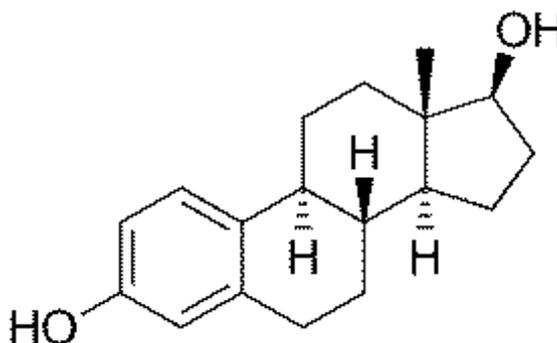


Figura 1.7. Composición química de la molécula de estradiol (NEUROTicker, 2007a)

A fines del siglo pasado y comienzos del actual, se realizaron experimentos en bovinos con el objetivo determinar el efecto de 17β E₂ o de sales de E₂; como el BE, el valerato o el cipionato de E₂ en la dinámica folicular (Ayres y col., 2008; Bo y col., 1993, 1994, 1995a, 1995b, 2000; Martínez y col., 2015; Rivera y col., 1998). La administración de estrógenos en la fase de altas concentraciones séricas de P₄ induce la regresión folicular y la emergencia de una nueva onda folicular; en cambio, la administración durante la fase de bajas concentraciones de P₄ induce la liberación de LH y la ovulación (Bo y col., 2006). Si se administra E₂ en presencia de un folículo FSH dependiente, se produce la regresión folicular de éste al disminuir las concentraciones de FSH por retroalimentación negativa. Al momento en que el E₂ retorna a su concentración basal emerge una nueva onda folicular junto con un nuevo pico de FSH variando el momento de retorno de acuerdo con el éster de E₂ utilizado. Si se administra en presencia de un folículo LH dependiente, el E₂ previene la emergencia de una onda folicular hasta que retorna a su concentración basal (Bo y col., 1994; Bo y col., 1995a, b; Driancourt, 2001). En los bovinos, la combinación de 17β E₂ y progestágeno/P₄ induce la emergencia de una nueva onda folicular alrededor de cuatro días más tarde, independientemente del estado de la onda folicular al momento de iniciar el TRT (Bo y col., 1994; 1995a, b; Driancourt, 2001). Así mismo, la aplicación de 0,5 mg BE 24 h posteriores a la administración de PGF al momento de emergencia de la onda folicular reduce el intervalo desde la aplicación de PGF hasta el celo ($p < 0,01$), el pico de LH ($p < 0,001$) y la ovulación ($p < 0,01$), en comparación con las vacas no

tratados (Evans y col., 2003). Si el BE es aplicado 24 h posteriores a la administración de PGF al día de inicio de la dominancia, se presenta una reducción del intervalo PGF-pico de LH ($p < 0,05$) y tiende a disminuir el intervalo PGF-celo ($p=0,11$) y PGF-ovulación ($p=0,12$). En ambas situaciones no se ven alterados ni el tamaño del CL ni la duración del CE siguiente (Evans y col., 2003).

Como resultado de lo anteriormente mencionado, uno de los protocolos de SC y ovulación comúnmente utilizados en los programas de IATF en bovinos combina la utilización de P_4 , PGF y sales de E_2 . En dicho protocolo la utilización de BE luego de retirado el DIV favorece la sincronización del pico de LH y la ovulación; obteniéndose valores de preñez 50-60% (Bo y col., 2003).

Valenzuela-Jiménez y col (2004) realizaron dos experimentos para evaluar el efecto del BE en la presentación del pico de LH, el momento de la ovulación y la fertilidad en cabras sincronizadas con acetato de melengestrol (MGA). El trabajo concluyó que la administración de BE al inicio del estro en cabras tratadas con MGA induce el pico de LH y la ovulación, aunque disminuye la fertilidad. Menchaca y col. (2007) y Menchaca y Rubianes (2007) realizaron una serie de experimentos en cabras basados en el uso de un DIV durante 5 d, la aplicación IM de PGF al momento de la inserción (grupo control: CON) y de 250 UI de eCG al retirar el DIV (Grupo eCG) o de 200 μg de BE a las 24 h posteriores al retiro (Grupo BE). El desarrollo folicular durante el tratamiento con P_4 dependió de la presencia o no de un folículo de ≥ 5 mm de diámetro y en la fase de desarrollo de este. En aquellas hembras que presentaron un folículo ≥ 5 mm en la fase de regresión, un nuevo folículo continuó desarrollando hasta el retiro del DIV. Si el folículo ≥ 5 mm se encontraba en la fase de crecimiento ocurrió la regresión de este en el 75 % de los casos y emergió una nueva onda folicular, o bien el folículo mantuvo su crecimiento hasta la ovulación. El diámetro del folículo ovulatorio no varió al momento del retiro del DIV ($7,8 \text{ mm} \pm 1,1$) pero sí al momento de la ovulación (Grupo BE: 8,6 mm; CON:

10,7 mm; Grupo eCG: 9,9 mm; $p < 0,05$). La proporción de hembras que manifestaron celo y el inicio del celo luego del retiro del DIV (~30 h) no difirieron significativamente entre los grupos. En cambio, la duración del celo fue menor en los Grupo BE y Grupo eCG comparado con el CON (~30 h vs ~40 h; $p < 0,05$). El intervalo entre el retiro de DIV y el pico de LH en los grupos de eCG y BE fue menor con respecto al grupo CON (38,4 h y 41 h vs 46,3 h, respectivamente; $p < 0,05$). La concentración sérica máxima de LH fue similar entre los grupos y el intervalo retiro DIV-ovulación (IO) fue significativamente menor en los grupos de BE y de eCG que el CON (63, 58,8 y 70,2 h, respectivamente; $p < 0,05$). La IATF se realizó a las 54 h de retirados los DIV, con semen fresco por vía cervical, obteniéndose un porcentaje de preñez significativamente menor en el grupo de BE (40 % vs 61 %; $p < 0,05$). Los autores concluyeron que una dosis de 200 μg de BE a las 24 h de retirado el DIV fue efectiva en inducir estro, pico de LH y ovulación en tiempos similares al grupo eCG, a pesar de que el porcentaje de preñez con BE fue menor.

En ovejas ovariectomizadas, la administración de 50 μg de BE produce un aumento en la sensibilidad hipofisaria a la GnRH (Clarke y col., 1988); durante la fase folicular, el incremento de E_2 circulante induce un pico en la síntesis y liberación pulsátil de GnRH por retroalimentación positiva (Karsch y col., 1997) y un consecuente pico de LH, con características similares al pico preovulatorio (Meikle y col., 2001).

Así mismo, el tratamiento en ovejas en contra estación con EIV-MAP por 12 d y la aplicación IM de una dosis de $17\beta \text{E}_2$ 6 d previos al retiro de la EIV, produjo la disminución de la concentración sérica de FSH en un intervalo mayor de tiempo en comparación con la aplicación IM única de $17\beta \text{E}_2$, aunque indujo un pico de FSH de menor duración y mayor amplitud luego de la inicial disminución (Barrett y col., 2008). La aplicación única de E_2 durante el anestro estacional no sincronizó la emergencia de la onda folicular, en cambio cuando se utilizó junto con MAP la onda folicular fue sincronizada (Barrett y col., 2008).

GnRH

La GnRH es un decapeptido de origen hipotalámico que actúa en la hipófisis regulando la síntesis y liberación de FSH y LH. Tanto la hormona natural como sus análogos sintéticos inducen el desarrollo folicular y la funcionalidad del CL de manera indirecta, a través de la liberación de LH y FSH por parte de la hipófisis (Karaca y col., 2009).

En ovinos, la aplicación de GnRH 36 h posteriores al retiro de la EIV mejoró la sincronización de la ovulación durante la época reproductiva en comparación con hembras que no recibieron GnRH ($p=0,04$), aunque no mejoró el porcentaje de preñez luego de la IATF por vía laparoscópica a las 42 h (23 vs 21 %; Reyna y col., 2007). La aplicación de acetato de busarelina, un análogo sintético de la GnRH, al momento de la inserción de la EIV en un protocolo de SC de 7 d causó un mayor porcentaje de gestaciones múltiples en comparación con igual protocolo sin su aplicación (71 vs 52 % $p<0,05$), aunque el porcentaje de preñez fue similar entre ambos grupos (89,6 % vs 87,3 %; Karaca y col., 2009).

La GnRH ya ha sido utilizada en protocolos de SC e IATF en ovinos (Abecia y col., 2011; Cavalcanti y col., 2012; Karaca y col., 2009; Luther y col., 2007; Menchaca, 2006; Reyna y col., 2007) por lo cual sería importante realizar un estudio comparativo sobre la eficacia entre el BE y la GnRH para inducir la ovulación con el fin de determinar si el BE es igualmente efectivo que la GnRH en la inducción de la ovulación en protocolos de SC e IATF en ovinos. Si el BE probara ser tan efectivo como la GnRH, justificaría su utilización en países donde los costos de producción y la falta de subsidios gubernamentales a la producción limitan la utilización de protocolos de sincronización de celo e IATF que poseen altos costos por preñez lograda.

En resumen, la optimización de los protocolos de SC e IATF permitiría su mayor utilización como herramienta técnica para la introducción de material genético en las majadas

en nuestro país. Además, permitiría mejorar el bienestar animal, la eficiencia de la IA y del tiempo laboral del personal de campo. Sin embargo, esto ocurre en menor medida debido a que en nuestro país está arraigado el uso de protocolos largos de SC con dos dosis de PGF cada 11-14 d. Estos protocolos tienen la desventaja de que solamente sincronizan la lisis del CL, pero no sincronizan la dinámica folicular y la ovulación. En bovinos, desde hace más de una década, que se utilizan protocolos de SC que combinan DIV nuevos o reutilizados, PGF y BE con excelentes resultados. De hecho, la utilización de estos protocolos ha permitido la masificación de la IATF en rodeos de carne en vacas con cría al pie. En Uruguay también desde hace varios años se ha comenzado a utilizar protocolos cortos de SC para IATF con DIV, eCG, PGF, y GnRH o BE en pequeños rumiantes. Sin embargo, en nuestro país aún no se dispone de datos sobre la efectividad de dichos protocolos.

Por lo expuesto a lo largo del capítulo puede inferirse que el uso repetido de eCG en los procesos de SC o superovulación en los pequeños rumiantes reduce la posibilidad de obtener buenos resultados en los procesos de IA y en base a los avances ocurridos en el conocimiento de la dinámica folicular y en el uso de protocolos de sincronización de ovulaciones sería necesario realizar estudios en nuestro país para evaluar la utilización conjunta de DIV de P₄ nuevos o usados durante 5 d para inducir el recambio folicular, el uso de PGF para inducir la luteólisis, y la aplicación de BE o GnRH para inducir la ovulación dentro un protocolo de SC que permitan realizar la IATF. Esto facilitaría la diseminación de la IATF en el manejo reproductivo de las majadas en nuestro país.

De lo anteriormente expuesto se planteó como objetivo general evaluar la eficacia de los tratamientos cortos de SC mediante el uso de DIV con P₄ junto con la aplicación IM de PGF y de BE post retiro del DIV, para su uso en la IATF en ovinos durante la época reproductiva. La hipótesis general consistió en que la aplicación de BE, en un protocolo de SC basado en la aplicación de un DIV con P₄ por cinco días junto con una dosis de PGF al momento del retiro

del DIV, permitiría obtener porcentajes de preñez similares a los protocolos de SC basados en la aplicación de un DIV con P₄ y una dosis de PGF y eCG al momento del retiro del DIV.

Así mismo se definieron tres objetivos específicos: 1) evaluar la utilización y reutilización de DIV con una concentración inicial de 160 mg de P₄ (Capítulo I, Experimento I); 2) determinar la mejor dosis y momento de aplicación de BE dentro de un protocolo de SC para inducir la ovulación, en base al estudio del crecimiento folicular y momento de ovulación (Capítulo II, Experimentos II y III) y 3) evaluar la fertilidad obtenida luego de la IATF con semen fresco por vía cervical en ovejas sincronizadas con un protocolo corto de SC que al momento del retiro del DIV utiliza una dosis luteolítica de PGF y una dosis de 100 µg de BE para inducir la ovulación, como una alternativa válida a los protocolos de EIV, PGF y eCG (Capítulo III, Experimento IV).

CAPITULO I

EVALUACIÓN DEL PERFIL SÉRICO DE PROGESTERONA EN OVEJAS LUEGO DE LA COLOCACIÓN DE UN DISPOSITIVO INTRAVAGINAL DE SILICONA LIBERADOR DE PROGESTERONA NUEVO O USADO

INTRODUCCIÓN

La utilización de DIV de liberación de P₄ para la SC en ovinos comenzó a mediados de la década de 1980 como una alternativa al sistema de liberación de progestágenos mediante EIV (Rathbone y col., 1997). El primer DIV desarrollado para ser utilizado en ovejas fue el CIDR-S[®] con 370 mg de P₄ (InterAg, Hamilton, New Zealand; Carlson y col., 1989; Rathbone y col., 1998; Wheaton y col., 1993; Wildeus, 2000). El CIDR-G[®] (InterAg, Hamilton, New Zealand) fue desarrollado unos años más tarde para ser utilizado en cabras (Rathbone y col., 1997). El CIDR-G[®] (InterAg, Hamilton, New Zealand) tiene 300 mg de P₄ y mayor facilidad de inserción que el CIDR-S[®] (InterAg, Hamilton, New Zealand) debido a su forma más delgada (Rathbone y col., 1997), lo que permite su uso en borregas, cabras y ovejas con una vagina más estrecha (Rathbone y col., 1997, 1998; Wheaton y col., 1993). La tasa de retención del CIDR-G[®] (InterAg, Hamilton, New Zealand) en hembras ovinas multíparas ha demostrado ser eficaz como la del CIDR-S[®] (InterAg, Hamilton, New Zealand; Wheaton y col., 1993).

Estudios recientes realizados en Brasil y Uruguay dan cuenta de la utilización de DIV de primer, segundo y tercer uso para pequeños rumiantes (CIDR-G[®], InterAg, Hamilton, New Zealand / DICO-CO[®], Syntex, Argentina; 300 mg de P₄). Los DIV fueron utilizados en la estación reproductiva (Uribe-Velásquez y col., 2011; Vilariño y col., 2010, 2013) y en la

estación no reproductiva (Pinna y col., 2012; Vilariño y col., 2011, 2013). Los porcentajes de celos y ovulación correspondieron a valores entre 80 % y 100 %, mientras que el % de preñez presentó un rango entre 20 % y 80 % según el número de veces que fue utilizado el DIV y la realización de IATF o SN (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Parámetros reproductivos obtenidos con DIV de 1°, 2° y 3° uso

Uso DIV	% celo	% ovulación	% preñez	Autor
1° uso	s/r	80	80	Vilariño y col., 2013
2° uso	s/r	90	s/r	Semen fresco IATF laparoscópica
3° uso	s/r	100	71	
1° uso	93	78	79	Pinna y col., 2012
2° uso	93	90	43	SN
3° uso	100	100	61	
1° uso	93	78	23	Pinna y col., 2012
2° uso	93	90	20	Semen fresco IATF laparoscopia
3° uso	100	100	33	
1° uso	100	100	75	Vilariño y col., 2011
2° uso	100	100	67	Semen fresco IATF cervical
3° uso	100	100	62	
2° uso 6d	100	s/r	67	Uribe Velazquez y col., 2011 (cabras)
2° uso 9d	100	s/r	44	SN
3° uso 13d	100	s/r	44	

s/r: sin registro SN: servicio natural

Asimismo, las concentraciones séricas de P₄ se mantuvieron por arriba de 2 ng/ml para el primero y segundo uso del DIV (Vilariño y col., 2011, 2013); pero las concentraciones séricas fueron inferiores a 2 ng/ml para el tercer uso (Vilariño y col., 2013). En ovejas, las concentraciones de P₄ <2 ng/ml (niveles subluteales) promueven el crecimiento excesivo y la persistencia del folículo de mayor tamaño (Viñoles y col., 1999), aumentando la edad del folículo ovulatorio (Johnson y col., 1996). En nuestro país, un DIV que contenía 160 mg de P₄ estuvo disponible en el mercado bajo el nombre de Cronipres CO[®] (Biogénesis-Bagó, Argentina). Sin embargo, no existe información sobre las concentraciones de P₄ alcanzadas con el 1^{er}, 2^{do} o 3^{er} uso en ovejas.

Tampoco existen resultados de estudios farmacocinéticos mediante análisis no compartimental de las concentraciones séricas de P₄ luego de la colocación de DIV nuevos o usados en ovejas. La farmacocinética es el estudio de la evolución temporal de las

concentraciones de los medicamentos y sus metabolitos en los diferentes fluidos, tejidos y emuntorios del organismo y de las relaciones matemáticas necesarias para desarrollar modelos adecuados que permitan interpretar tales datos (Gibaldi y Perrier, 1982). Esta disciplina debe tenerse en cuenta para el mejoramiento y la optimización de los tratamientos terapéuticos (Gibaldi y Perrier, 1982). Sin embargo, frente a un mismo fármaco y un mismo esquema terapéutico, existen diferencias en las respuestas que son atribuibles a la variabilidad PK. Dicha variabilidad incluye las diferencias de especie, la variabilidad individual y la influencia que ejercen los estados patológicos sobre los procesos que atraviesan los fármacos en el organismo (Baggot, 2002).

Por lo descripto anteriormente, se planteó como el objetivo evaluar la utilización y reutilización de DIV con una concentración inicial de 160 mg de P₄.

La hipótesis de trabajo fue que ambos DIV, tanto nuevos como usados, eran capaces de liberar >2 ng/ml de P₄ durante el 1^{er} y 2^{do} uso en un período de 7 d desde su colocación.

MATERIALES Y METODOS

Experimento I

Diseño Experimental

El estudio se realizó durante la estación reproductiva en el predio de la FCV-UNLP (latitud 34° 54'S, longitud 57°55'O), y el experimento se realizó de acuerdo con las recomendaciones internacionales especificadas en la guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (NRC, 1986) y el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP). Se utilizaron hembras ovinas cruce (n=20) con CC 2,5-3,0 (1 emaciada a 5 gorda;), las cuales fueron alimentadas con heno de alfalfa y balanceado comercial, y con acceso ad-libitum al agua de bebida. Se utilizaron DIV nuevos y usados con 300 mg de P₄

(CIDR G[®], InterAg, Hamilton, New Zealand) o 160 mg P₄ (Cronipres CO[®], Biogénesis-Bagó, Argentina). Todos los DIV usados fueron colocados, previo al inicio del experimento, en ovejas durante 7 d para que se consuma el contenido de P₄ equivalente a un solo uso. Luego del retiro de los DIV, éstos fueron lavados y sanitizados de acuerdo con la técnica descrita por Vilariño y col., (2011) y luego mantenidos en un lugar seco y oscuro hasta su posterior reutilización.

Siete días previos al inicio del experimento (-7 d), todas las hembras recibieron una dosis IM de PGF (75µg de D+ cloprostenol, IM; Enzaprost D-C, Biogénesis-Bagó), la cual se repitió al -1 d con la finalidad de provocar la luteólisis y asegurar la ausencia de P₄ endógena durante el experimento. La colocación del DIV se realizó 24 h posteriores a la segunda aplicación de PGF (d 0; réplica [REP] 1, Figura 2.1). Las ovejas fueron asignadas en forma aleatoria a 5 grupos experimentales:

- 1) Grupo Control (CON; n=4) animales sin DIV;
- 2) Grupo CRONIPRES 1°uso (CRON n=4) animales con DIV nuevo (CRONIPRES CO[®], Biogénesis-Bagó, Argentina) con 160 mg de P₄;
- 3) Grupo CRONIPRES 2°uso: (CROU; n=4) animales con DIV (CRONIPRES CO[®], Biogénesis-Bagó, Argentina) usado;
- 4) Grupo CIDR 1° uso: (CIDN; n=4) animales con DIV nuevo (CIDR-G[®], InterAg, Hamilton, New Zealand) con 300 mg de P₄;
- 5) Grupo CIDR 2° uso: (CIDU; n=4) animales con DIV (CIDR-G[®], InterAg, Hamilton, New Zealand) usado.

A todas las ovejas se les retiraron los DIV luego de 7 d. Al día 18 se aplicó una dosis de PGF vía IM para inducir la luteólisis y asegurar la ausencia de P₄ endógena. En el d 19 se repitió el experimento (d 0; REP 2; Figura 2.1).

Determinación de progesterona

En ambas REP, se recolectaron muestras de sangre por venopunción yugular a la hora 0 (antes de la colocación del DIV) y a las 12, 24, 36, 48, 72, 84, 96, 108, 120, 136, 144, 156, y 168 h luego del inicio de los tratamientos. Además, se realizaron dos ventanas de sangrado, una primera ventana a las 2, 4, 6, 8 y 10 h; y otra a las 170, 172, 174, 176, y 178 h del inicio de la REP (Figura 2.1).

Las muestras sanguíneas se centrifugaron durante 10 min a 2000 rpm y los sueros obtenidos se almacenaron en tubos tipo Eppendorf de 1,5 ml a -20°C hasta su análisis. Las determinaciones de P_4 se realizaron por medio de la técnica de radioinmunoensayo a través de un kit comercial Coat a Count DPC[®] (Los Ángeles, CA USA). Los valores de control bajo fueron 0,5, 0,7 y 0,8 ng/ml y los valores de control alto fueron 5,0, 4,5 y 7,7 ng/ml. El coeficiente de variación (CV) intra-ensayo fue del 9,4 % y el CV inter-ensayo fue del 11,6 % para el pool bajo y para el pool alto fue del 4,2 % y del 6,3 %, respectivamente.

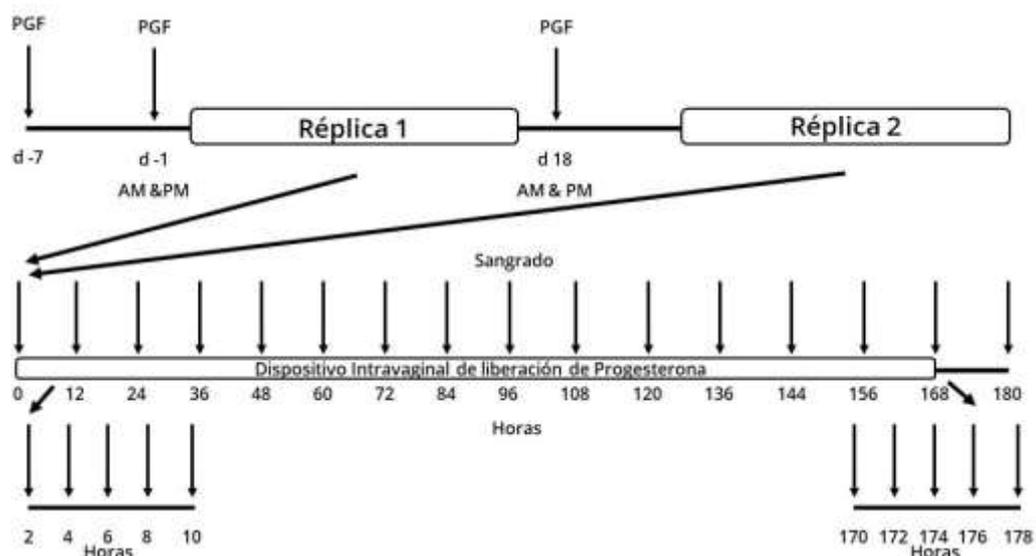


Figura 2.1. Diseño del Experimento I. Las ovejas recibieron dos dosis de PGF los días -7 y -1. El día 0 comenzó REP1. En el día 0, las ovejas (n=20) fueron asignadas al azar a uno de cinco TRT en el que tuvieron un DIV de P_4 durante 7 días (control [CON], sin DIV, n=4; CRONIPRES CO[®] nuevo [CRON; 160 mg P_4], n=4; CIDR-G[®] nuevo [CIDN, 300 mg P_4], n=4; CRONIPRES CO[®] usado [CROU] n=4, CIDR-G[®] usado [CIDU], n=4). Todas las ovejas recibieron una dosis de PGF el día 18, y en el día 19 se inició REP2. En ambas REP, se recolectaron muestras de sangre cada 12 h desde las 0 hasta las 168 h. Se realizó una ventana de sangrado a las 2, 4, 6, 8 y 10 h y a las 170, 172, 174, 176 y 178 h.

Análisis estadístico

Los datos se presentan como cuadrados medios mínimos \pm error estándar. La significancia estadística fue fijada en $P < 0,05$. La oveja fue considerada la unidad experimental. Las concentraciones séricas de P_4 (ng/ml) fueron analizadas mediante análisis de varianza utilizando el procedimiento MIXED de SAS[®] como mediciones repetidas en el tiempo (SAS Institute, 2015). El modelo incluyó el efecto aleatorio de la oveja y el efecto fijo del tiempo (día del tratamiento), tratamiento (CON, CRON, CIDN, CROU, CIDU) y la interacción de tiempo por tratamiento.

El análisis farmacocinético de los datos de concentración de P_4 en función del tiempo obtenidos, se realizó mediante el programa Phoenix[®] 6.3© (2005-2012, Pharsight Certara Company). Entre los parámetros farmacocinéticos utilizados para el presente experimento, se encuentran:

1. Concentración máxima observada ($C_{m\acute{a}x}$)
2. Tiempo de ocurrencia de la concentración máxima ($T_{m\acute{a}x}$)
3. Área bajo la curva concentración en función del tiempo desde el d 0 hasta el d 7 (ABC_{0-7d}). El ABC fue calculada por el método de los trapecoides.
4. Área bajo la curva concentración en función del tiempo extrapolada al infinito ($ABC_{0-\infty}$). El $ABC_{0-\infty}$ es calculada por el programa a partir del ABC versus tiempo desde el tiempo 0 hasta la última concentración medida y se extrapola al infinito sumando el triángulo final obtenido de dividir la última concentración medida por la constante de la tasa de eliminación (Ecuación 1).

Ecuación 1. Área bajo la curva extrapolada al infinito

$$ABC_{0-\infty} = ABC_{0-tx} + \frac{C_{tx}}{\lambda}$$

Donde t_x es el tiempo al cual se determinó la última concentración medible (C_{tx}) y λ es la tasa de eliminación estimada.

5. El tiempo medio de residencia (TMR), o promedio del tiempo que permanece una partícula en el sistema (Ecuación 2).

Ecuación 2. Tiempo medio de residencia

$$\text{TMR} = \frac{\text{ABMC}}{\text{ABC}}$$

Donde ABMC es el área bajo el momento de la curva.

El análisis estadístico de los resultados del análisis farmacocinético se realizó mediante análisis de varianza utilizando el procedimiento GLM de SAS® (SAS Institute, 2015). El modelo incluyó el efecto fijo de tratamiento (CON, CRON, CIDN, CROU, CIDU).

RESULTADOS

Al inicio de las REP (0 h) las concentraciones séricas de P_4 en todos los grupos experimentales fueron menores a 1 ng/ml, confirmando la ausencia de CL durante el experimento (Figura 2.2.A y 2.2.B). Luego de la inserción de los DIV, el T_{max} fue alcanzado entre las 4,5 y 15,7 h, sin presentar diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p > 0,05$). La C_{max} alcanzada fue similar entre CIDN y CRON ($p > 0,05$). En cambio, el grupo CIDU obtuvo mayor concentración que el grupo CROU ($p < 0,05$). El análisis farmacocinético no compartimental determinó que el ABC_{0-7d} fue similar entre grupos CIDN y CRON ($p > 0,05$; Tabla 2.1; Figura 2.2.A.). En cambio, los grupos CIDU y CROU presentaron diferencias significativas entre sí ($p < 0,05$) y con los grupos con DIV nuevos ($p < 0,05$; Tabla 2.1 Figura 2.2.B.). De esta manera, el CIDU tuvo una disminución del 40 % en la concentración sérica de P_4 en comparación con el CIDN y del 29 % en relación con el CRON, manteniendo

las concentraciones séricas hormonales por encima de 2 ng/ml durante los 7 d. El CROU tuvo un descenso del 77 % en comparación con el CIDN, disminuyó un 73 % en relación con el CRON y un 61,5 % en relación con el CIDU; con valores medios de $P_4 < 2$ ng/ml a partir de las 48 h de insertado el DIV. Al analizarse el $ABC_{0-\infty}$, se obtuvieron resultados similares. TMR fue similar entre DIV nuevos y entre DIV nuevos vs. usados ($p > 0,05$). En cambio, al comparar entre los DIV usados, el TMR fue mayor en CIDU que en CROU ($p < 0,05$). Los valores promedio de cada parámetro evaluado en el estudio farmacocinético se presentan en el Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Parámetros farmacocinéticos de las concentraciones P_4 tras la aplicación de DIV nuevo y usado (cuadrado medio mínimo \pm error estándar) en ovejas

Grupo	ABC_{0-7} (ng h/ml)	$ABC_{0-\infty}$ (ng h/ml)	C_{max} (ng/ml)	T_{max} (h)	TMR (h)
CIDN	980,73 \pm 88,19 ^A	982,37 \pm 88,53 ^A	10,80 \pm 1,03 ^A	7,00 \pm 1,06	75,64 \pm 2,49
CRON	822,93 \pm 103,54 ^A	830,56 \pm 103,12 ^A	10,18 \pm 1 ^A	4,50 \pm 0,82	68,85 \pm 2,24
CIDU	586,48 \pm 66,39 ^{B,C}	589,42 \pm 65,63 ^{B,C}	5,51 \pm 0,86 ^{B,C}	15,75 \pm 8,16	81,22 \pm 1,55 ^C
CROU	226,15 \pm 33,16 ^{B,D}	231,00 \pm 36,12 ^{B,D}	3,48 \pm 0,40 ^{B,D}	6,25 \pm ,571	71,04 \pm 1,74 ^D

CIDN: CIDR nuevo (n=8); CRON: CRONIPRES nuevo (n=8); CIDU: CIDR usado (n=8); CROU: CRONIPRES usado (n=8)

ABC_{0-7} : área bajo la curva concentración hasta los 7 d

$ABC_{0-\infty}$: área bajo la curva concentración extrapolada al infinito

C_{max} : concentración sérica máxima

T_{max} : tiempo a la concentración máxima

TMR: tiempo medio de residencia

Contraste 1: DIV nuevo [CIDN, CRON] vs. DIV usado [CIDU, CROU]; Contraste 2: CIDN vs. CRON;

Contraste 3: CIDU vs. CROU; Valores en una columna con diferentes superíndices, difieren al ($p < 0,05$).

En términos absolutos, el CIDU liberó un 41,20 % menos de P_4 que el CIDN (ABC ; 980,73 vs. 586,48 ng h/ml, $P < 0,05$; Figura 2.3), y el CROU liberó un 72,5 % menos de P_4 que CRON (ABC ; 822,93 vs. 226,15, ng h/ml, $P < 0,05$; Figura 2.3). A pesar de que no hubo diferencias significativas en la liberación de P_4 entre los CIDN y CRON ($> 0,05$; Figura 2.3), el CROU liberó un 68,5 % menos de P_4 que el CIDU (ABC ; 586,48 vs. 226,15, ng h/ml, $P < 0,05$; Figura 2.3).

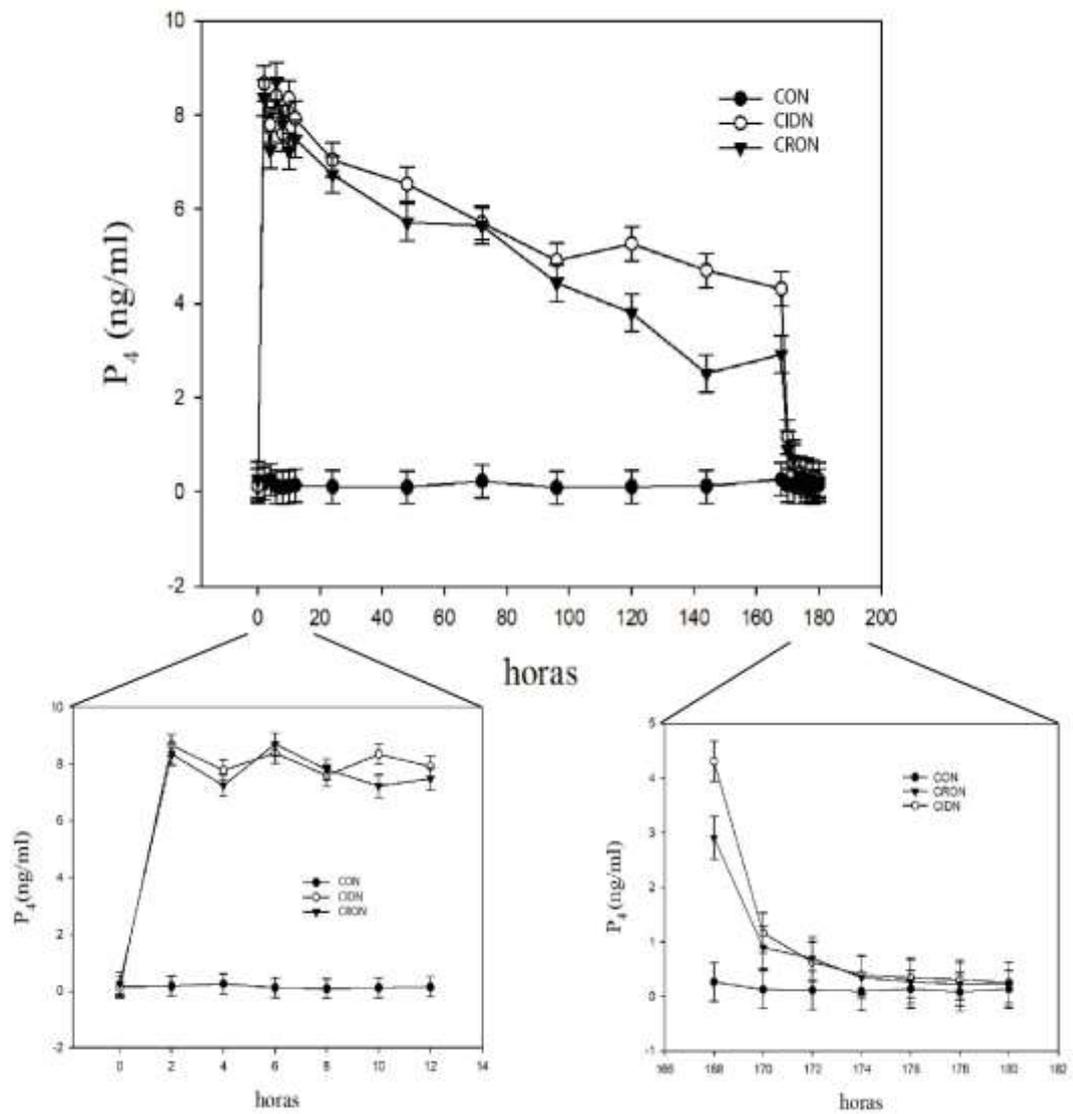


Figura 2.2.A. Concentraciones séricas de P₄ (ng/ml) en ovejas (n=40) luego de la inserción de un DIV nuevo (cuadrados medios mínimos ± error estándar CIDR, 300 mg P₄, CRONIPRES, 160 mg P₄). Para mayores detalles del diseño experimental ver Figura 2.1.

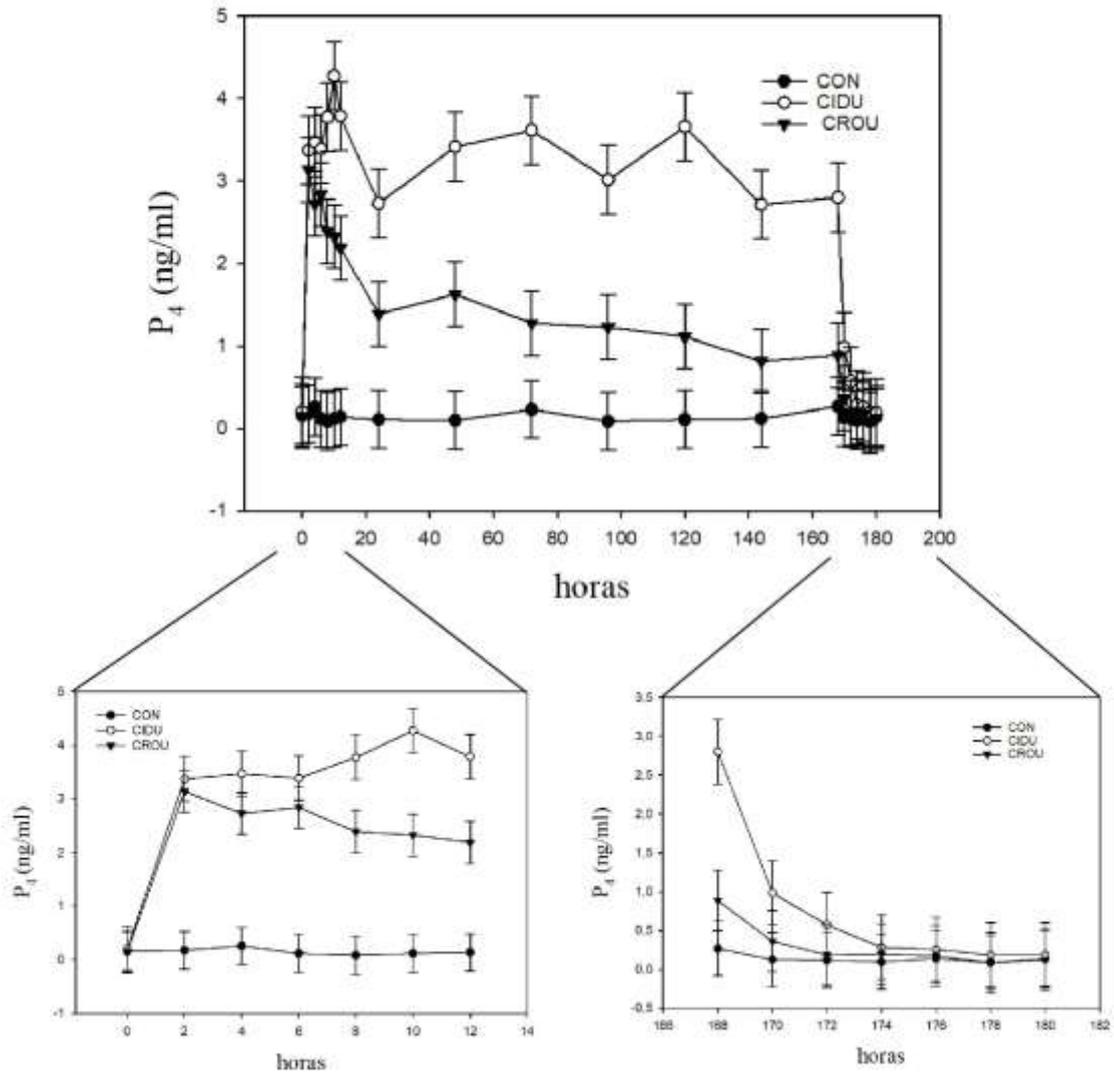


Figura 2.2.B. Concentraciones séricas de P₄ (ng/ml) en ovejas (n=40) luego de la inserción de un DIV usado (cuadrados medios mínimos ± error estándar CIDR, 300 mg P₄, CRONIPRES, 160 mg P₄). Para mayores detalles del diseño experimental ver Figura 2.1.

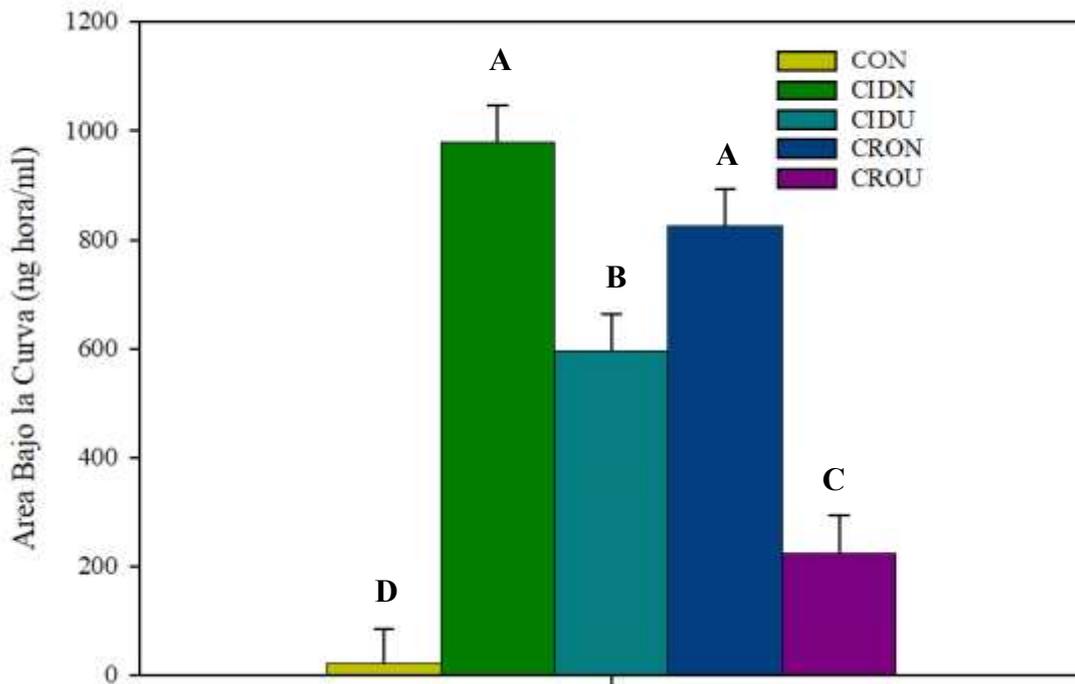


Figura 2.3. Área bajo la curva de las concentraciones de P₄ (ng hora/ml) en ovejas (n=40) asignadas al azar a uno de cinco tratamientos (control [CON], sin DIV, n=8; CRON CO[®] nuevo [CRON, 160 mg P₄], n=8; CIDR-G[®] nuevo [CIDN, 300 mg P₄] n=8; CRON CO[®] usado [CROU], n=8, CIDR-G[®] usado [CIDU], n=8). Para mayores detalles del diseño experimental ver Figura 2.1. Barras con diferentes letras difieren al p<0.05.

DISCUSIÓN

En mi conocimiento, este es el primer trabajo que realiza un estudio sobre la farmacocinética mediante análisis no compartimental de las concentraciones séricas de P₄ en DIV nuevos o usados. En rechazo con la hipótesis planteada, de los DIV con menor concentración hormonal (CRONIPRES CO[®]), sólo los DIV nuevos (CRON) pudieron liberar concentraciones de P₄ >2 ng/ml durante el periodo de 7 días estudiado. Por el contrario, los DIV usados que contenían 160 mg P₄ (CROU) no pudieron liberar concentraciones de P₄ >2 ng/ml durante el periodo de 7 estudiado. Además, a las 12-24 h de colocado, el CROU comenzó de liberar concentraciones subluteales de P₄ (<2 ng/ml) que muy probablemente hubieran promovido el crecimiento excesivo y la persistencia del folículo de mayor tamaño (Viñoles y

col., 1999), y hubieran producido el envejecimiento del folículo ovulatorio (Johnson y col., 1996). Si bien algunos trabajos previos estudiaron los perfiles séricos de P₄ con DIVs CIDR-G[®] y DICO-CO[®] nuevos y usados (Pinna y col., 2012; Uribe-Velásquez y col., 2011; Vilariño y col., 2011, 2013), estos estudios no incluyeron los estudios farmacocinéticos mediante análisis no compartimental del ABC₀₋₇, el ABC_{0-∞}, C_{max} alcanzada, y el TMP de P₄. Los CRON con concentración original de 160 mg totales de P₄ presentaron valores similares al CIDN en todos los parámetros evaluados. Sin embargo, el CROU, presentó menor C_{max}, ABC₀₋₇, ABC_{0-∞}, y TMP que el CIDU, y su concentración sérica descendió por debajo de 2 ng/ml a partir de las 48 h. Además, mientras que el ABC del CIDU fue un 60% del CIDN, el ABC del CROU fue del 30% del CRON.

Los resultados obtenidos a partir de las concentraciones séricas de P₄ de los CIDN y del CIDU (300 mg de P₄) son coincidentes con trabajos previos (Ainsworth y Downey, 1986; Pinna y col., 2012; Vilariño y col., 2013). Mientras que en éste y otros estudios previos las concentraciones de P₄ alcanzadas con CIDN en ovejas fueron similares (8-10 ng/ml; Viñoles y col., 1999), en nuestro estudio, las concentraciones alcanzadas por CIDU fueron más bajas (5-6 ng/ml; Viñoles y col., 1999). Desafortunadamente, los estudios de farmacocinética no compartimental realizados en este trabajo no están disponibles para los trabajos previos y por lo tanto no se puede realizar una comparación razonable y válida. La utilización de DIV nuevos y usados (CIDR-G[®]/DICO-CO[®]) en protocolos de sincronización de celo cortos en ovejas (Pinna y col., 2012; Vilariño y col., 2013) y en cabras (Oliveira y col., 2001; Uribe-Velásquez y col., 2011; Vilariño y col., 2011) fue estudiada previamente. En todos los estudios realizados se utilizaron DIV que contenían 300 mg de P₄ que permitían la reutilización del DIV sin ir en detrimento de una reducción en la eficiencia reproductiva (Pinna y col., 2012; Uribe-Velásquez y col., 2011; Vilariño y col., 2011, 2013). Actualmente no había información disponible sobre la farmacocinética de las concentraciones de P₄ con concentraciones de P₄ más bajas (160 mg).

Basados en los resultados de este trabajo, la reutilización de DIV con casi la mitad de la dosis total de P₄ (160 vs 300 mg) no sería efectiva debido a que los DIV usados van a poseer un tercio de la P₄ de un DIV nuevo y por lo tanto las concentraciones de P₄ serán <2 ng/ml durante un periodo de tratamiento de 7 d.

CONCLUSIONES

El Cronipres CO[®] nuevo, con una concentración inicial de 160mg P₄, utilizado en el presente estudio posee casi un 53% menos de concentración hormonal que el CIDR-G[®] nuevo. Sin embargo, las concentraciones séricas de P₄ durante los 7 d de experimentación no fueron significativamente diferentes entre los DIV nuevos. En cambio, la utilización por segunda vez del Cronipres CO[®] provocó concentraciones séricas subluteales de P₄ (<2 ng/ml) a partir de las 48 h de colocado el DIV, las cuales podrían afectar la dinámica y el crecimiento folicular, causando un excesivo desarrollo y persistencia en el tiempo de los folículos y posiblemente disminuyendo la fertilidad.

CAPITULO II

ESTUDIO DEL CRECIMIENTO FOLICULAR Y EL MOMENTO DE OVULACIÓN EN UN TRATAMIENTO CORTO DE SINCRONIZACIÓN DE CELO CON DIV, PGF Y BE

INTRODUCCION

Estudios realizados en bovinos determinaron que la administración de estrógenos durante la fase del ciclo estral con altas concentraciones séricas de P₄, induce la regresión folicular y la emergencia de una nueva onda folicular (Bo y col., 2006; Castilho y col., 2000). En cambio, si los estrógenos se administran durante la fase del CE con bajas concentraciones séricas de P₄, inducen la liberación de LH y la ovulación (Bo y col., 2006; Castilho y col., 2000). La combinación de E₂ y progestágeno/P₄ induce la emergencia de una nueva onda alrededor de 4 d más tarde, sin importar el estado de la onda folicular al momento de iniciar el tratamiento en bovinos (Bo y col., 1994; Bo y col., 1995a, 1995b; Driancourt, 2001).

A partir de estudios relacionados con la acción del E₂ o sus sales sobre las hormonas reproductivas (Baird, 1978; Barcikowski y col., 1974; Barrett y col., 2008; Clarke y col., 1988; Debeljuk y col., 1972; Hauger y col., 1977; Karsch y col., 1997; Meikle y col., 2001; Quirke y col., 1987; Reeves y col., 1971), sobre el útero (Crocker y Shelton, 1973; Rosenfeld y col., 1973), el transporte espermático, la dinámica folicular y los parámetros reproductivos (Inskip y col., 1979); se iniciaron investigaciones sobre el uso de diferentes dosis de E₂ en protocolos de SC en ovinos basados en la aplicación de implantes auriculares o de EIV con progestágenos (Langford y col., 1980; Quispe y col., 1995; Spitzer y Carpenter, 1981).

La aplicación única de E₂ o combinada con progestágenos/P₄ o GnRH, tanto en ovejas cíclicas como en anestro estacional induce el pico de FSH con una mayor sincronización y

amplitud del mismo en comparación con protocolos de sincronización sin E₂ (Barrett y col., 2008; Gonçalves Souza-Fabjan y col., 2017). Por otra parte, la aplicación de una o dos dosis de E₂, en ovejas en anestro, produce la regresión del FM y sincroniza una nueva onda folicular (Meikle y col., 2001). Menchaca y col., (2007), demostraron que la aplicación de BE en cabras sincronizadas con un DIV con P₄ durante 7 d produce una sincronización del estro y la ovulación similar a las cabras sincronizadas de igual manera, pero con una dosis de eCG al momento del retiro del DIV. Los porcentajes de preñez y de parición en los pequeños rumiantes fueron muy variables luego de utilizar un protocolo de SC con P₄ y E₂ o sus sales, con valores entre 11 % y 80 % (Castilho y col., 2015; Inskoop y col., 1979; Langford y col., 1980; Menchaca y Rubianes, 2007; Quispe y col., 1995; Ungerfeld, 2008) y entre 0 % y 43 % (Inskoop y col., 1979; Langford y col., 1980), respectivamente. Estos resultados tan amplios posiblemente se deban a factores relacionados con el tipo de sal, la dosis utilizada, el protocolo base en donde se aplicaron los estrógenos, el uso de SN o IATF y la época del año (Castilho y col., 2015; Inskoop y col., 1979; Langford y col., 1980; Menchaca y Rubianes, 2007; Quispe y col., 1995; Ungerfeld, 2008, 2009).

En base a lo expuesto, y con el objetivo de lograr una mayor sincronización en la inducción de las ovulaciones sería necesario efectuar nuevos estudios sobre la dosis y momento de aplicación de los estrógenos en los protocolos de SC en ovinos. Para ello, se realizaron dos experimentos relacionados entre sí, con el objetivo de determinar la mejor dosis y momento de aplicación de BE dentro de un protocolo de SC para inducir la ovulación, en base al estudio del crecimiento folicular y momento de ovulación. La hipótesis de trabajo fue que la utilización de un protocolo de SC basado en la aplicación de un DIV durante 5 d, la aplicación de una dosis de PGF al retiro del DIV, y la aplicación BE en la dosis y momento adecuado permitiría sincronizar y ovular un folículo de un diámetro preovulatorio similar al obtenido con un

protocolo de SC basado en la aplicación de un DIV durante 5 d y la aplicación de eCG y PGF al retiro del DIV.

MATERIALES Y METODOS

Experimento II

Diseño experimental

Se utilizaron ovejas $\frac{3}{4}$ Texel (n=24) con $\geq 2,5$ de CC (1 emaciada a 5 gorda). Las ovejas fueron alojadas en corrales dependiente de FCV-UNLP (34°55' S; 57°57' O), alimentadas con heno de alfalfa y balanceado comercial, y con acceso ad-libitum al agua de bebida. El experimento se desarrolló durante la época reproductiva con las recomendaciones internacionales especificadas en la guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (NRC, 1986) y el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la FCV-UNLP.

Se conformaron al azar 3 grupos experimentales (n=8/grupo) en un diseño de cuadrados latinos con tres REP, de forma tal que cada animal tuvo la posibilidad de recibir los tres TRT, un TRT diferente en cada REP del cuadrado latino (Figura 3.1). El día de inicio del tratamiento (d 0) se aplicó a todas las hembras un DIV sin uso (DICO[®]; Syntex) con 300 mg de P₄. El d 5 se retiró el DIV y se les aplicó por vía IM una dosis de 125 µg cloprostenol sódico (Ciclase DL[®], Lab Syntex, Argentina). El grupo CON también recibió una dosis de 300 UI de eCG (NOVORMON[®], Lab Syntex, Argentina). Los grupos BE100 y BE200 recibieron el d 6 (24 h del retiro del DIV) una dosis de 100 o de 200 µg de BE (Gonadiol[®]; Lab Syntex, Argentina) vía IM, respectivamente. Las tres REP se realizaron entre los días 0-16, 23-39 y 46-62, respectivamente de iniciado el experimento con siete días de descanso entre REP con la finalidad de que la eCG aplicada al grupo CON haya sido metabolizada por el organismo.

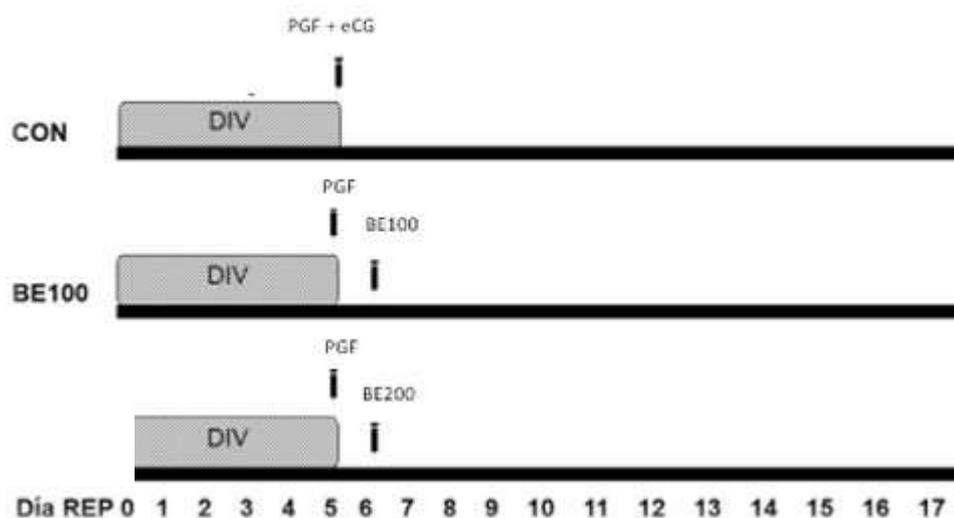


Figura 3.1. Diseño experimental utilizado en el Experimento II. En el d 0, las ovejas (n=24) fueron asignadas al azar a uno de tres tratamientos en los que tuvieron un DIV de P₄ inserto durante 5 d y al retiro del DIV se les administró una dosis de PGF. Al grupo CON (n=8) se le administró una dosis de 300 UI de eCG junto con PGF. A los grupos BE100 (n=8) y BE200 (n=8) se les administró una dosis de 100 µg y de 200 µg de BE al d 6, respectivamente. Al d 23 y al d 46 se iniciaron la segunda y tercera REP respectivamente. A todas las ovejas se les realizó una ecografía ovárica diaria entre los d 0 y d 5 y cada 12h a partir del d 6 hasta el colapso del folículo mayor (FM). Se recolectaron muestras de sangre los d 0, 5, 6, 8, 10 y 17, días de cada REP.

Estudio del crecimiento folicular

El estudio del crecimiento folicular se llevó a cabo mediante un ecógrafo Mindray DP-6600 Vet, con transductor lineal (75L50EAV) de 5.0/7.5/10 MHz, por vía transrectal. Quince días previos al inicio del experimento se realizaron ecografías ováricas para acostumbrar a los animales a las diferentes maniobras. Previamente a la realización de la ultrasonografía, se realizó el vaciamiento manual del recto de las ovejas y se colocaron 50 ml de gel para ultrasonografía con el objetivo de lograr un mejor contacto con la superficie rectal. Desde el inicio de cada TRT (d 0) hasta el momento del retiro del DIV se realizó una ecografía ovárica diaria y se registró en un mapa ovárico el número, la ubicación de los folículos ≥ 2 mm, así como se midió y registró el diámetro de los mismos. A partir del d 6 y hasta el momento de la ovulación se realizaron las ecografías cada 12 h. La ovulación se determinó por la desaparición o colapso del FM, el cual correspondió a un folículo con un diámetro ≥ 5 mm. El d 17 de cada REP se realizó una ecografía para determinar la presencia de CL. El día de emergencia del FM

correspondió al día que se observó por primera vez el FM. El diámetro del folículo mayor (DFM) corresponde al valor obtenido de la media del diámetro del FM. El intervalo ovulación (IO) corresponde a las horas transcurridas desde el retiro del DIV hasta el colapso del FM sumado 6 horas de la última visualización del FM. El número de horas corresponde a la mitad del tiempo entre la última visualización del FM y su colapso.

Determinación de progesterona

Las muestras sanguíneas para la determinación de P4 se extrajeron por venopunción yugular y se obtuvieron al momento de la colocación y del retiro del DIV, luego cada 24 h hasta el colapso del FM, a partir de este momento cada 48 h hasta el d 12y el d 17.

Las muestras sanguíneas se centrifugaron a 2000rpm durante 10 min para la obtención de suero, el cual se mantuvo a -20°C hasta su posterior análisis. Las muestras fueron analizadas por medio de la técnica de RIA con el kit comercial Coat a Count DPC® (Los Ángeles, CA, USA). Los valores de los controles se obtuvieron de hembras en estro y preñadas y fueron de 0,77ng/ml y de 7,9 ng/ml para los controles bajo y alto, respectivamente.

Análisis estadístico

Los valores de los diámetros foliculares del FM se analizaron desde el día de colocación del DIV hasta el colapso del FM, y de manera retrospectiva desde su desaparición hasta la primera vez que se visualizó. Estos datos fueron analizados utilizando el procedimiento MIXED de SAS® para mediciones repetidas en tiempo (SAS Institute, 2015). El modelo matemático incluyó los efectos de TRT, día del protocolo (0-17) y la interacción entre TRT y día del protocolo. Los resultados se expresaron como el cuadrado medio mínimo \pm ES. El IO fue analizado utilizando el procedimiento MIXED de SAS® (SAS Institute, 2015) y el modelo matemático incluyó los efectos de TRT. El nivel de significancia fue de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Se incluyeron los registros de 53 folículos colapsados. Una oveja del grupo CON se descartó inicialmente ya que presentó una imagen compatible con una hidrosalpingitis. Durante la REP 1, una oveja del grupo BE200 falleció, por lo que se descartaron los datos parciales. Los datos de cinco ovejas (CON REP 1= 1; BE100 REP 1= 1; BE100 REP 2= 1; BE200 REP 1= 1; BE200 REP 2= 1) fueron descartados debido a estar incompleto el mapa ovárico. Cinco ovejas no respondieron a los TRT (BE100 REP 2= 1; BE100 REP 3= 1; BE200 REP 2= 2; BE200 REP 3= 1). Tres ovejas del grupo BE200 de las REP 1, 2 y 3 desarrollaron quiste folicular a partir del FM, por lo que los datos relacionados con el crecimiento folicular no fueron analizados. Se definió como quiste folicular aquella estructura folicular anecogénica con un diámetro mayor a 10mm. Del total de folículos colapsados, 17 correspondieron al grupo CON, 20 al grupo BE100 y 16 al grupo BE200.

Crecimiento folicular y ovulación

Los valores medios del diámetro folicular medido desde el momento de inserción del DIV hasta la desaparición del FM (folículo ≥ 5 mm) y normalizados por día de tratamiento, fueron similares y no presentaron diferencias significativas entre tratamientos ($p=0,96$; Figura 3.2).

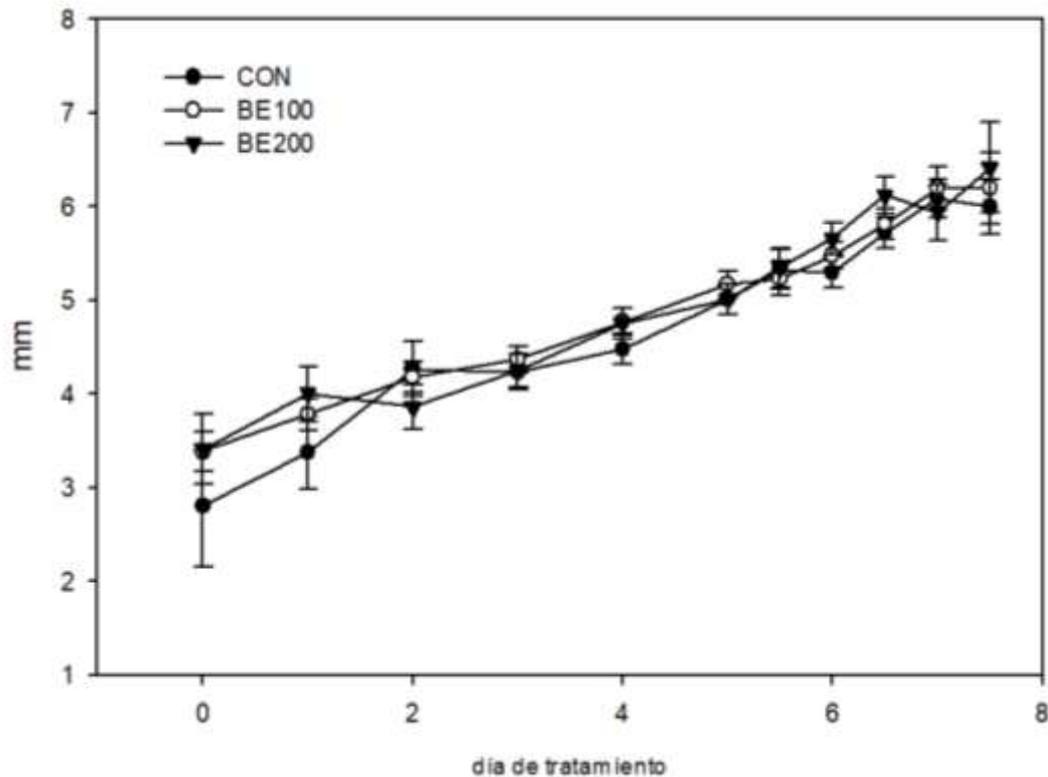


Figura 3.2. Experimento II. Crecimiento del FM (n=53) desde colocación de DIV hasta el momento de la ovulación (cuadrados medios mínimos \pm error estándar) normalizados por día de tratamiento. Grupo control (CON, n=17); Grupo BE100 (BE100, n=20); Grupo BE200 (BE200, n=16). Día 0: día de colocación del DIV

De los folículos $>2,5$ mm observados al d 0 (n=53), el 72% (n=38) correspondió a folículos que presentaron un diámetro entre 3-4 mm, los cuales continuaron su crecimiento a FM y colapsaron, mientras que el 28 % (n=15) restante presentó un tamaño inicial >4 mm, de los cuales el 73 % (n=11) continuó creciendo hasta su colapso y el 27 % (n=4) se atresió, originándose un nuevo FM que colapsó.

El DFM al día de emergencia fue de $3,91 \text{ mm} \pm 0,22$; $3,64 \text{ mm} \pm 0,19$ y $4,01 \text{ mm} \pm 0,18$ para los grupos CON, BE100 y BE200, respectivamente. El crecimiento folicular diario normalizado por día de onda fue de 0,58, 0,54, y 0,53mm para los grupos CON, BE100 y BE200 respectivamente y no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p>0,05$; Figura 3.3).

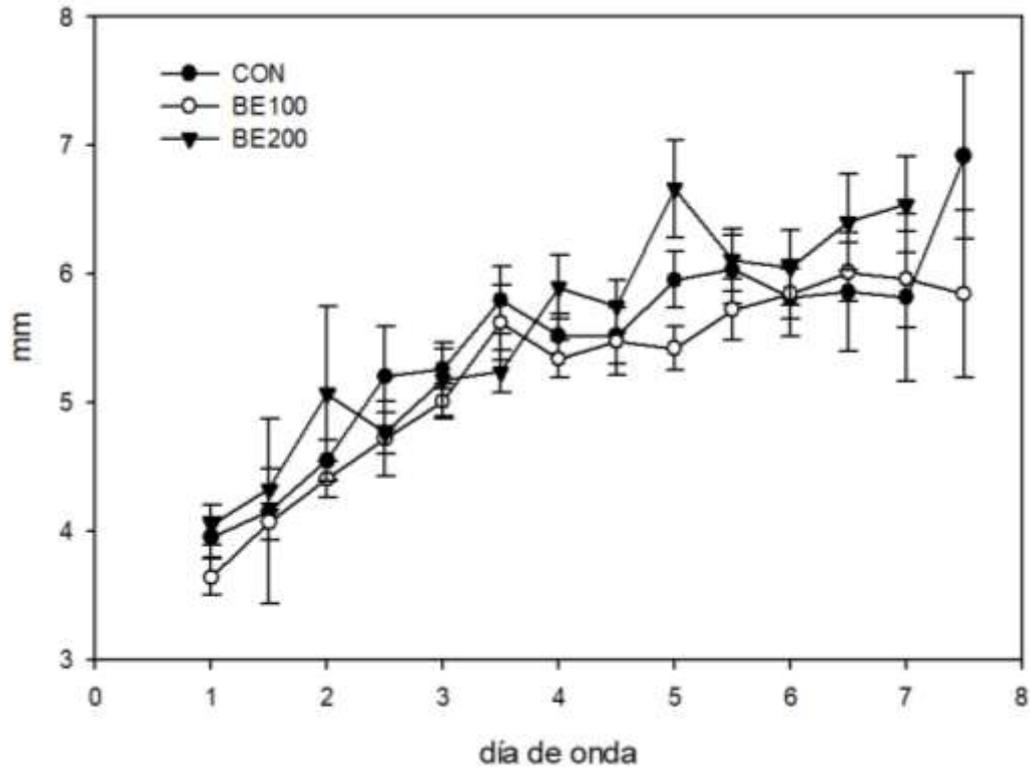


Figura 3.3. Experimento II. Crecimiento del FM (n=53) desde la emergencia del FM hasta el momento de la ovulación (cuadrados medios mínimos \pm error estándar) normalizado por día de onda. CON: Grupo CON (n=17); BE100: Grupo BE100 (n=20); BE200: Grupo BE200 (n=16). Día 0: día de emergencia del FM.

No se encontraron diferencias significativas ($p>0,05$) entre los TRT para el DFM al retiro de DIV, el DFM preovulatorio medio y el IO (Tabla 3.1). Los grupos CON y BE200 presentaron un rango IO entre la primera y la última ovulación de 60 y 84 h, respectivamente. En cambio, el Grupo BE100 presentó un rango IO de 48 h (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Diámetro del folículo mayor (DFM) al retiro del DIV, DFM preovulatorio y valores mínimo, máximo y promedio del intervalo retiro DIV ovulación (IO)

TRT	DFM retiro DIV (ES, mm)	DFM preovulatorio (ES, mm)	Promedio IO (h)	IO mínimo y máximo (h)	FM (n)
CON	5,04 \pm 0,17	5,93 \pm 0,18	46,9	6 66	17
BE100	5,21 \pm 0,15	6,03 \pm 0,13	45,9	18 66	20
BE200	5,01 \pm 0,24	6,18 \pm 0,19	45,75	6 90	16

Ovulación: 6h luego de la última observación del FM.

El 80 % (n=42) de los FM ovularon entre las 12 h y las 54 h de retirado el DIV y el 67% (n=28) de los mismos lo hicieron entre las 30 h y las 42 h inclusive, no encontrándose diferencias significativas entre tratamientos ($p>0,05$; Figura 3.4.). Tres ovejas, una por

tratamiento, presentaron ovulaciones dobles. Del total de visualizaciones del FM del Grupo BE200 (n=19) el 15,78 % (n=3) desarrolló a quiste folicular.

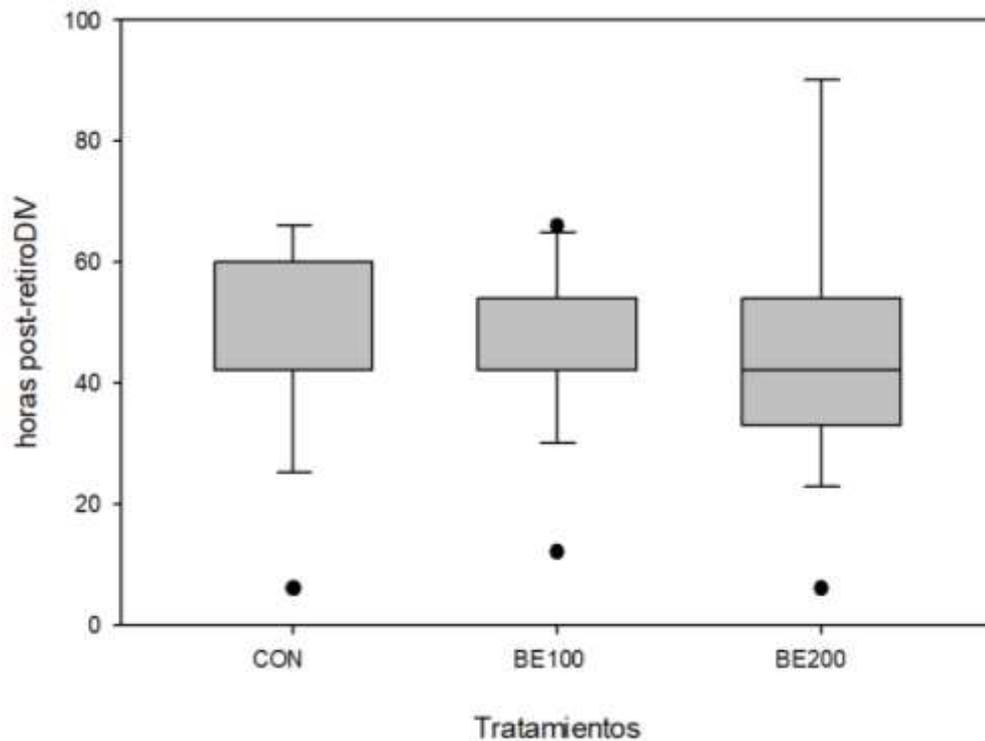


Figura 3.4. Experimento II. Momento de ovulación luego del retiro de DIV en el grupo control (CON, n=17); Grupo BE100 (BE100, n=20); Grupo BE200 (BE200, n=16) Mediana= 42h ($p>0,05$).

Progesterona

Las concentraciones séricas de P_4 , al d 0 fueron ≥ 1 ng/ml excepto en tres hembras (2 del grupo BE100 y 1 del grupo CON). Al momento del retiro del DIV las concentraciones séricas fueron superiores a los 2 ng/ml, decayendo a las 24 h a concentraciones séricas inferiores a 1 ng/ml. Los grupos CON y BE100 presentaron concentraciones séricas superiores a 1 ng/ml a partir del d 10. Las concentraciones hormonales superaron los 2 ng/ml a partir del d 12 en los tres TRT. Las concentraciones séricas de P_4 desde el d 5 al d 17 no presentaron diferencias significativas entre tratamientos ($p>0,05$; Figura 3.5).

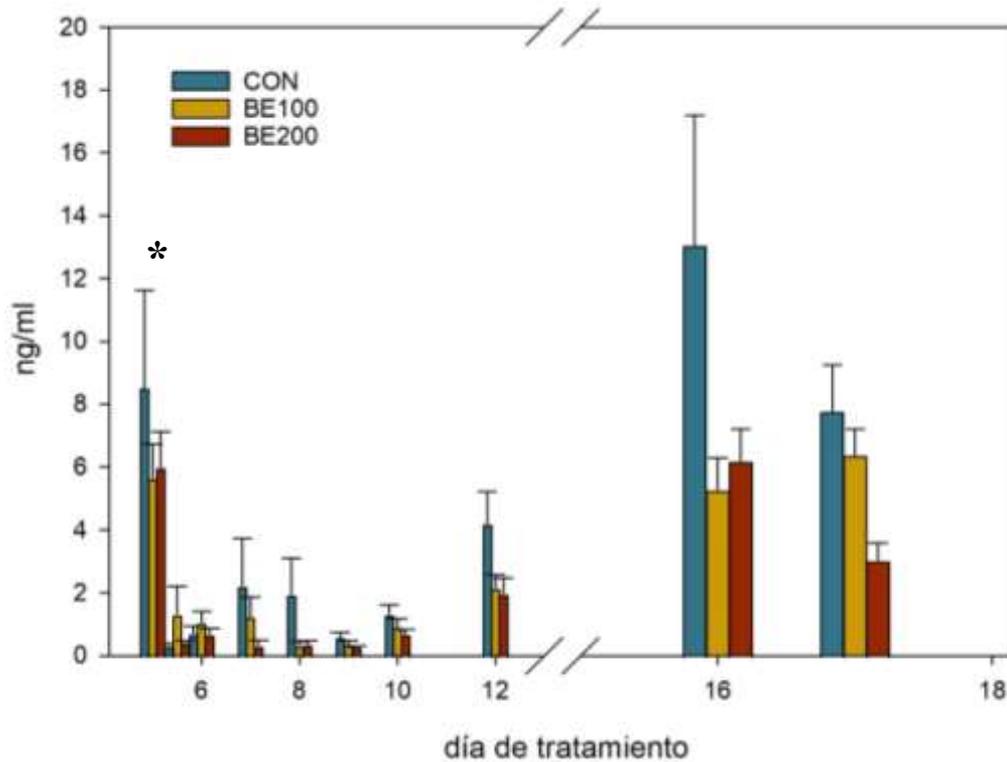


Figura 3.5. Experimento II Concentraciones séricas de P₄ desde el d5 al d17 en el Experimento II. Grupo control (CON, n=17); Grupo BE100 (BE100, n=20); Grupo BE200 (BE200, n=16). *: día de retiro de DIV

Las ovejas que desarrollaron quistes foliculares luego del tratamiento con BE200, presentaron valores <1ng/ml desde el retiro del DIV hasta el d 17 inclusive.

MATERIALES Y METODOS

Experimento III

Diseño Experimental

Se utilizaron ovejas $\frac{3}{4}$ Texel (n=9) con $\geq 2,5$ de CC (1 emaciada a 5 gorda). Las ovejas fueron alojadas en corrales dependiente de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (34°55' S; 57°57' O), alimentadas con heno de alfalfa y balanceado comercial, y con acceso ad-libitum al agua de bebida. El experimento se desarrolló durante la época reproductiva con las recomendaciones internacionales especificadas en la guía

para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (NRC, 1986) y el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la FCV-UNLP.

Se conformaron al azar, 3 grupos experimentales en un diseño de cuadrados latinos con tres REP de tal forma que cada animal tuvo la posibilidad de recibir los tres TRT; un TRT diferente en cada REP del cuadrado latino (Figura 3.6). El d 0, se colocó a la totalidad de los animales un DIV sin uso (DICO[®]; Lab Syntex, Argentina) con 300 mg de P₄. El d 5 se retiró el DIV y se aplicó por vía IM una dosis de 125 µg cloprostenol sódico (Ciclase DL[®], Lab Syntex, Argentina). Los grupos BE0, BE24 y BE36 recibieron una dosis de BE (Gonadiol[®]; Lab Syntex, Argentina) vía IM respectivamente a las 0 h, 24 h y 36 h posteriores al retiro del DIV. La elección de la dosis de 100 µg de se basó por un lado en que, aunque las ovulaciones de los tres TRT del experimento II presentaron un promedio de IO de 46h, el total de las ovulaciones ocurrió en un período más uniforme (48 h) para el grupo BE100, mientras que los grupos CON y BE200 presentaron rangos mayores (60 y 84 h, respectivamente). Además, el uso de una dosis de 200µg de BE produjo un % de quistes foliculares de alrededor del 15%, por lo que se desestimó su aplicación.

Las tres REP se realizaron entre los días 0-16; 23-39 y 46-62, respectivamente, con siete días de descanso entre REP con la intención de otorgar un período de bienestar a los animales.

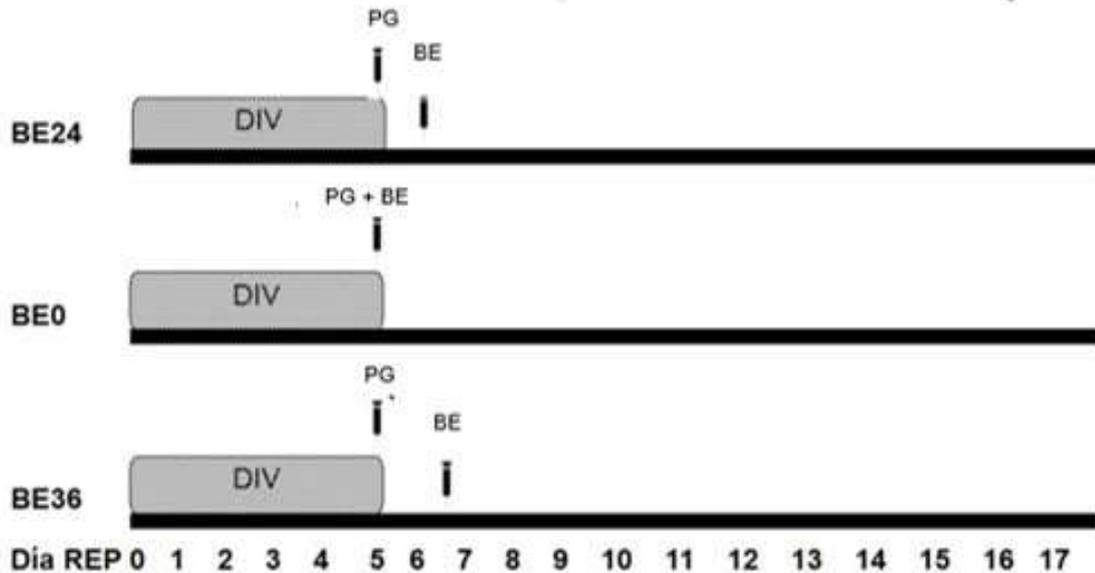


Figura 3.6. Diseño del Experimento III. En el d 0, las ovejas (n=9) fueron asignadas al azar a uno de tres tratamientos en los que tuvieron un DIV de P4 inserto durante 5 d y al retiro del DIV se les administró una dosis de PGF. Al grupo BE0 (n=3) se le administró una dosis de 100 µg de BE al retiro del DIV. Al grupo BE24 (n=3) se le administró una dosis de 100 µg de BE 24h posteriores al retiro del DIV y al grupo BE36 (n=3) se le administró una dosis de 100 µg de BE a las 36h de retirado el DIV. Al d 23 y al d 46 se iniciaron la segunda y tercera REP respectivamente. A todas las ovejas se les realizó una ecografía ovárica diaria entre los d 0 y d 5 y cada 12 h a partir del d 6 hasta el colapso del FM. Se recolectaron muestras de sangre los d 0, 5½, 6, 8, 10 y 17 de cada repetición.

Estudio del crecimiento folicular

El estudio del crecimiento folicular se realizó igual al experimento II.

Determinación de progesterona

Se extrajeron las muestras sanguíneas a las 12 h de retirado el DIV y a partir del d 7 cada 48 h hasta el d 15 y el d 19. Las muestras fueron analizadas por medio de la técnica de quimioluminiscencia.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó igual al experimento II.

RESULTADOS

Crecimiento folicular y ovulación

Se incluyeron los registros de 27 folículos colapsados. El diámetro folicular medido desde el momento de inserción del DIV hasta la desaparición del FM fue similar entre los tratamientos (normalizado por día de tratamiento; $p=0,98$; Figura 3.7.).

De los folículos $>2,5$ mm observados al d 0 ($n=27$), el 63 % ($n=17$) correspondió a folículos que presentaron un diámetro entre 3-4 mm, continuaron su crecimiento a FM y colapsaron, mientras que el 37 % restante ($n=10$) presentó un diámetro folicular inicial >4 mm y continuó creciendo hasta la ovulación.

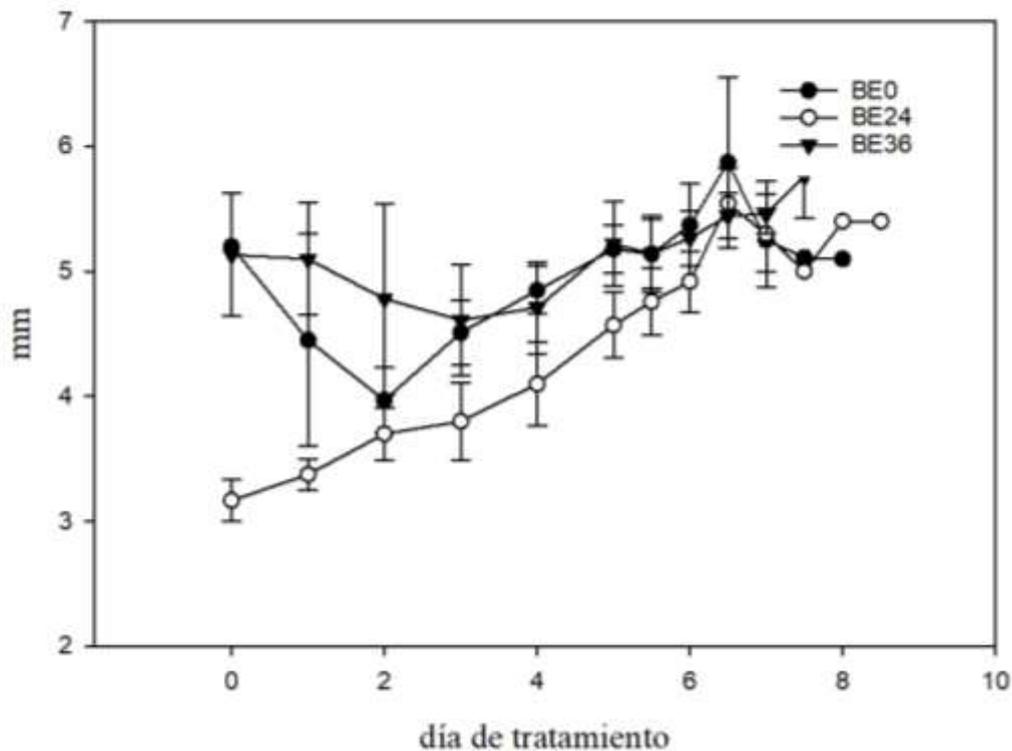


Figura 3.7. Experimento III. Crecimiento del folículo mayor (FM, $n=27$) desde colocación de DIV hasta el momento de la ovulación (cuadrados medios mínimos \pm error estándar) normalizado por día de tratamiento. Grupo BE0 (BE0, $n=7$); B24: Grupo BE24 (BE24, $n=10$); Grupo BE36 (BE36, $n=10$). Día 0: día de colocación del DIV.

El DFM al día de emergencia fue de $4,04 \text{ mm} \pm 0,23$; $3,17 \text{ mm} \pm 0,16$ y $4,17 \text{ mm} \pm 0,35$ para los grupos BE0, BE24 y BE36 y la tasa de crecimiento diaria promedio fue de $0,5 \text{ mm}$ (normalizado por día de onda; Figura 3.8.).

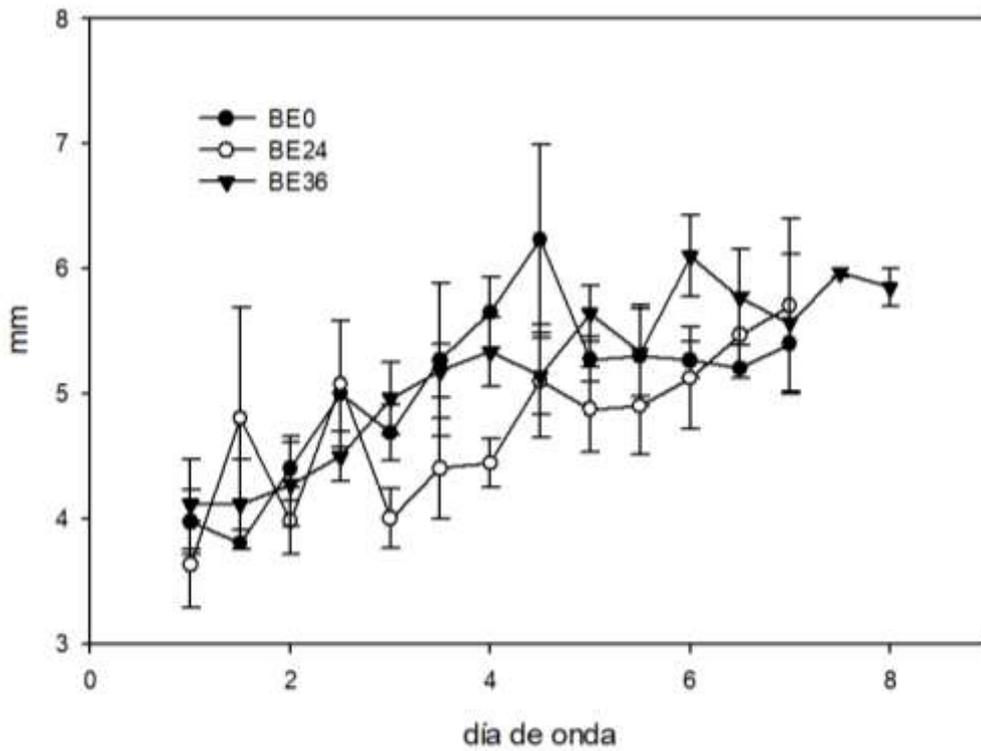


Figura 3.8. Experimento III. Crecimiento del folículo mayor FM (FM, $n=27$) desde la emergencia hasta la ovulación (cuadrados medios mínimos \pm error estándar) normalizado por día de onda. Grupo BE0 (BE=, $n=7$); B24: Grupo BE24 (BE24, $n=10$); BE36: Grupo BE36 (BE36, $n=10$). Día 0: día de emergencia del FM.

El DFM al retiro de DIV, el DFM preovulatorio medio y el IO no presentaron diferencias significativas entre tratamientos ($p>0,05$), presentando el Grupo BE0 el promedio y rango IO más corto (43,71 h y 48 h, respectivamente); mientras que los Grupos BE24 y BE36 presentaron un promedio IO ~ 50 h con un rango entre la primera y última ovulación de 60 h (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Diámetro del folículo mayor (DFM) al retiro del DIV y DFM preovulatorio y valores mínimos, máximos y promedio del intervalo retiro DIV-ovulación (IO)

TRT	DFM retiro DIV (mm)	DFM preovulatorio (mm)	Promedio IO (h)	IO mínima y máxima (h)	FM (n)
BE0	4,57±0,36	5,71±0,20	43,71	30 78	7
BE24	4,10±0,73	5,69 ±0,34	50,40	30 90	10
BE36	4,90±0,34	5,71±0,20	52,80	6 66	10

Ovulación: 6h luego de la última observación del FM.

Del total de FM que colapsaron (n=27), el 70 % (n=19) lo hizo en entre las 6 h y las 54 h de retirado el DIV y el 68% (n=13) de los mismos lo hizo entre las 30 h y las 42 h inclusive, no encontrándose diferencias significativas entre TRT ($p>0,05$; Figura 3.9). El 71 % de los FM del TRT BE0 (n=5) colapsaron a las 30 y 42 h de la aplicación del BE o retiro del DIV, el 70 % de los FM del TRT BE24 (n=7) y el 70 % los FM del TRT BE36 (n=7) lo hicieron entre las 18 y 30 h de la aplicación de BE, lo que es igual a 42 h y 54 h del retiro del DIV (Figura 3.9). No se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos ($p>0,05$).

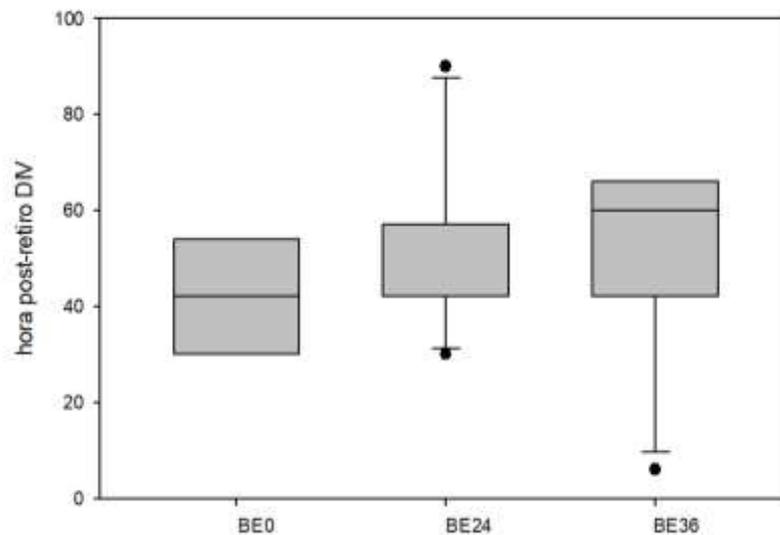


Figura 3.9. Experimento III. Momento de ovulación luego del retiro de DIV. Grupo BE0 (BE0, n= 7); Grupo (BE24, n= 10); Grupo BE36 (BE36, n= 10). Mediana BE0 y BE24= 42 h; Mediana BE36= 60 h ($p>0,05$).

Progesterona

Las concentraciones séricas de P₄, desde las 12 h de retirado el DIV hasta el d 9 fueron <1 ng/ml. El grupo BE36 presentó concentraciones hormonales >1 ng/ml a partir del d 11. El

d13 correspondió a valores entre 1 y 2 ng/ml en los grupos BE0 y BE24 y >2ng/ml en el grupo BE36. Todos los tratamientos presentaron concentraciones séricas el d 15 y el d 19 ≥ 2 ng/ml. No presentaron diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0,05$; Figura 3.10).

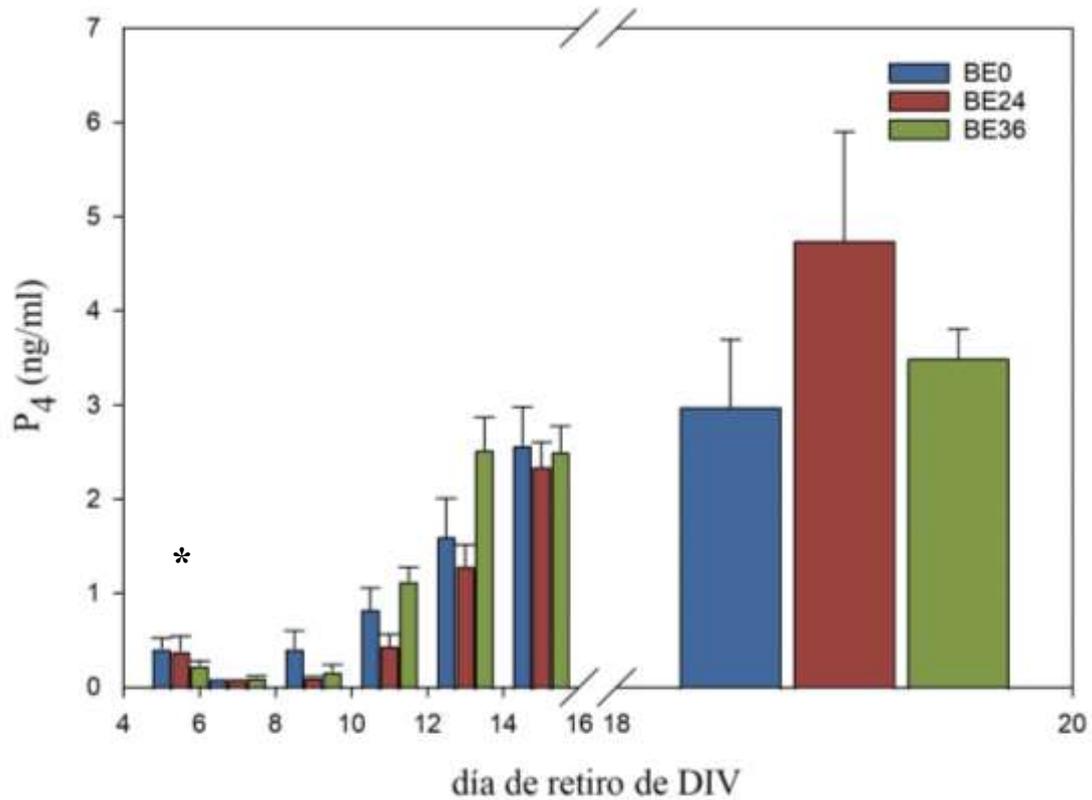


Figura 3.10. Experimento III. Concentraciones séricas de P₄ desde el d5 al d19. Grupo BE0 (BE0, n=7); Grupo BE24 (BE24, n=10); Grupo BE36 (BE36, n=10). *: retiro DIV

DISCUSIÓN

En la actualidad es escasa la información relacionada con la dosis de BE y el momento de ovulación en los protocolos de SC en ovinos. Las investigaciones realizadas han utilizado dosis de 1 mg de BE solo o en diferentes momentos dentro de un protocolo de SC en ovinos (Barrett y col., 2008; Biscarde, 2010; Castilho y col., 2015; Quispe y col., 1995).

En el experimento II, los folículos preovulatorios de los tres TRT presentaron un diámetro mayor a los 5,5 mm valores similares a los folículos preovulatorios durante el CE

(Uribe-Velásquez y col., 2009; Evans y col., 2000; Ravindra y col., 2000). Por otro lado, aunque el momento de ovulación fue similar entre los tratamientos (~46 h luego del retiro del DIV), los grupos CON y BE200 presentaron un rango de intervalo mayor que el grupo BE100. Sin embargo, el momento de ovulación fue menor (15 h) a lo descrito en cabras sincronizadas con un protocolo corto y una dosis de eCG o de 200µg BE aplicada a las 24 h de retirado el DIV (Menchaca y col., 2007).

El uso de una dosis de 200 µg de BE produjo un 15,78 % de quistes foliculares por lo cual esta dosis no sería recomendable ya que la presencia de quistes foliculares repercute en la fertilidad de la hembra (Palmieri y col., 2011).

En el experimento III, los diámetros de los folículos preovulatorios presentaron valores similares a los diámetros del experimento II y aunque no existieron diferencias significativas entre TRT en relación al promedio IO, la aplicación de 100 µg de BE al momento del retiro del DIV presentó el promedio más bajo (43 h) y el rango de intervalo a la ovulación más corto (48 h) a diferencia de los TRT BE24 y BE36, que presentaron un rango IO de 60 h.

Las concentraciones séricas de P₄ presentaron valores similares entre experimentos ya que, a las 12-24 h de retirado el DIV disminuyeron a valores <1 ng/ml en concordancia con los resultados obtenidos con DIV nuevos en el experimento I. Así mismo el Grupo B100 y el Grupo BE24 presentaron concentraciones hormonales con características temporales y de concentración similares entre sí. Por otra parte, las concentraciones séricas fueron ≥2 ng/ml en ambos experimentos 6 d posteriores al promedio del momento de ovulación, en concordancia con estudios previos (Allison y Mc Natty, 1972; Driancourt y col., 1985; Ravindra y col., 2004), lo que indicaría la presencia de un CL funcional.

De lo anteriormente expuesto se puede inferir que la elección de aplicar 100 µg BE al momento del retiro junto con la PGF evitaría un encierre, beneficiando el manejo de los animales al disminuir el estrés que conlleva esa maniobra. Así mismo, al tener un rango de 48h

entre la primera y la última ovulación podrían obtenerse mejores resultados en la implementación de la técnica de IATF ya que cuanto menor sea la dispersión de las ovulaciones, el proceso de IATF debería ser más eficaz.

CONCLUSIONES

La combinación de un DIV con 300 mg de P₄ colocado durante cinco días y la aplicación de PGF y 100 µg BE al retiro del DIV resulta en la mejor combinación para obtener un folículo ovulatorio con ausencia de quistes foliculares anovulatorios; con un IO promedio de 43 h, y un rango entre la primera y última ovulación de no más de 48h. La aplicación de BE, en el momento y dosis descritos, permitiría la suplantación de la eCG tradicional y la implementación de IATF.

CAPÍTULO III

EFICIENCIA REPRODUCTIVA DE UN TRATAMIENTO CORTO DE SINCRONIZACIÓN DE CELOS CON APLICACIÓN DE BE E IATF

INTRODUCCIÓN

Los protocolos cortos de SC en pequeños rumiantes se caracterizan por la colocación de un DIV impregnado de P₄ durante 5-7 d (Rubianes, 2000; Ungerfeld y Rubianes, 1999; Viñoles y col., 2001) permitiendo que el período de exposición a la P₄ exógena disminuya de 12-14 d a 5-7 d. Esto evita la presencia de concentraciones subluteales de P₄ a partir del d 6 de un protocolo de SC de 12- 14 d (<2 ng/ml; Menchaca y Rubianes, 2004) que provoca un recambio folicular más lento y la ovulación de folículos dominantes persistentes. De hecho, las concentraciones plasmáticas supra luteales de P₄, si bien disminuyen la tasa de crecimiento y el tamaño del folículo dominante, favorecen el recambio folicular y aseguran la presencia de un folículo joven y de mayor fertilidad al momento de la ovulación (Rubianes y col., 1996).

En ovejas y cabras, el uso de protocolos cortos de SC con P₄ y GnRH aplicada al momento de colocar el DIV (Karaca y col., 2009, 2010), a las 24 h (Cavalcanti y col., 2012) o a las 36 h (Luther y col., 2007) posteriores al del retiro del DIV no mejora la ovulación ni el porcentaje de preñez en comparación con un protocolo corto de sincronización con P₄ y eCG (Cavalcanti y col., 2012; Karaca y col., 2009, 2010). La aplicación de GnRH a las 36 h posteriores al retiro del DIV en un protocolo corto causó la disminución del porcentaje de hembras en celo durante la época reproductiva en comparación con un protocolo corto de sincronización con P₄ y eCG (Luther y col., 2007). Sin embargo, la aplicación de GnRH al

momento de colocar el DIV a corderas pre púberes resultó en un alto porcentaje de celo y fertilidad en comparación con los protocolos tradicionales de SC basado en DIV con P₄ por 12 d y una dosis de eCG al retiro (Martinez y col., 2015).

Las altas temperaturas y la humedad relativa ambiente a fines del verano e inicio del otoño pueden afectar los procesos reproductivos debido al estrés térmico que padecen los animales (Al-Haidary, 2004; Saravia y Cruz, 2003; Tilbrook y col., 2002). El índice de temperatura y humedad relativa ambiente (ITH) es un valor que permite determinar el grado de confort térmico que presenta el ambiente para el animal. En ovinos, la temperatura de la zona de confort varía entre 4,4°C y 15,5°C. Cuando los animales se encuentran con temperaturas >32°C se presenta una disminución en la duración del celo y de la tasa de concepción debido a un mayor porcentaje de muerte embrionaria temprana (Al-Haidary, 2004; Saravia y Cruz, 2003).

La combinación de un DIV que pueda ser reutilizado con PGF y BE permitiría una reducción del costo de los protocolos de SC en ovinos, y consecuentemente una mayor utilización de la IATF con semen fresco o semen congelado-descongelado de animales mejoradores de caracteres de interés productivo. En base a los resultados del Capítulo II, se seleccionó una dosis de 100 µg de BE para ser aplicada al momento del retiro del DIV (0 h) junto con la administración de una dosis luteolítica de PGF.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la fertilidad obtenida luego de la IATF con semen fresco por vía cervical en ovejas sincronizadas con un protocolo corto de SC que al momento del retiro del DIV utiliza una dosis luteolítica de PGF y una dosis de 100 µg de BE para inducir la ovulación. La hipótesis de trabajo fue que con este protocolo corto que combina un DIV, PGF y BE se lograría un porcentaje de preñez similar al obtenido con un protocolo corto que combina eCG y PGF.

MATERIALES Y MÉTODOS

Experimento IV

Diseño experimental

Se realizaron dos REP en un establecimiento comercial situado en el partido de Tordillo, provincia de Buenos Aires, Argentina (36°20'03.4"S - 57°22'23.9"W). La primera REP del experimento se realizó durante los meses de enero-febrero (REP 1) y la segunda REP del experimento se realizó durante el mes de marzo (REP 2).

Se utilizaron ovejas cruzadas Corriedale (REP 1, n=570; REP 2, n=228), con una CC 2,5-3 y aptas reproductivas. La evaluación de la CC se realizó mediante la técnica descrita por Russel (1969) con escala de 1 a 5. La aptitud reproductiva de las hembras ovinas fue evaluada mediante un examen clínico físico general y otro particular del aparato reproductor, comprendiendo la inspección y palpación de la región urogenital, y la inspección ultrasonográfica por vía transrectal del útero y los ovarios mediante un ecógrafo (Mindray DP-6600 Vet) con transductor lineal (modelo 75L50EAV) de 5.0/7.5/10MHz, con el objetivo de determinar presencia/ausencia de patologías reproductivas (quistes ováricos, hidrómetra, piómetra, etc.) o gestación. La totalidad de los animales tuvieron una doble identificación, una identificación tipo caravana tarjeta o botón numerado y una temporaria, por medio de un collar con tarjeta numerada. Además, para cada maniobra se realizó una marca temporaria con tiza, la cual variaba de color o ubicación en el cuerpo del animal acorde a un código preestablecido.

Las hembras ovinas fueron clasificadas en tres categorías (CAT), de acuerdo a los parámetros cronometría dentaria y parto:

- a) CAT 1: borregas (hembras de dos dientes permanentes y primer servicio)
- b) CAT 2: ovejas jóvenes (hembras de cuatro o seis dientes permanentes y al menos 1 parto)

c) CAT 3: ovejas mayores (hembras de ocho dientes permanentes con grado variable de desgaste dentario y al menos 1 parto)

Los carneros fueron predominantemente de raza Corriedale (REP 1, n= 30; REP 2, n=15), con una CC= 3 y aptos reproductivos. La evaluación de la CC se realizó mediante la técnica descrita por Russel (1969). La aptitud reproductiva de los carneros fue evaluada de acuerdo con la metodología descrita por Robles (2004) un mes antes del inicio del experimento.

Los animales fueron mantenidos en una pastura natural con acceso a agua ad-libitum, de acuerdo con las recomendaciones internacionales especificadas en la guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (NRC, 1986) y el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la FCV-UNLP.

Protocolos de sincronización de celos

En ambas REP del experimento, la totalidad de las ovejas fueron sincronizadas mediante la colocación de un DIV (DICO[®]; Lab Syntex, Argentina) con 300mg de P₄ al d 0. El d 5 se retiró el DIV y se aplicó por vía IM una dosis de 125 µg cloprostenol sódico (Ciclase DL[®], Lab Syntex, Argentina). Al azar, las ovejas fueron asignadas a tres grupos experimentales y se les administró por vía IM las diferentes hormonas de acuerdo al TRT al momento del retiro del DIV: 1) Grupo CON: 250UI de eCG (Novormon[®], Lab Syntex, Argentina) como grupo testigo; 2) Grupo BE: 100 µg de BE (Benzoato de Estradiol[®], Lab Syntex, Argentina); y 3) Grupo GnRH: 100 µg de acetato de gonadorelina (Gonasyn Gdr[®], Lab Syntex, Argentina; Figura 4.1).

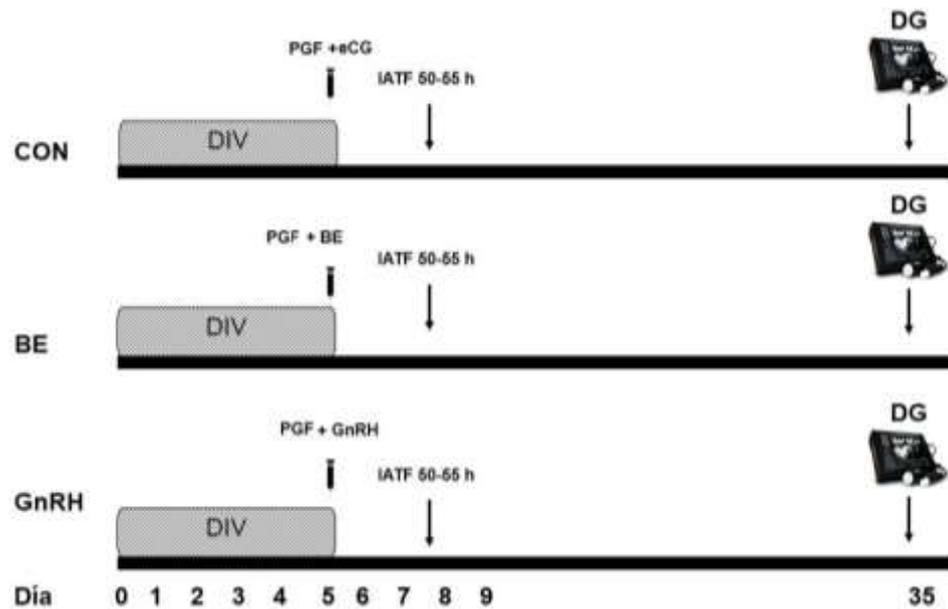


Figura. 4.1. Diseño Experimento IV. En el d 0, las ovejas (REP 1: n=570; REP 2: n=228) recibieron un DIV por 5 d. El d 5 les se aplicó una dosis de PGF y al azar fueron asignadas a uno de los tres tratamientos: CON: Grupo control, se les aplicó 250 UI eCG (REP 1: n=165; REP 2: n=74); BE: grupo BE, se les aplicó 100 μ g BE (REP 1: n= 204; REP 2: n=78) y GnRH: grupo GnRH, se les aplicó 100 μ g GnRH (REP 1: n=201; REP 2: n=76). Todos los grupos recibieron la dosis correspondiente junto con PGF al retiro del DIV. A las 50-55 h posteriores se realizó la IATF con semen fresco diluido; dosis inseminante: 100 x10⁶espermatozoides/0,1ml. Al d 35 se realizó el diagnóstico de gestación (DG) por ultrasonografía.

Extracción y evaluación de semen

Los eyaculados para el examen de aptitud reproductiva y su utilización en IA se obtuvieron por medio de un electroeyaculador Siremaster Eyaculator (Ice Corporation, KS USA). Para la extracción de semen, cada macho fue colocado en posición decúbito lateral, se vació el recto y se lubricó el vástago con gel de hidroxietilcelulosa previo a su introducción. Así mismo, el pene, previa exteriorización manual y sujeto con una gasa fue introducido dentro de un colector de vidrio graduado, limpio, templado y protegido con un protector de goma espuma para evitar los rayos solares y prevenir el shock térmico de los espermatozoides. Para estimular la erección se aplicaron 3-5 estímulos cortos de 1-2 segundos de duración, separados entre sí por descansos de 5 segundos. Luego se disminuyó el número de estímulos y se aumentó el tiempo de duración de éstos (1-3 estímulos de 5-10 segundos cada uno) para provocar la eyaculación. El semen obtenido se evaluó macroscópica y microscópicamente, antes de realizar

la dilución final para utilizarlo en la IA. La evaluación macroscópica consistió en la determinación del volumen, aspecto (densidad y color), pH y cuerpos extraños; y la evaluación microscópica consistió en la determinación de la motilidad en masa microscópica (MMM), motilidad individual (MI), vigor (VIG) y concentración espermática (CON). Los valores mínimos aceptables para la utilización de cada eyaculado en la IA fueron: MMM= 3 (escala: 0-5), MI= 70 %, VIG= 3 (escala: 0-5) y CON= 3×10^6 espermatozoides/mm³.

Inseminación artificial

La IA fue realizada en ambas REP por dos operadores a las 50-55 h por vía cervical (Aisen, 2004). Se registró la identidad de cada dosis inseminante con el objetivo de determinar la paternidad de las crías, acorde a lo solicitado por los propietarios. Se utilizó semen fresco diluido (1:1) con leche fresca descremada tratada a alta temperatura, y la dosis inseminante fue de 100×10^6 espermatozoides totales en un volumen de 0,1ml (Aisen, 2004; Salomón y col., 1990). El semen diluido fue conservado a baño maría en un termo a $32^\circ\text{C} \pm 2$ durante el proceso de IA. Para realizar la IA cervical se utilizó una pistola monodosis conformada por una vaina roja para lavajes uterinos de bovinos a la cual se le adosó en un extremo un tip amarillo con corona de 200 μl para pipetas Eppendorf, y en el otro extremo una jeringa de insulina de 1ml (Figura 4.2).

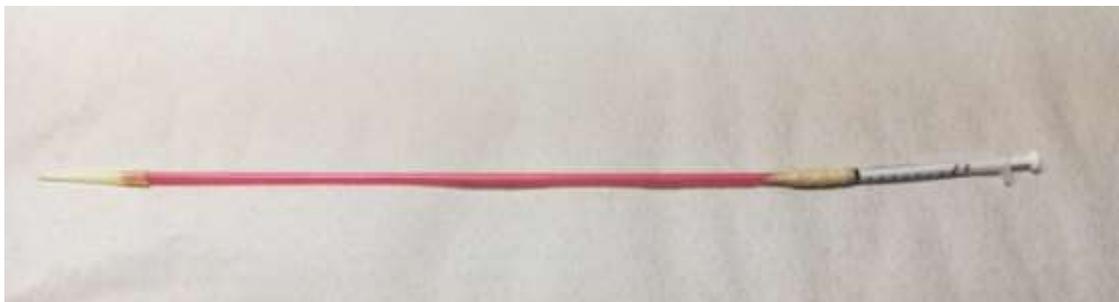


Figura 4.2. Pistola monodosis utilizada para realizar la IA cervical.

Debido al estrés térmico (ITH=74) en el día de la IA en la REP1, se retrasó el proceso de IA, y debió suspenderse cuando se había cumplido el tiempo máximo para realizar la IA. Como consecuencia de esta situación, quedó un grupo de 72 ovejas sin IA al cual se les realizó SN mediante la introducción de 5 carneros por un período de 12 h (20:00-8:00 h). Debido a que los grupos se habían asignado al azar previamente, y solamente no fueron IA, el remanente de ovejas conformó los grupos eCG (n= 21), BE (n= 20) y GnRH (n= 31).

Diagnóstico de gestación

El diagnóstico de gestación (DG) se realizó al día 35 post inseminación, por vía transrectal, por medio de un ecógrafo (Mindray DP-6600 Vet) con transductor lineal modelo (75L50EAV) de 5.0/7.5/10MHz.

Temperatura y humedad ambiental

Durante los diez días previos al inicio de cada REP (PER 1), durante cada REP (PER 2), y durante los 10 días posteriores a la finalización de cada REP del experimento (PER 3), se registraron los valores diarios de temperatura mínima (TMin), temperatura máxima (TMax) y de la humedad relativa ambiente (HRA) a partir de los datos recolectados por el Servicio Meteorológico Nacional. La TMedia se determinó a partir del promedio de la TMax y TMin por día. Utilizando la TMax, TMedia y Tmin se calculó en forma diaria el Índice de Temperatura y Humedad Máximo, Medio y Mínimo (ITH; $(1,8*TA+32) - (0,55-0,55*HR/100) * (1,8*TA-26)$; Valtorta y Gallardo, 1996).

Se consideraron cuatro categorías de ITH, basadas en los umbrales descritos por López y col. (2016): ≤ 72 , Normal [N]; 73-78, Alerta [A]; 79-82, Peligro [P]; y ≥ 83 , Emergencia [E]. Se calcularon los días acumulados de $ITH \geq 73$ (DAITH ≥ 73) y de $ITH \geq 79$ (DAITH ≥ 79) por REP.

Costo de la sincronización de celos

El costo de la sincronización de celos (CSC), se realizó utilizando la ecuación 3

Ecuación 3

$$CSC = \sum(\text{insumos}) * [1 + (1 - DG)]$$

Donde DG es el cociente obtenido del número de hembras preñadas diagnosticadas por ultrasonografía al d 30 post inseminación sobre el total de hembras inseminadas.

Los insumos estuvieron conformados por el costo individual del DIV, la dosis de PGF y de BE, GnRH o eCG según el TRT. Los precios se fueron presupuestados por la Distribuidora Villa y Moreno, CABA, Argentina, en el mes de noviembre de 2020.

Análisis estadístico

Los porcentajes de ovejas IA y de preñez fueron analizados con el procedimiento PROC GLIMMIX, y el ITH con el procedimiento PROC MIXED, correspondientes al paquete estadístico SAS[®] University Edition (SAS Institute, 2015). El modelo matemático utilizado para analizar el ITH incluyó los efectos principales de PER, REP y la interacción de PER*REP. El modelo matemático utilizado para analizar el porcentaje de ovejas inseminadas, y el porcentaje de preñez a la inseminación incluyó los efectos principales de TRT, REP, CAT y sus interacciones de primero y segundo orden. Para analizar el porcentaje de preñez al SN se utilizó un modelo reducido similar al de IA, pero sin efecto principal de REP.

RESULTADOS

En la REP 1, del total de hembras sincronizadas (n=570) el 85,78 % fue inseminado (n=489), el 12,63 % (n=72) debido a la excesiva temperatura ambiente durante el día no fueron

IA y pasaron a SN, y el 1,59 % restante (n=9) no se presentó a la IA. El DG se realizó al 78,77 % (n= 449) de las hembras inseminadas y al total de las hembras del SN. Las hembras faltantes de IA al diagnóstico de gestación no pasaron al momento del diagnóstico. En la REP 2, de las 228 hembras sincronizadas, el 92,54 % fue inseminado y se realizó el DG al 91,22 % (n=208). La falta de animales entre maniobras tuvo la misma causal que en la REP 1.

A pesar de que 72 hembras recibieron SN en la REP 1, el porcentaje de inseminación fue similar en ambas REP (96.41 %, $P>0.90$; Tabla 4.1). En el grupo de ovejas sometidas a IA, la tasa de preñez fue diferente de acuerdo con el TRT y con la REP (interacción REP*TRT, $P<0.02$; Tabla 4.1). Mientras que, en la REP 2 el porcentaje de preñez fue similar entre los TRT, en la REP 1, el porcentaje de preñez del TRT con eCG fue superior al de BE y GnRH (Tabla 4.1). No se detectó un efecto de CAT ($P>0.09$).

Tabla 4.1. Número y porcentaje de ovejas sincronizadas, inseminadas y con diagnóstico de gestación (DG) de las REP 1 y 2

REP	TRT	Sincronizadas (n)	Inseminadas (%)	DG IA (%)
1	eCG	165	99,30 (143/144)	19,11 (26/136) ^a
	BE	204	98,91 (182/184)	5,98 (10/167) ^b
	GnRH	201	96,47 (164/170)	6,16 (9/146) ^b
Subtotal		570	98,19 (489/498)	10,02 (45/449)
2	eCG	74	98,64 (73/74)	52,11 (37/71) ^c
	BE	78	82,05 (64/78)	45,31 (29/64) ^c
	GnRH	76	98,44 (74/76)	53,42 (39/73) ^c
Subtotal		228	92,54 (211/228)	50,48 (105/208)
TOTAL		798	96,41 (700/726)	22,83 (150/657)

Letra con diferente superíndice en columna: $P<0,001$

La razón de probabilidad de preñez para IA por REP, por CAT y por TRT se presentan en la Tabla 4.2. La CAT no modificó las probabilidades de preñez ($P>0,09$; Tabla 4.2). Por el contrario, en la REP 2 del experimento, las ovejas tuvieron más probabilidades de quedar preñadas que en la REP 1 ($P<0,001$; Tabla 4.2.).

Tabla 4.2. Razón de probabilidad de preñez respecto de las variables explicativas usadas en el modelo de regresión logística para inseminación artificial

		RP	95%IC	P
REP	1	1		<0,0001
	2	0,097	0,059-0,158	
CAT	1	1		0,0966
	2	1,346	0,708-2,559	
	3	0,717	0,402-1,278	
TRT	eCG	1		0,0057
	BE	2,248	1,314-3,847	
	GnRH	1,983	1,085-3,623	

RP: razón de probabilidad; 95%IC: intervalo de confianza del 95%; P: probabilidad

En la REP 1 cuando se compara el SN con la IATF, el porcentaje de preñez de SN fue superior al de IA (25,00% [18/72] vs. 10,02% [45/449]; $P < 0,001$; Tabla 4.3). Sin embargo, el porcentaje de preñez en SN no se presentó diferencias entre TRT ($P > 0,05$; Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Número y porcentaje de ovejas sincronizadas, inseminadas o con SN, y con diagnóstico de gestación (DG) en la REP 1

	Sincronizadas (n)	SN (%)	DG SN (%)	Inseminadas (%)	DG IA (%)
eCG	165	12,72 (21/165)	33,00 (7/21)	99,30 (143/144)	19,11 (26/136)
BE	204	9,80 (20/204)	15,00 (3/20)	98,91 (182/184)	5,98 (10/167)
GnRH	201	15,42 (31/201)	25,00 (8/31)	96,47 (164/170)	6,16 (9/146)
Subtotal	570	12,16 (72/570)	25,00 (18/72) ^A	98,19 (489/498)	10,02 (45/449) ^B

Letra con diferente superíndice en fila: $P < 0,001$

De hecho, las probabilidades de una oveja de quedar preñada en SN con el TRT de BE o GnRH fueron similares a la probabilidad de quedar preñada con eCG ($P > 0,41$; Tabla 4.4). La razón de probabilidad con SN fue menor que con IA ($P < 0,01$), y la razón de probabilidad fue menor con los TRT de BE y GnRH que con eCG ($P < 0,01$; Tabla 4.5).

Tabla 4.4. Razón de probabilidad (RP) de preñez respecto de las variables explicativas usadas en el modelo de regresión logística para SN de REP 1

TRT	RP	95%IC	P
eCG	1		0,41
BE	2,833	0,599-13,397	
GnRH	1,438	0,418-4,939	

95%IC: intervalo de confianza del 95%; P: probabilidad

Tabla 4.5. Razón de probabilidad (RP) de preñez respecto de las variables explicativas usadas en el modelo de regresión logística para SN e IA

		RP	95%IC	P
Servicio	Natural	1		0,0002
	IA	0,285	0,146-0,556	
	eCG	1		0,0098
TRT	BE	3,296	1,401-7,75	
	GnRH	2,380	1,151-4,92	

95%IC: intervalo de confianza del 95%; P: probabilidad

En relación con los valores de temperatura y humedad ambiental, no hubo diferencias en el ITH-Max, ITH-Med, y el ITH-Min entre los PER de igual REP ($P > 0.16$; $P > 0.81$) aunque los valores fueron mayores en REP1 que en la REP2 (80.08 ± 1.14 vs. 75.65 ± 1.17 , $P < 0.009$; 59.21 ± 1.19 vs. 52.30 ± 1.21 , $P < 0.001$; Tabla 4.6). Los animales tuvieron 9 $DAITH \geq 73$ y 6 $DAITH \geq 79$ más en la REP1 que en la REP2 (25 vs. 16, $P < 0.01$; 16 vs. 10, $P < 0.01$; Tabla 4.6).

Tabla 4.6. Cuadrados medios mínimos y errores estándares del índice de temperatura-humedad máximo (ITH-Max), mínimo (ITH-Min), días acumulados de $ITH \geq 72$ ($DAITH \geq 73$) y días acumulados de $ITH \geq 79$ ($DAITH \geq 79$)

REP	ITH-Max	ITH-Med	ITH-Min	$DAITH \geq 73$	$DAITH \geq 79$
1	$80,08 \pm 1.14^A$	$69,64 \pm 1.05^A$	$59,21 \pm 1.19^A$	25 ^A	16 ^A
2	$75,65 \pm 1.17^B$	$63,98 \pm 1.07^B$	$52,30 \pm 1.21^B$	16 ^B	10 ^B

Letras con diferente superíndice en una columna difieren, $P < 0.001$.

Por otra parte, la evaluación del costo de sincronización de celos por preñez obtenida determinó que la relación costo sincronización y costo sincronización preñez entre TRT fuera mayor para eCG que para BE y GnRH, con una relación eCG:BE de $\sim 3:1$ en costo de SC y de preñez y para GnRH:BE de $\sim 1,8:1$ (Tabla 4.7).

Tabla 4.7. Costos de SC y de preñez por oveja y TRT y relación costos entre TRT

Costo por oveja	BE (\$)	eCG (\$)	GnRH (\$)
Costo de SC	59,54	187,16	112,38
Costo de preñez	92,28	277,00	165,21
Relación TRT	SC	Preñez	
eCG:BE	3,14:1	3:1	
GnRH:BE	1,88:1	1,79:1	

DISCUSIÓN

La utilización de BE como inductor de la ovulación en un protocolo corto de SC resultó en porcentajes de preñez variables. En situaciones de stress térmico, el uso de BE y SN no presentó diferencias significativas en el porcentaje de preñez en comparación con el uso de eCG o GnRH, aunque el porcentaje de preñez del grupo BE fue numéricamente el más bajo de los tres. Al utilizarse la técnica de IATF durante el mes de febrero, el grupo BE obtuvo un porcentaje de preñez similar al grupo GnRH, pero ambos fueron significativamente menores que el grupo eCG. Los bajos valores tanto del SN como de la IATF podrían deberse a factores ambientales como las altas temperaturas y humedad relativa ambiente presentes días previos y posteriores al SN/IATF (Saravia y Cruz, 2003). Por el contrario, al realizarse la SC y ovulación durante el mes de marzo, el porcentaje de preñez obtenido con BE no presentó diferencias significativas con el resto de los tratamientos. El porcentaje de preñez obtenido con el tratamiento BE fue superior a los resultados publicados por otros autores (Castilho y col., 2015; Menchaca y Rubianes, 2007) mediante la utilización de la misma hormona como inductora de la ovulación en ovinos y caprinos, lo cual podría deberse a la dosis utilizada y el momento de aplicación ya que estudios previos utilizaron una dosis de 200 µg o 1 mg de BE aplicada a las 24h de retirado el DIV, lo que posiblemente repercuta en la obtención de un folículo preovulatorio apto para la fertilización.

Es importante resaltar que, si bien el porcentaje de preñez obtenido con el TRT BE fue el similar al del TRT con GnRH y al TRT con eCG, la relación en los costos tanto de la SC como de la obtención de preñez es favorable al BE con respecto al TRT de eCG en una relación de alrededor del 3:1 y cercana a 2:1 con el TRT de GnRH.

CONCLUSIONES

En conclusión, la utilización de un protocolo de SC basado en la colocación de un DIV por 5 d y la aplicación de 100µg de BE y PGF al momento del retiro del DIV en ovejas durante la época reproductiva junto con la IA a las 50-55h, sería una alternativa viable al protocolo basado en la utilización de la eCG al momento del retiro del DIV, sin desmedro del porcentaje de preñez y con un costo sensiblemente menor en una situación de confort ambiental.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES GENERALES

Esta tesis planteó como objetivo general estudiar la eficacia de los tratamientos cortos de SC mediante el uso de DIV con P₄ junto con la aplicación IM de PGF y de BE post retiro del DIV, para su uso en la IATF en ovinos durante la época reproductiva, y tres objetivos específicos: 1) comparar la farmacocinética de P₄, en dos DIV con 300mg o 160mg de P₄ nuevos y usados 2) determinar la mejor dosis y momento de aplicación de BE dentro de un protocolo de SC para inducir la ovulación, en base al estudio de la dinámica folicular y momento de ovulación y 3) evaluar la fertilidad obtenida luego de la IATF con semen fresco por vía cervical en ovejas sincronizadas con un protocolo corto de SC que al momento del retiro del DIV utiliza una dosis luteolítica de PGF y una dosis de 100 µg de BE para inducir la ovulación. Para cumplir con los mencionados objetivos se realizaron cuatro experimentos.

En el primer experimento se estudió la utilización y reutilización de DIV con 160mg de P₄ en comparación con un DIV comercial de 300 mg de P₄ colocados por 7d de manera de determinar la posible reutilización del DIV con menor concentración. Para ello se comparó la farmacocinética a través del análisis no compartimental de las concentraciones séricas de P₄, en los dos DIV nuevos y usados. Las concentraciones séricas de P₄ no fueron significativamente diferentes entre los DIV nuevos. Sin embargo, la utilización por segunda vez del DIV con 160 mg P₄ provocó concentraciones séricas subluteales de P₄ (<2 ng/ml) a partir de las 48 h de colocado el DIV, las cuales afectarían la dinámica y el crecimiento folicular, causando un excesivo crecimiento y persistencia en el tiempo de los folículos y posiblemente disminuyendo la fertilidad.

En el segundo experimento se estudió retrospectivamente el crecimiento del FM luego de la aplicación de 100 o 200 μg BE dentro de un protocolo basado en la colocación por cinco días de un DIV con 300 mg P_4 y PGF. Se demostró que el grupo BE100 presentó un IO de 48 h mientras que los grupos eCG y BE200 presentaron rangos entre 60 y 84 h. Por otra parte, la aplicación de 200 μg de BE produjo un 15,78 % de quistes foliculares por lo cual la dosis no sería beneficiosa ya que la presencia de quistes foliculares repercute en la fertilidad de la hembra afectada

En el tercer experimento se estudió retrospectivamente el crecimiento del FM luego de la aplicación de BE a diferentes horas de retirado el DIV. La dosis utilizada se basó en el segundo experimento. Se demostró que la aplicación de BE al momento del retiro del DIV presentó el promedio más bajo y el rango más corto (48 h) de intervalo a la ovulación a diferencia de los tratamientos BE24 y BE36 (60 h) por lo que la elección de aplicar BE al momento del retiro junto con la PGF evitaría un encierre, beneficiando el manejo de los animales al disminuir el estrés que conlleva esa maniobra. Así mismo, al poseer un rango de 48h entre la primera y la última ovulación podrían obtenerse mejores resultados en la aplicación de IATF.

En el cuarto experimento se evaluó la fertilidad obtenida a partir del porcentaje de gestación como respuesta a campo de un protocolo de sincronización basado en el uso de DIV por cinco días y la aplicación al retiro del mismo de una dosis de 100 μg de BE y una dosis luteolítica de PGF. Se demostró que este protocolo bajo situaciones de stress térmico y SN no presentó diferencias significativas al compararse con el protocolo de eCG o GnRH al igual que al utilizarse IA bajo situaciones de confort ambiental. Así mismo la relación de costos entre TRT fue favorable para el TRT BE al compararse con el TRT eCG (3:1) y TRT GnRH (1,8:1).

En conclusión, esta tesis demostró, por un lado, que no es beneficiosa la reutilización de DIV con una concentración inicial de 160 mg P_4 . Así mismo, quedó demostrado que la

aplicación de un protocolo de sincronización de ovulaciones en ovejas cíclicas basado en la combinación de un DIV colocado durante cinco días y la aplicación de PGF y 100 μ g BE al retiro resulta en la mejor combinación posible para obtener un folículo ovulatorio adecuado y la ausencia de inducción de quistes anovulatorios con porcentajes de preñez similares a los obtenidos con el uso de eCG dentro de un protocolo similar.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Abecia, J. A., Forcada, F., y González-Bulnes, A. (2011). Pharmaceutical control of reproduction in sheep and goats. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 27(1), 67-79. doi:10.1016/j.cvfa.2010.10.001
- 2) Acritopoulou, S., y Haresign, W. (1980). Response of ewes to a single injection of an analogue of PGF-2 alpha given at different stages of the oestrous cycle. *J Reprod Fertil*, 58(1), 219-221.
- 3) Advis, J. P., Kuljis, R. O., y Dey, G. (1985). Distribution of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) content and total LHRH-degrading activity (LHRH-DA) in the hypothalamus of the ewe. *Endocrinology*, 116(6), 2410-2418.
- 4) Ainsworth, L., y Downey, B. R. (1986). A controlled internal drug-release dispenser containing progesterone for control of the estrous cycle of ewes. *Theriogenology*, 26(6), 847-856. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X(86)90014-2
- 5) Ainsworth, L., y Wolynetz, M. S. (1982). Synchronization of estrus and reproductive performance of ewes treated with synthetic progestogens administered by subcutaneous ear implant or by intravaginal sponge pessary. *Journal of animal science*, 54(6), 1120-1127.
- 6) Aisen, E. G. (2004). *Reproducción Ovina Y Caprina*. (Editorial Intermédica, Ed.). Buenos Aires, Argentina.
- 7) Al-Haidary, A. A. (2004). Physiological responses of Naimey sheep to heat stress challenge under semi-arid environments. *International Journal of Agriculture and Biology*, 2, 307-309.
- 8) Allison, A. J., y Mc Natty, K. P. (1972). Levels of progesterone in peripheral blood plasma of romney and merino ewes during the oestrous cycle. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 15(4), 825-830. doi:10.1080/00288233.1972.10421637
- 9) Ayres, H., Martins, C. M., Ferreira, R. M., Mello, J. E., Dominguez, J. H., Souza, A. H.,

... Baruselli, P. S. (2008). Effect of timing of estradiol benzoate administration upon synchronization of ovulation in suckling Nelore cows (*Bos indicus*) treated with a progesterone-releasing intravaginal device. *Animal Reproduction Science*, 109(1-4), 77-87. doi:10.1016/j.anireprosci.2007.12.001

10) Baggot, J. D. (2002). En: *Terapéutica Antimicrobiana Veterinaria: Principios de Biodisponibilidad Y Disposición De Los Fármacos Antimicrobianos. 3 rd ed.) Buenos Aires, Argentina*, 43-76.

11) Baird, D. T. (1978). Pulsatile secretion of LH and ovarian estradiol during the follicular phase of the sheep estrous cycle. *Biology of Reproduction*, 18(3), 359-364.

12) Barcikowski, B., Carlson, J. C., Wilson, L., y McCracken, J. A. (1974). The effect of endogenous and exogenous estradiol-17 β on the release of prostaglandin F2 α from the ovine uterus. *Endocrinology*, 95(5), 1340-1349.

13) Barrett, D. M. W., Bartlewski, P. M., Duggavathi, R., Davies, K. L., Huchkowsky, S. L., Epp, T., y Rawlings, N. C. (2008). Synchronization of follicular wave emergence in the seasonally anestrous ewe: The effects of estradiol with or without medroxyprogesterone acetate. *Theriogenology*, 69(7), 827-836. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.12.010

14) Bartlewski, P. M., Baby, T. E., y Giffin, J. L. (2011). Reproductive cycles in sheep. *Animal reproduction science*, 124(3-4), 259-268.

15) Bartlewski, P. M., Beard, A. P., Cook, S. J., Chandolia, R. K., Honaramooz, A., y Rawlings, N. C. (1999). Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. *Reproduction*, 115(1), 111-124.

16) Bartlewski, P. M., Beard, A. P., Cook, S. J., y Rawlings, N. C. (1998). Ovarian follicular dynamics during anoestrus in ewes. *Reproduction*, 113(2), 275-285.

17) Bartlewski, P. M., Beard, A. P., y Rawlings, N. C. (1999a). Ovarian function in ewes at

the onset of the breeding season. *Animal reproduction science*, 57(1-2), 67-88.

18) Bartlewski, P. M., Beard, A. P., y Rawlings, N. C. (1999b). Ovarian function in ewes during the transition from breeding season to anoestrus. *Animal Reproduction Science*, 57(1-2), 51-66.

19) Bartlewski, P. M., Beard, A. P., y Rawlings, N. C. (2000). Ultrasonographic study of ovarian function during early pregnancy and after parturition in the ewe. *Theriogenology*, 53(3), 673-689. doi:10.1016/S0093-691X(99)00266-6

20) Bartlewski, P. M., Duggavathi, R., Aravindakshan, J., Barrett, D. M. W., Cook, S. J., y Rawlings, N. C. (2003). Effects of a 6-day treatment with medroxyprogesterone acetate after prostaglandin F₂ α -induced luteolysis at midcycle on antral follicular development and ovulation rate in nonprolific Western white-faced ewes. *Biology of Reproduction*, 68(4), 1403-1412. doi:10.1095/biolreprod.102.007278

21) Bazer, F. W. (2015). History of maternal recognition of pregnancy. En *Regulation of Implantation and Establishment of Pregnancy in Mammals* (pp. 5-25). Springer.

22) Beltramo, M., Robert, V., y Decourt, C. (2020). The kisspeptin system in domestic animals: what we know and what we still need to understand of its role in reproduction. *Domestic Animal Endocrinology*, 73, 106466. doi:https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2020.106466

23) Bindon, B. M., y Roberts, E. M. (1964). Control of ovarian activity in ewes with progestagens. *Journal of reproduction and fertility*, 7(3), 397-399.

24) Biscarde, C. E. A. (2010). Efeitos do benzoato de estradiol e/ou GnRn na função ovariana de ovelhas Santa Inês.

25) Bister, J. L., Noël, B., Perrad, B., Mandiki, S. N. M., Mbayahaga, J., y Paquay, R. (1999). Control of ovarian follicles activity in the ewe. *Domestic Animal Endocrinology*, 17(2), 315-328. doi:10.1016/S0739-7240(99)00047-8

- 26) Bo, G. A., Adams, G. P., Caccia, M., Martinez, M., Pierson, R. A., y Mapletoft, R. J. (1995). Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Animal Reproduction Science*, 39(3), 193-204.
- 27) Bo, G. A., Adams, G. P., Nasser, L. F., Pierson, R. A., y Mapletoft, R. J. (1993). Effect of estradiol valerate on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating gonadotropins in heifers. *Theriogenology*, 40(2), 225-239.
- 28) Bo, G. A., Adams, G. P., Pierson, R. A., y Mapletoft, R. J. (1995). Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology*, 43(1), 31-40. doi:10.1016/0093-691X(94)00010-R
- 29) Bo, G. A., Adams, G. P., Pierson, R. A., Tribulo, H. E., Caccia, M., y Mapletoft, R. J. (1994). Follicular wave dynamics after estradiol-17 β treatment of heifers with or without a progestogen implant. *Theriogenology*, 41(8), 1555-1569.
- 30) Bo, G. A., Baruselli, P. S., y Martinez, M. F. (2003). Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Animal reproduction science*, 78(3-4), 307-326.
- 31) Bo, G. A., Bergfelt, D. R., Brogliatti, G. M., Pierson, R. A., Adams, G. P., y Mapletoft, R. J. (2000). Local versus systemic effects of exogenous estradiol-17 β on ovarian follicular dynamics in heifers with progestogen implants. *Animal Reproduction Science*, 59(3), 141-157.
- 32) Bo, G. A., Colazo, M. G., Martinez, M. F., Kastelic, J. P., y Mapletoft, R. J. (2006). Sincronización de la emergencia de la onda folicular y la ovulación en animales tratados con progestágenos y diferentes ésteres de estradiol. En *II Simpósio internacional de reprodução animal aplicada* (pp. 71-84). Londrina, Brasil.
- 33) Bodin, L., Drion, P. V, Remy, B., Brice, G., Cognié, Y., y Beckers, J. F. (1997). Anti-PMSG antibody levels in sheep subjected annually to oestrus synchronisation. *Reproduction Nutrition Development*, 37(6), 651-660.
- 34) Brand, A., y de Jong, W. H. R. (1973). Qualitative an quantitativ micromorphological

investigations of the tertiary follicle population during the oestrus cycle in sheep. *J Reprod Fertil*, 33(3), 431-439. doi:10.1530/jrf.0.0330431

35) Cahill, L. P., Mariana, J. C., y Mauleon, P. (1979). Total follicular populations in ewes of high and low ovulation rates. *J Reprod Fertil*, 55(1), 27-36.

36) Caldani, M., Batailler, Martine, Thiery, J. C., y Dubois, M. P. (1988). LHRH-immunoreactive structures in the sheep brain. *Histochemistry*, 89(2), 129-139.

37) Carlson, K. M., Pohl, H. A., Marcek, J. M., Muser, R. K., y Wheaton, J. E. (1989). Evaluation of progesterone controlled internal drug release dispensers for synchronization of estrus in sheep. *Animal Reproduction Science*, 18(1), 205-218. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0378-4320(89)90022-5

38) Castilho, C., Ferreira de Almeida, M., Giometti, I. C., Zoccolaro Costa, M., Almeida Gabriel Filho, L. R., y Gardim De Cesare, A. (2015). Use of estradiol benzoate to induce ovulation in a short-term protocol for fixed-time AI in sheep. *Semina: Ciências Agrárias*, 36(3).

39) Castilho, C., Gambini, A. L. G., Fernandes, P., Trinca, L. A., Teixeira, A. B., y Barros, C. M. (2000). Synchronization of ovulation in crossbred dairy heifers using gonadotrophin-releasing hormone agonist, prostaglandin F2a and human chorionic gonadotrophin or estradiol benzoate. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33(1), 91-101.

40) Cavalcanti, A. S., Brandão, F. Z., Nogueira, L., y Fonseca, J. F. (2012). Effects of GnRH administration on ovulation and fertility in ewes subjected to estrous synchronization. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 41(6), 1412-1418.

41) Cavalieri, J., Coleman, C., Rodrigues, H., Macmillan, K. L., y Fitzpatrick, L. A. (2002). The effect of timing of administration of oestradiol benzoate on characteristics of oestrus, timing of ovulation and fertility in *Bos indicus* heifers synchronised with a progesterone releasing intravaginal insert. *Australian Veterinary Journal*, 80(4), 217-223. doi:10.1111/j.1751-0813.2002.tb10817.x

- 42) Chemineau, P., Baril, G., Leboeuf, B., Maurel, M. C., Roy, F., Pellicer-Rubio, M., ... Cognie, Y. (1999). Implications of recent advances in reproductive physiology for reproductive management of goats. *JOURNAL OF REPRODUCTION AND FERTILITY-SUPPLEMENT*-, 129-142.
- 43) Clarke, I. J., Cummins, J. T., Crowder, M. E., y Nett, T. M. (1988). Pituitary Receptors for Gonadotropin-Releasing Hormone in Relation to Changes in Pituitary and Plasma Gonadotropins in Ovariectomized Hypothalamo/Pituitary-Disconnected EWES. II. A Marked Rise in Receptor Number during the Acute Feedback Effects of Estradiol. *Biology of Reproduction*, 39(2), 349-354. doi:10.1095/biolreprod39.2.349
- 44) Clarke, I. J., Sari, I. P., Qi, Y., Smith, J. T., Parkington, H. C., Ubuka, T., ... Morgan, K. (2008). Potent action of RFamide-related peptide-3 on pituitary gonadotropes indicative of a hypophysiotropic role in the negative regulation of gonadotropin secretion. *Endocrinology*, 149(11), 5811-5821.
- 45) Colazo, M. G., Kastelic, J. P., Small, J. A., Wilde, R. E., Ward, D. R., y Mapletoft, R. J. (2007). Resynchronization of estrus in beef cattle: Ovarian function, estrus and fertility following progestin treatment and treatments to synchronize ovarian follicular development and estrus. *Can Vet J*, 48, 49-56.
- 46) Colazo, M. G., Kastelic, J. P., Whittaker, P. R., Gavaga, Q. A., Wilde, R., y Mapletoft, R. J. (2004). Fertility in beef cattle given a new or previously used CIDR insert and estradiol, with or without progesterone. *Animal Reproduction Science*, 81(1), 25-34.
- 47) Contreras-Solís, I., Díaz, T., López, G., Caigua, A., García, H., Salvador, A., y Gonzalez-Bulnes, A. (2007). Evaluación de la ecografía transrectal para la detección de folículos ováricos en ovejas de pelo. *Arch. Latinoam. Prod. Anim*, 1, 10-14.
- 48) Croker, K. P., y Shelton, J. N. (1973). Influence of stage of cycle, progestagen treatment and dose of oestrogen on uterine motility in the ewe. *Reproduction*, 32(3), 521-524.

- 49) Cueto, M., y Gibbons, A. (2011). Inseminación artificial en ovejas sincronizadas con prostaglandinas. *Presencia*, 58, 10-15.
- 50) Dardente, H., Birnie, M., Lincoln, G. A., y Hazlerigg, D. G. (2008). RFamide-related peptide and its cognate receptor in the sheep: cDNA cloning, mRNA distribution in the hypothalamus and the effect of photoperiod. *Journal of neuroendocrinology*, 20(11), 1252-1259.
- 51) Debeljuk, L., Arimura, A., y Schally, A. V. (1972). Effect of Estradiol and Progesterone on the LH Release Induced by LH-Releasing Hormone (LH-RH) in Intact Diestrous Rats and Anestrous Ewes. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 139(3), 774-777. doi:10.3181/00379727-139-36235
- 52) Dees, W. L., Sorensen, A. M., Kemp, W. M., y McArthur, N. H. (1981). Immunohistochemical localization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the brain and infundibulum of the sheep. *Cell and tissue research*, 215(1), 181-191.
- 53) Diaz, F. J., Anderson, L. E., Wu, Y., Rabot, A., Tsai, S., y Wiltbank, M. (2002). Regulation of progesterone and prostaglandin F2 α production in the CL. *Molecular and cellular endocrinology*, 191(1), 65-80.
- 54) Dieleman, Steph J., Bevers, M. M., Vos, P. L. A. M., y de Loos, F. A. M. (1993). PMSG/anti-PMSG in cattle: A simple and efficient superovulatory treatment? *Theriogenology*, 39(1), 25-41. doi:10.1016/0093-691X(93)90022-W
- 55) Dixon, A. B., Knights, M., Pate, J. L., Lewis, P. E., y Inskip, E. K. (2006). Reproductive performance of ewes after 5-day treatment with intravaginal inserts containing progesterone in combination with injection of prostaglandin F2 α . *Reproduction in Domestic Animals*, 41(2), 142-148.
- 56) Driancourt, M. A. (2001). Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*, 55(6), 1211-1239.

- 57) Driancourt, M. A., Gibson, W. R., y Cahill, L. P. (1985). Follicular dynamics throughout the oestrous cycle in sheep. A review. *Reprod Nutr Dev*, 25(1 A), 1-15.
- 58) Drion, P. V, Furtoss, V., Baril, G., Manfredi, E., Bouvier, F., Pougnaud, J. L., ... Remy, B. (2001). Four years of induction/synchronization of estrus in dairy goats: effect on the evolution of eCG binding rate in relation with the parameters of reproduction. *Reproduction Nutrition Development*, 41(5), 401-412.
- 59) Durán del Campo, A. (1980). *Anatomía, fisiología de la reproducción e inseminación artificial en ovinos*. Montevideo Uruguay. Hemisferio Sur
- 60) Dutt, R. H., y Casida, L. E. (1948). Alteration of the estrual cycle in sheep by use of progesterone and its effect upon subsequent ovulation and fertility. *Endocrinology*, 43(4), 208-217.
- 61) Dziuk, P. J. (1965). Response of sheep and swine to treatments for control of ovulation. *Miscellaneous Publication*, (1005), 50.
- 62) Dziuk, P. J., Cook, B., Niswender, G. D., Kaltenbach, C. C., y Doane, B. B. (1968). Inhibition and control of estrus and ovulation in ewes with a subcutaneous implant of silicone rubber impregnated with a progestogen. *American journal of veterinary research*, 29(12), 2415-2417.
- 63) Evans, A. C. O. (2003). Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. *Animal Reproduction Science*, 78(3), 289-306. doi:10.1016/S0378-4320(03)00096-4
- 64) Evans, A. C. O., Duffy, P., Hynes, N., y Boland, M. P. (2000). Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. *Theriogenology*, 53(3), 699-715. doi:10.1016/s0093-691x(99)00268-x
- 65) Evans, A. C. O., O'keeffe, P., Mihm, M., Roche, J. F., Macmillan, K. L., y Boland, M. P. (2003). Effect of oestradiol benzoate given after prostaglandin at two stages of follicle wave development on oestrus synchronisation, the LH surge and ovulation in heifers. *Animal*

Reproduction Science, 76(1), 13-23.

66) Fierro, S., Gil, J., Viñoles, C., y Olivera-Muzante, J. (2013). The use of prostaglandins in controlling estrous cycle of the ewe: A review. *Theriogenology*, 79(3), 399-408. doi:<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.10.022>

67) Fierro, S., y Olivera-Muzante, J. (2017). Long interval prostaglandin as an alternative to progesterone-eCG based protocols for timed AI in sheep. *Animal Reproduction Science*, 180, 78-84. doi:<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.03.004>

68) Flynn, J. D., Duffy, P., Boland, M. P., y Evans, A. C. O. (2000). Progestagen synchronisation in the absence of a corpus luteum results in the ovulation of a persistent follicle in cyclic ewe lambs. *Animal Reproduction Science*, 62(4), 285-296.

69) Fukusumi, S., Habata, Y., Yoshida, H., Iijima, N., Kawamata, Y., Hosoya, M., ... Shintani, Y. (2001). Characteristics and distribution of endogenous RFamide-related peptide-1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1540(3), 221-232.

70) Fvasconcellos. (2008). Skeletal formula of dinprorost (prostaglandin F2alfa).

71) Gibaldi, M., y Perrier, D. (1982). Physiological pharmacokinetic models. *Pharmacokinetics. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, Inc*, 355-384.

72) Ginther, O. J., Kot, K., y Wiltbank, M. C. (1995). Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. *Theriogenology*, 43(3), 689-703.

73) Gómez, M. V., Jones, M., Ambrosi, C., Faisal, F., Silvestrini, P., y Soto, Andrés Telésforo. (2010). Aplicación de un esquema corto de sincronización de celos e inseminación artificial a tiempo fijo en ovejas Romey Marsh en época reproductiva. En *XI Jornadas Técnico-Científicas*. Casilda Santa Fe.

74) Gonçalves Souza-Fabjan, J. M., Mendonça da Rosa, R., Alvarez Balaro, M. F., Pinto, P. H. N., dos Santos, G. B., Nunes Arashiro, E. K., ... Zandonadi Brandão, F. (2017). Effect of

different hormonal combinations on follicular wave emergence and superovulatory response in sheep. *Theriogenology*, 103, 24-29. doi:10.1016/j.theriogenology.2017.07.036

75) Goodman, R. L. (1994). Neuroendocrine control of the ovine estrous cycle. *The physiology of reproduction*, 659-710.

76) Hafez, E. (2007). II. Fisiología de la reproducción. En *Reproducción e inseminación artificial en animales*. México: McGraw-hill.

77) Hamada, T., Shimizu, T., Ichikawa, M., y Mori, Y. (1992). Immunohistochemical study on gonadotropin-releasing hormone neurons in the Shiba goat brain. *Journal of Reproduction and Development*, 38(2), 133-142.

78) Hansen, T. R., Bott, R., Romero, J., Antoniazzi, A., y Davis, J. S. (2017). Corpus luteum and early pregnancy in ruminants. En *The Life Cycle of the Corpus Luteum* (pp. 205-225). Springer.

79) Hauger, R. L., Karsch, F. J., y Foster, D. L. (1977). A New Concept for Control of the Estrous Cycle of the Ewe Based on the Temporal Relationships Between Luteinizing Hormone, Estradiol and Progesterone in Peripheral Serum and Evidence that Progesterone Inhibits Tonic LH Secretion 1 2. *Endocrinology*, 101(3), 807-817.

80) Hunter, R. H. F. (1982). *Fisiología y tecnología de la reproducción de la hembra de los animales domésticos*.

81) Ieda, Nahoko, Hassaneen, Ahmed S. A., Inoue, Naoko, Uenoyama, Yoshihisa, y Tsukamura, Hiroko. (2020). Kisspeptin: A Central Regulator of Reproduction in Mammals. *SVU-International Journal of Veterinary Sciences*, 3(1), 10-26.

82) Inskeep, E. K., Stevens, L. P., y Rudy, C. R. (1979). Fertility in Ewes Receiving Low Doses of Estradiol during Synchronized Estrus. *Journal of Animal Science*, 48(1), 52-53.

83) Johnson, S. K., Dailey, R. A., Inskeep, E. K., y Lewis, P. E. (1996). Effect of peripheral concentrations of progesterone on follicular growth and fertility in ewes. *Domestic Animal*

Endocrinology, 13(1), 69-79.

84) Kadokawa, H., Shibata, M., Tanaka, Y., Kojima, T., Matsumoto, K., Oshima, K., y Yamamoto, N. (2009). Bovine C-terminal octapeptide of RFamide-related peptide-3 suppresses luteinizing hormone (LH) secretion from the pituitary as well as pulsatile LH secretion in bovines. *Domestic animal endocrinology*, 36(4), 219-224.

85) Karaca, F., Ataman, M. B., y Coyan, K. (2009). Synchronization of estrus with short- and long-term progestagen treatments and the use of GnRH prior to short-term progestagen treatment in ewes. *Small Ruminant Research*, 81(2), 185-188.

86) Karaca, F., Dođruer, G., Saribay, M. K., y Ateş, C. T. (2010). Oestrus synchronization with short-term and long-term progestagen treatments in goats: the use of GnRH prior to short-term progestagen treatment. *Italian Journal of Animal Science*, 9(1), e22. doi:10.4081/10.4081/ijas.2010.e22

87) Karsch, F. J. (1984). Endocrine and environmental control of oestrous cyclicity in sheep. *Reproduction in sheep: Australian Wool Corporation technical publication/supervising editors, DR Lindsay and DT Pearce*.

88) Karsch, F. J., Bowen, J. M., Caraty, A., Evans, N. P., y Moenter, S. M. (1997). Gonadotropin-releasing hormone requirements for ovulation. *Biol Reprod*, 56(2), 303-309.

89) Langford, G. A., Marcus, G. J., Hackett, A. J., Ainsworth, L., y Wolynetz, M. S. (1980). Influence of Estradiol-17 β on Fertility in Confined Sheep Inseminated with Frozen Semen. *Journal of animal science*, 51(4), 911-916.

90) Lehman, M. N., Robinson, J. E., Karsch, FJ, y Silverman, A. (1986). Immunocytochemical localization of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) pathways in the sheep brain during anestrus and the mid-luteal phase of the estrous cycle. *Journal of Comparative Neurology*, 244(1), 19-35.

91) Leshin, L. S., Rund, L. A., Crim, J. W., y Kiser, T. E. (1988). Immunocytochemical

localization of luteinizing hormone-releasing hormone and proopiomelanocortin neurons within the preoptic area and hypothalamus of the bovine brain. *Biology of reproduction*, 39(4), 963-975.

92) Li, Xun, Su, Juan, Lei, Zhihai, Zhao, Yangyang, Jin, Mengmeng, Fang, Rui, ... Jiao, Yang. (2012). Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) and its receptor in the female pig: cDNA cloning, expression in tissues and expression pattern in the reproductive axis during the estrous cycle. *Peptides*, 36(2), 176-185.

93) López, Guillermo, Brizuela, A., Rondán, Guillermo, Lissaso, C., Kemerer, A., y de los Santos, M. (2016). Determinación del índice de temperatura y humedad (ITH) para vacas lecheras, en el Departamento Nogoyá, entre ríos. *Revista Científica Agropecuaria*, 20(1-2), 57-65.

94) Luna Palomera, Carlos, y Alonso Morales, Rogelio Alejandro. (2014). Genes con efecto mayor sobre la fertilidad de ovejas: Revisión. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 5(1), 107-130.

95) Luther, J. S., Grazul-Bilska, A. T., Kirsch, J. D., Weigl, R. M., Kraft, K. C., Navanukraw, C., ... Redmer, D. A. (2007). The effect of GnRH, eCG and progestin type on estrous synchronization following laparoscopic AI in ewes. *Small Ruminant Research*, 72(2-3), 227-231. doi:<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.10.015>

96) Macmillan, K. L., Segwagwe, B. V. E., y Pino, C. S. (2003). Associations between the manipulation of patterns of follicular development and fertility in cattle. *Animal Reproduction Science*, 78(3), 327-344.

97) Malpaux, Benoit, Tricoire, H., Mailliet, F., Daveau, Anaïs, Migaud, Martine, Skinner, D. C., ... Chemineau, Philippe. (2002). Melatonin and seasonal reproduction: understanding the neuroendocrine mechanisms using the sheep as a model. *Reproduction (Cambridge, England) Supplement*, 59, 167-179.

- 98) Martemucci, G., y D'Alessandro, A. G. (2010). Estrous and fertility responses of dairy ewes synchronized with combined short term GnRH, PGF2 α and estradiol benzoate treatments. *Small ruminant research*, 93(1), 41-47.
- 99) Martemucci, G., y D'Alessandro, A. G. (2011). Synchronization of oestrus and ovulation by short time combined FGA, PGF2 α , GnRH, eCG treatments for natural service or AI fixed-time. *Animal Reproduction Science*, 123(1-2), 32-39.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.11.007>
- 100) Martinez, M. F., Kastelic, J. P., Bo, G. A., Caccia, M., y Mapletoft, R. J. (2005). Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. *Animal Reproduction Science*, 86(1), 37-52.
- 101) Martinez, M. F., McLeod, B., Tattersfield, G., Smaill, B., Quirke, L. D., y Juengel, J. L. (2015). Successful induction of oestrus, ovulation and pregnancy in adult ewes and ewe lambs out of the breeding season using a GnRH+progesterone oestrus synchronisation protocol. *Animal Reproduction Science*, 155(Supplement C), 28-35.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.01.010>
- 102) Maurel, M. C., Roy, F., Hervé, V., Bertin, J., Vaiman, D., Crihiu, E., ... Boue, P. (2003). Immune response to equine chorionic gonadotropin used for the induction of ovulation in goats and ewes. *Gynecologie, obstetrique & fertilité*, 31(9), 766-769.
- 103) McCracken, John A., Custer, Edward E., y Lamsa, Justin C. (1999). Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiological reviews*, 79(2), 263-323.
- 104) Meidan, Rina, Girsh, Eliezer, Mamluk, Roni, Levy, Nitzan, y Farberov, Svetlana. (2017). Luteolysis in ruminants: past concepts, new insights, and persisting challenges. En *The Life Cycle of the Corpus Luteum* (pp. 159-182). Springer.
- 105) Meikle, A., Forsberg, M., Garófalo, E. G., Carlsson, M. A., Lundeheim, N., y Rubianes, E. (2001). Circulating gonadotrophins and follicular dynamics in anestrus ewes after

treatment with estradiol-17 β . *Animal Reproduction Science*, 67(1), 79-90.

106) Mellin, T. N., y Busch, R. D. (1976). Corpus luteum function in the ewe: effect of PGF₂alfa and prostaglandin synthetase inhibitors. *Prostaglandins*, 12(2), 303-319.

107) Menchaca, A. (2006). *Tratamientos Cortos con progestinas para Inseminación Artificial a Tiempo Fijo en caprinos*.

108) Menchaca, A., Miller, V., Gil, J., Pinczak, A., Laca, M., y Rubianes, E. (2004). Prostaglandin F₂ α treatment associated with timed artificial insemination in ewes. *Reproduction in domestic animals*, 39(5), 352-355.

109) Menchaca, A., Miller, V., Salveraglio, V., y Rubianes, E. (2007). Endocrine, luteal and follicular responses after the use of the Short-Term Protocol to synchronize ovulation in goats. *Animal Reproduction Science*, 102(1), 76-87.

110) Menchaca, A., y Rubianes, E. (2004). New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reproduction, fertility, and development*, 16(4), 403-13. doi:10.10371/RD04037

111) Menchaca, A., y Rubianes, E. (2007). Pregnancy Rate Obtained with Short-term Protocol for Timed Artificial Insemination in Goats. *Reproduction in Domestic Animals*, 42(6), 590-593. doi:doi:10.1111/j.1439-0531.2006.00827.x

112) Morello, H. H., y Chemieau, P. (2004). Características anatómicas y funcionales del sistema reproductor de la hembra. En Editorial Intermédica (Ed.), *Reproducción Ovina y Caprina* (Primera Ed., pp. 13-16). Buenos Aires, Argentina.

113) Murphy, B. D. (2018). Equine chorionic gonadotropin: an enigmatic but essential tool. *Animal Reproduction (AR)*, 9(3), 223-230.

114) NEUROTicker. (2007a). Struktur von Estradiol (Ostradiol).

115) NEUROTicker. (2007b). Struktur von Progesteron. Progesteron.

116) Noakes, D. E., Parkinson, T. J., y England, G. C. W. (2008). *Arthur's Veterinary*

Reproduction and Obstetrics. (Elsevier, Ed.) (eighth edi.). China.

117) Noel, B., Bister, J. L., y Paquay, R. (1993). Ovarian follicular dynamics in Suffolk ewes at different periods of the year. *J Reprod Fertil*, 99(2), 695-700.

118) NRC, Institute of Laboratory Animal Resources (US). Committee on Care and use of Laboratory Animals. (1986). *Guide for the care and use of laboratory animals*. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National

119) Oliveira, M. A. L., Guido, S. I., y Lima, P. F. (2001). Comparison of different protocols used to induce and synchronize estrus cycle of Saanen goats. *Small Ruminant Research*, 40(2), 149-153.

120) Olivera-Muzante, J., Fierro, S., López, V., y Gil, J. (2011). Comparison of prostaglandin-and progesterone-based protocols for timed artificial insemination in sheep. *Theriogenology*, 75(7), 1232-1238.

121) Olivera-Muzante, J., Gil, J., Fierro, S., Menchaca, A., y Rubianes, E. (2011). Alternatives to improve a prostaglandin-based protocol for timed artificial insemination in sheep. *Theriogenology*, 76(8), 1501-1507.

122) Palmieri, C., Schiavi, E., y Della Salda, L. (2011). Congenital and acquired pathology of ovary and tubular genital organs in ewes: A review. *Theriogenology*, 75(3), 393-410.

123) Pate, J. L., y Keyes, P. L. (2001). Immune cells in the corpus luteum: friends or foes? *REPRODUCTION-CAMBRIDGE-*, 122(5), 665-676.

124) Pinna, A. E., Brandão, F. Z., Cavalcanti, A. S., Borges, A. M., Souza, J. M. G., y Fonseca, J. F. (2012). Reproductive parameters of Santa Inês ewes submitted to short-term treatment with re-used progesterone devices. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, 64(2), 333-340. doi:10.1590/S0102-09352012000200012

125) Polkowska, J., Dubois, M. P., y Domański, E. (1980). Immunocytochemistry of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) in the sheep hypothalamus during various

reproductive stages. *Cell and tissue research*, 208(2), 327-341.

126) Qi, Y., Oldfield, B. J., y Clarke, I. J. (2009). Projections of RFamide-related peptide-3 neurones in the ovine hypothalamus, with special reference to regions regulating energy balance and reproduction. *Journal of neuroendocrinology*, 21(8), 690-697.

127) Quintero-Elisea, J. A., Macías-Cruz, U., Álvarez-Valenzuela, F. D., Correa-Calderón, A., González-Reyna, A., Lucero-Magaña, F. A., ... Avendaño Reyes, L. (2011). The effects of time and dose of pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) on reproductive efficiency in hair sheep ewes. *Tropical Animal Health and Production*, 43(8), 1567-1573. doi:10.1007/s11250-011-9843-z

128) Quirke, J. F., Hanrahan, J. P., y Gosling, J. P. (1987). The Effect of oestradiol benzoate on the duration of oestrus and release of LH in ovariectomized Galway ewe lambs and adult ewes. *Animal Reproduction Science*, 13(1), 37-44.

129) Quispe, T., Quintero, L., Ortiz Hernández, A., y Valencia Méndez, J. (1995). Sincronización de estros en ovejas mediante un tratamiento corto con acetato de melengestrol (MGA) combinado con cipionato de estradiol (ECP). *Veterinaria México*, 26(1), 23-29.

130) Rathbone, M. J., Macmillan, K. L., Bunt, C. R., y Burggraaf, S. (1997). Conceptual and commercially available intravaginal veterinary drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 28(3), 363-392. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0169-409X(97)00089-6

131) Rathbone, M. J., Macmillan, K. L., Jochle, W., Boland, M. P., y Inskeep, E. K. (1998). Controlled-release products for the control of the estrus cycle in cattle, sheep, goats, deer, pigs, and horses. *Critical ReviewsTM in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 15(4).

132) Ravindra, J. P., Rawlings, N. C., Evans, A. C. O., y Adams, G. P. (2004). Ultrasonographic study of ovarian follicular dynamics in ewes during the oestrous cycle. *Reproduction*, 101(2), 501-509. doi:10.1530/jrf.0.1010501

133) Rawlings, N C; Evans, A.C.O.; Honaramooz, C. Bartlewski, P. M. (2003). Antral

follicle growth and endocrine changes in prepubertal cattle, sheep and goats. *Animal Reproduction Science*, 78, 259-270.

134) Reeves, J. J., Arimura, A., y Schally, A. V. (1971). Changes in Pituitary Responsiveness to Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LH-RH) in Anestrous Ewes Pretreated with Estradiol Benzoate. *Biol Reprod*, 4(1), 88-92. doi:10.1093/biolreprod/4.1.88

135) Revel, F. G., Saboureau, M., Pevet, P., Simonneaux, V., y Mikkelsen, J. D. (2008). RFamide-related peptide gene is a melatonin-driven photoperiodic gene. *Endocrinology*, 149(3), 902-912.

136) Reyna, J., Thomson, P. C., Evans, G., y Maxwell, W. M. C. (2007). Synchrony of Ovulation and Follicular Dynamics in Merino Ewes Treated with GnRH in the Breeding and Non-breeding Seasons. *Reproduction in Domestic Animals*, 42(4), 410-417.

137) Rivera, G. M., Goñi, C. G., Chaves, M. A., Ferrero, S. B., y Bo, G. A. (1998). Ovarian follicular wave synchronization and induction of ovulation in postpartum beef cows. *Theriogenology*, 49(7), 1365-1375.

138) Robinson, T. J. (1956). The artificial insemination of the Merino sheep following the synchronization of oestrus and ovulation by progesterone injected alone and with pregnant mare serum gonadotrophin (PMS). *Australian Journal of Agricultural Research*, 7(3), 194-210.

139) Robinson, T. J. (1964). Synchronization of oestrus in sheep by intravaginal and subcutaneous application of progestin impregnated sponges. *Proc. Aus. Soc. Anim. Prod*, 5(47), 32-37.

140) Robinson, T. J. (1967). Control of the ovarian cycle in the sheep. En *Reproduction in the female mammal* (pp. 373-418). Springer.

141) Robinson, T. J., Moore, N. W., Lindsay, D. R., Fletcher, I. C., y Salamon, S. (1970). Fertility following synchronization of oestrus in the sheep with intravaginal sponges. I. Effects of vaginal douche, supplementary steroids, time of insemination, and numbers and dilution of

spermatozoa. *Australian Journal of Agricultural Research*, 21(5), 767-781.

142) Robinson, T. J., Quinlivan, T. D., y Baxter, C. (1968). The relationship between dose of progestagen and method of preparation of intravaginal sponges on their effectiveness for the control of ovulation in the ewe. *J Reprod Fertil*, 17(3), 471-483.

143) Robles, C. (2004). *Salud reproductiva del carnero*. (INTA, Ed.) (Primera ed.). Argentina.

144) Rosenfeld, C. R., Killam, A. P., Battaglia, F. C., Makowski, E. L., y Mesghia, G. (1973). Effect of estradiol-17, β on the magnitude and distribution of uterine blood flow in nonpregnant, oophorectomized ewes. *Pediatric research*, 7(3), 139-148.

145) Rubianes, E. (2000). *Ondas de desarrollo folicular y respuesta ovárica en la oveja: niveles hormonales y evaluación ultrasonográfica*. Universidad de la República, República Oriental del Uruguay.

146) Rubianes, E., Beard, A., Dierschke, D. J., Bartlewski, P., Adams, G. P., y Rawlings, N. C. (1997). Endocrine and ultrasound evaluation of the response to PGF 2alpha and GnRH given at different stages of the luteal phase in cyclic ewes. *Theriogenology*, 48(7), 1093-1104.

147) Rubianes, E., de Castro, T., y Carbajal, B. (1996). Effect of high progesterone levels during the growing phase of the dominant follicle of wave 1 in ultrasonically monitored ewes. *Canadian Journal of Animal Science*, 76(3), 473-475. doi:10.4141/cjas96-071

148) Rubianes, E., y Menchaca, A. (2003). The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats. *Animal Reproduction Science*, 78(3), 271-287. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00095-2

149) Rubianes, E., Menchaca, A., y Carbajal, B. (2003). Response of the 1–5 day-aged ovine corpus luteum to prostaglandin F2 α . *Animal Reproduction Science*, 78(1), 47-55.

150) Russel, A. J. F., Doney, J. M., y Gunn, R. G. (1969). Subjective assessment of body fat in live sheep. *The Journal of Agricultural Science*, 72(3), 451-454.

- 151) Salomón, S., Maxwell, W. M. C., y Evans, G. (1990). Inseminación artificial de Ovejas y Cabras. *Acriba. España*, 1-171.
- 152) Saravia, C., y Cruz, G. (2003). Influencia del ambiente atmosférico en la adaptación y producción animal. *Montevideo, Universidad de la Republica*.
- 153) Sari, Ika P., Rao, Alexandra, Smith, Jeremy T., Tilbrook, Alan J., y Clarke, Iain J. (2009). Effect of RF-amide-related peptide-3 on luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone synthesis and secretion in ovine pituitary gonadotropes. *Endocrinology*, 150(12), 5549-5556.
- 154) SAS Institute. (2015). *Base SAS 9.4 procedures guide*. SAS Institute.
- 155) Senger, P. L. (2006a). *Pathways to Pregnancy and Parturition*. (Inc. Current Conceptions, Ed.). Washington, USA.
- 156) Senger, P. L. (2006b). Regulation of Reproduction-Nerves, Hormones and Target Tissues. En Inc. Current Conceptions (Ed.), *Pathways to pregnancy and parturition* (pp. 102-127). Washington, USA.
- 157) Senger, P. L. (2006c). Reproductive Cyclicity - The Follicular Phase. En Inc Current Conceptions (Ed.), *Pathways to pregnancy and parturition* (pp. 164-186). Washington, USA.
- 158) Senger, P. L. (2006d). Reproductive Cyclicity - The Luteal Phase. En Inc Current Conceptions (Ed.), *Pathways to pregnancy and parturition* (pp. 187-210). Washington, USA.
- 159) Simonetti, L. (2008, octubre 15). *Simplificación de los métodos de superovulación en ovejas de la raza Corriedale*. *Riunet*. Universitat Politècnica de València, Valencia (Spain).
- 160) Smeaton, T. C., y Robertson, H. A. (1971). Studies on the growth and atresia of Graffian follicles in the ovary of the sheep. *J Reprod Fertil*, 25(2), 243-252. doi:10.1530/jrf.0.0250243
- 161) Smith, J. T., Ross Young, I., Veldhuis, J. D., y Clarke, I. J. (2012). Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) secretion into the ovine hypophyseal portal system. *Endocrinology*, 153(7), 3368-3375.

- 162) Soto, A. T. (2011). *Origen y migración de las neuronas GnRH en el bovino (Bos taurus)*. Universidad Nacional de La Plata.
- 163) Soto, A. T., Gómez, M. V, y Pastorelli, V. (2015). Sincronización de celos con un esquema corto e inseminación artificial (IATF) utilizando dos momentos diferentes de aplicación de PGF2alfa en ovejas Pampinta durante la estación reproductiva. En Aleprycs (Ed.), *IX Congreso Latinoamericano de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos*. Argentina.
- 164) Southcott, W. H., Braden, A. W. H., y Moule, G. R. (1962). Synchronization of oestrus in sheep by orally active progesterone derivative. *Australian Journal of Agricultural Research*, 13(5), 901-906.
- 165) Souza, C. J., Campbell, B. K., y Baird, D. T. (1997). Follicular dynamics and ovarian steroid secretion in sheep during the follicular and early luteal phases of the estrous cycle. *Biol Reprod*, 56(2), 483-488.
- 166) Souza, C. J. H., MacDougall, C., Campbell, B. K., McNeilly, A. S., y Baird, D. T. (2001). The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1 B (BMPRI1B) gene. *Journal of Endocrinology*, 169(2), R1.
- 167) Spitzer, J. C., y Carpenter, R. H. (1981). Estrus and pregnancy rates following synchronization with chronolone intravaginal sponge or norgestomet ear implant in cycling ewes. *Theriogenology*, 16(3), 287-294.
- 168) Stellflug, J. N., Weems, Y. S., y Weems, C. W. (1997). Clinical reproductive physiology of ewes. *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. Youngquist RS ed. WB Saunders, Philadelphia, 594-598.
- 169) Takada, L., Bicudo, S. D., Rodrigues, C. F., Coelho, Li, y Venturolli Perri, S. (2009). Sincronização do estro e da ovulação utilizando protocolos de curta duração durante a pré-estação reprodutiva em ovelhas Suffolk. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 31(4), 453-460.

doi:10.4025/actascianimsci.v31i4.6938

170) Tilbrook, A. J., Turner, A. I., y Clarke, I. J. (2002). Stress and Reproduction: Central Mechanisms and Sex Differences in Non-rodent Species . *Stress*, 5(2), 83-100.

doi:10.1080/10253890290027912

171) Tsutsui, K., Saigoh, E., Ukena, K., Teranishi, Hi, Fujisawa, Y., Kikuchi, M., ... Sharp, P. J. (2000). A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochemical and biophysical research communications*, 275(2), 661-667.

172) Ubuka, T., Bentley, G. E., Ukena, K., Wingfield, J. C., y Tsutsui, K. (2005). Melatonin induces the expression of gonadotropin-inhibitory hormone in the avian brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(8), 3052-3057.

173) Ubuka, T., Inoue, K., Fukuda, Y., Mizuno, T., Ukena, K., Kriegsfeld, L. J., y Tsutsui, K. (2012). Identification, expression, and physiological functions of Siberian hamster gonadotropin-inhibitory hormone. *Endocrinology*, 153(1), 373-385.

174) Ubuka, T., Son, Y. L., Tobar, Y., y Tsutsui, K. (2012). Gonadotropin-inhibitory hormone action in the brain and pituitary. *Frontiers in endocrinology*, 3, 148.

175) Ungerfeld, R. (2008). Response of anoestrous ewes pre-treated with a single dose of oestradiol-17 β , or progesterone and oestradiol-17 β , to the introduction of rams and ewes in oestrus. *New Zealand Veterinary Journal*, 56(1), 36-39. doi:10.1080/00480169.2008.36802

176) Ungerfeld, R. (2009). The induction of oestrus in ewes during the non-breeding season using pre-used CIDRs and oestradiol-17 β treatment. *Small Ruminant Research*, 84(1), 129-131. doi:<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.06.011>

177) Ungerfeld, R., y Rubianes, E. (1999). Effectiveness of short-term progestogen primings for the induction of fertile oestrus with eCG in ewes during late seasonal anoestrus. *Animal Science*, 68(03), 349-353.

178) Ungerfeld, R., y Rubianes, E. (2002). Short term primings with different progestogen

intravaginal devices (MAP, FGA and CIDR) for eCG-estrous induction in anestrus ewes. *Small Ruminant Research*, 46(1), 63-66. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0921-4488\(02\)00105-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0921-4488(02)00105-0)

179) Uribe-Velásquez, L. F., Correa-Orozco, A., y Osorio, J. H. (2009). Características del crecimiento folicular ovárico durante el ciclo estral en ovejas. *Revista Biosalud*, 8(1), 117-131.

180) Uribe-Velásquez, L. F., Gutiérrez Toro, C., Carreño Ortiz, E. E., Izquierdo Jiménez, J. H., Lenz Souza, M. A., y Botero, S. A. (2011). Reutilización del dispositivo de progesterona (CIDR) asociado con protocolos de corta duración en cabras. *vet.zootec.*, 5(1), 39-46.

181) Valenzuela Jiménez, N., Hernández Cerón, J., Murcia Mejía, C., Rodríguez Maltos, R., y Gutiérrez, C. G. (2004). Efecto del benzoato de estradiol en la presentación del pico preovulatorio de LH, momento de ovulación y fertilidad en cabras sincronizadas con acetato de melengestrol. *Agrociencia*, 38(6), 603-611.

182) Valtorta, S., y Gallardo, M. (1996). El estrés por calor en producción lechera. *Miscelánea*, 81, 173-185.

183) Van Cleeff, J., Lucy, M. C., Wilcox, C. J., y Thatcher, W. W. (1992). Plasma and milk progesterone and plasma LH in ovariectomized lactating cows treated with new or used controlled internal drug release devices. *Animal Reproduction Science*, 27(2-3), 91-106.

184) Vilariño, M., Cuadro, F., dos Santos-Neto, P. C., García-Pintos, C., y Menchaca, A. (2017). Time of ovulation and pregnancy outcomes obtained with the prostaglandin-based protocol Synchrovine for FTAI in sheep. *Theriogenology*, 90(Supplement C), 163-168. doi:<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.12.003>

185) Vilariño, M., Menchaca, A., dos Santos, E., y Rubianes, E. (2007). Respuesta estral obtenida con el uso de PGF2alfa asociado a los tratamientos cortos con progesterona en ovejas ciclando. En *VII Simposio Internacional de Reproducción Animal*. Córdoba, Argentina.

186) Vilariño, M., Pinczak, A., y Menchaca, A. (2007). Tasa de preñez y fecundidad obtenida con un tratamiento corto vs un tratamiento largo asociado a IATF por laparoscopia en ovejas

en anestro. En *VII Simposio Internacional de Reproducción Animal*. Córdoba, Argentina.

187) Vilariño, M., Rubianes, E., y Menchaca, A. (2011). Re-use of intravaginal progesterone devices associated with the Short-term Protocol for timed artificial insemination in goats.

Theriogenology, 75(7), 1195-1200. doi:<http://10.1016/j.theriogenology.2010.11.030>

188) Vilariño, M., Rubianes, E., y Menchaca, A. (2013). Ovarian responses and pregnancy rate with previously used intravaginal progesterone releasing devices for fixed-time artificial

insemination in sheep. *Theriogenology*, 79(1), 206-210.

doi:<http://10.1016/j.theriogenology.2012.10.007>

189) Vilariño, M., Rubianes, E., van Lier, E., Menchaca, A., van Lier, E., Menchaca, A., ...

Menchaca, A. (2010). Serum progesterone concentrations, follicular development and time of ovulation using a new progesterone releasing device (DICO®) in sheep. *Small Ruminant*

Research, 91(2-3), 219-224. doi:<http://10.1016/j.smallrumres.2010.02.014>

190) Viñoles, C. (2011). Avances en la sincronización de celo y ovulación en las ovejas.

Spermova, 1(1), 95-97.

191) Viñoles, C., Forsberg, M., Banchemo, G., Rubianes, E., Viñoles, C; Forsberg, M; Banchemo, G; y Rubianes, E. (2001). Effect of long-term and short-term progestagen treatment

on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. *Theriogenology*, 55(4), 993-1004.

doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00460-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00460-5)

192) Viñoles, C., Meikle, A., Forsberg, M., y Rubianes, E. (1999). The effect of subluteal levels of exogenous progesterone on follicular dynamics and endocrine patterns during the early

luteal phase of the ewe. *Theriogenology*, 51(7), 1351-1361.

193) Wheaton, J. E., Carlson, K. M., Windels, H. F., y Johnston, L. J. (1993). CIDR: A new progesterone-releasing intravaginal device for induction of estrus and cycle control in sheep

and goats. *Animal Reproduction Science*, 33(1), 127-141. doi:[http://10.1016/0378-4320\(93\)90111-4](http://10.1016/0378-4320(93)90111-4)

- 194) Wildeus, S. (2000). Current concepts in synchronization of estrus: Sheep and goats. *Journal of Animal Science*, 77(E-Suppl), 1. doi:10.2527/jas2000.00218812007700ES0040x
- 195) Yoshida, H., Habata, Y., Hosoya, M., Kawamata, Y., Kitada, C., y Hinuma, S. (2003). Molecular properties of endogenous RFamide-related peptide-3 and its interaction with receptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1593(2-3), 151-157.
- 196) Zuccolilli, G. O., Hamada, T., Ichikawa, M., y Mori, Y. (1994). Sexual dimorphism of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the goat hypothalamus. *Journal of Reproduction and Development*, 40(1), 27-32.

BIOGRAFÍA

La médica veterinaria María Verano Gómez nació en la Ciudad de La Plata, el 9 de octubre de 1971. Cursó sus estudios primarios y secundarios en la Escuela Normal Nacional Superior N° 1 “Mary O. Graham”, en la misma ciudad, recibiendo el título secundario de Bachiller con Orientación Biológica en el año 1989. Al año siguiente ingresó a la Facultad de Ciencia Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata egresando el 18 de diciembre de 1998 como Médica Veterinaria. En el año 2008 obtiene el título de Docente Universitario Autorizado, otorgado por la UNLP, y posteriormente en el año 2009 obtuvo el título de Especialista en Entornos Virtuales de Aprendizaje, título otorgado por Virtual Educa Argentina, Organización de Estados Iberoamericanos para la Educación, la Ciencia y la Cultura y Centro de Altos Estudios Universitarios. En el año 2015, obtuvo el título de Especialista en Docencia Universitaria de la Universidad Nacional de La Plata.

En el año 1998 ingresó como Ayudante Alumna de la Cátedra y el Servicio de Reproducción Animal, y a partir del año 1999 comenzó a desempeñarse como Auxiliar Diplomado rentado con dedicación exclusiva interina hasta el año 2014 cuando concursó y obtuve el cargo ordinario el cual mantiene hasta la actualidad. Durante el período 2014-2018 se desempeñó como Secretaria de Asuntos Estudiantiles con funciones de gestión con dedicación exclusiva. A partir del año 2017 se desempeña el cargo de Profesora Adjunta rentada simple interino en la Cátedra de Producción Ovina y Caprina.

En el año 1999 comienza a participar en proyectos de investigación y es categorizada como docente-investigador categoría V, y posteriormente en el año 2005 es promovida a la categoría IV. Participó en seis proyectos de investigación y durante el período 2018-2019 fue directora del Proyecto Promocional de Investigación y Desarrollo PPID V013 Uso de benzoato de estradiol en un protocolo corto de sincronización de ovulaciones en ovinos: concentración y

momento de aplicación. Desde el año 2013, participó y codirigió seis proyectos del área de Extensión Universitaria.

Una vez finalizado este trabajo de tesis continuará realizando tareas de docencia, investigación y extensión en el Instituto de Investigaciones en Reproducción Animal, y en las Cátedras de Reproducción Animal y de Producción Ovina y Caprina de esta Facultad.