



UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**RESPUESTA OVÁRICA Y FERTILIDAD OBTENIDA CON DIFERENTES
CONCENTRACIONES SÉRICAS DE PROGESTERONA INDUCIDAS CON LA
REUTILIZACIÓN DE DISPOSITIVOS INTRAVAGINALES EN CABRAS Y
OVEJAS**

Marcela VILARIÑO PEREDA

TESIS DE MAESTRÍA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2012**



UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**RESPUESTA OVÁRICA Y FERTILIDAD OBTENIDA CON DIFERENTES
CONCENTRACIONES SÉRICAS DE PROGESTERONA INDUCIDAS CON LA
REUTILIZACIÓN DE DISPOSITIVOS INTRAVAGINALES EN CABRAS Y
OVEJAS**

Marcela VILARIÑO PEREDA

Alejo MENCHACA BARBEITO – Director de tesis

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2012**

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS

**Elsa Garófalo; Q.F., MSc., PhD.
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República – Uruguay**

**Rodolfo Luzbel de la Sota; DMV, MSc., PhD.
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional de la Plata - Argentina**

**Elize Van Lier; DMV, MSc., PhD.
Facultad de Agronomía
Universidad de la República – Uruguay**

ACTA DE DEFENSA DE TESIS



FACULTAD DE VETERINARIA
Programa de Posgrados

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

DE MAESTRÍA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL

“Respuesta ovárica y fertilidad obtenida con diferentes concentraciones séricas de progesterona inducidas con la reutilización de dispositivos intravaginales en cabras y ovejas”

Por: Dra. Marcela Vilarriño Pereda
Director de Tesis: Dr. Alejo Menchaca

Tribunal

Presidente: Dra. Elsa Garófalo

Segundo Miembro: Dr. Luzbel de la Sota

Tercer Miembro: Dra. Elize Van Lier

Fallo del Tribunal:

Aprobada con Mención

Montevideo, 3 de octubre de 2012

INFORME DEL TRIBUNAL



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA
Postgrados Académicos y Especializaciones

FUNDAMENTACIÓN

RESPUESTA OVÁRICA Y FERTILIDAD OBTENIDA CON DIFERENTES CONCENTRACIONES SÉRICAS DE PROGESTERONA INDUCIDA CON LA REUTILIZACIÓN DE DISPOSITIVOS INTRAVAGINALES EN CABRAS Y OVEJAS

Dra. Marcela Vilariño (DCV)

Tesis de Maestría en Reproducción Animal

El Tribunal considera que la Dra. Marcela Vilariño ha realizado una Tesis de Maestría que aporta conocimiento original sobre la respuesta ovárica y la fertilidad a través de la reutilización de dispositivos intravaginales en programas de sincronización y IATF en cabras y ovejas. Los resultados de las tesis han generado dos publicaciones en la revista *Theriogenology* en 2011 y 2012, en las que la tesista es primer autor.

El tribunal ha señalado que el trabajo escrito presenta aspectos a ser corregidos y en acuerdo con la tesista y su director de tesis, dichas correcciones serán incorporadas en la versión final de la tesis.

La Dra. Marcela Vilariño realizó una presentación oral clara y concisa y en cuanto a la defensa respondió con solvencia a las preguntas del Tribunal y en acuerdo con las observaciones planteadas.

En suma, el Tribunal considera que la Dra. Marcela Vilariño ha realizado un trabajo de Tesis de Maestría muy bueno, por lo que ha merecido la calificación Aprobado con Mención.


Prof. Dra. Elsa G. Garófalo
Presidenta del Tribunal

Montevideo 3 de Octubre de 2012

LISTA DE ABREVIATURAS

CIDR: controlled internal drug release

CL: cuerpo lúteo

eCG: gonadotropina coriónica equina

FSH: hormona folículo estimulante

GnRH: hormona liberadora de gonadotropina

IA: inseminación artificial

IATF: inseminación artificial a tiempo fijo

LH: hormona luteinizante

PGF 2α : prostaglandina F 2α

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis fue un trabajo realizado en el Laboratorio de Fisiología de la Reproducción de la Facultad de Veterinaria y en la Fundación IRAUy, donde el apoyo colectivo de todos los integrantes de ambos lugares fue fundamental para que se pueda llevar a cabo. Los trabajos de campo fueron realizados en los Establecimientos Caprinos “La Chacra” y “Bohemia”, ubicados en la ciudad de Canelones, y en el Establecimiento “La Torcaza” en Salto. El apoyo financiero para la realización de los experimentos provino de PFIZER Brasil y fue ejecutado en colaboración con FUNDACIBA. Para el desarrollo de esta tesis tuve el apoyo de una beca de Maestría de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII).

Me gustaría expresar mi especial agradecimiento:

A Alejo Menchaca, mi tutor y orientador en mi vida académica, por su apoyo durante todos estos años.

A Edgardo Rubianes, por ayudarme a llevar adelante esta tesis y por ser el “padre” de este grupo de trabajo al cual pertenezco.

A Teresa de Castro y Andrea Pinczak, compañeras de trabajo, amigas, personas con las que siempre se puede contar y tienen algo bueno para dar.

A los integrantes de la Fundación IRAUy que se fueron uniendo a lo largo de estos años: Richard Núñez, Pedro dos-Santos Neto, Robert Wijma, Camila García Pintos; por querer acompañar este proyecto que fue hecho con mucho esfuerzo y cariño.

A Martina Crispo, por su apoyo y colaboración para poder seguirme formando.

A la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación del Institut Pasteur de Montevideo por el apoyo y colaboración para poder seguir trabajando.

A todos los que han colaborado en el desarrollo de esta tesis, fundamentalmente al Laboratorio de Fisiología de la Reproducción. A Milton Pintos en el manejo y cuidado de los animales; a Rodolfo Ungerfeld por su colaboración con la estadística y por la buena disposición para compartir el laboratorio para poder desarrollar los experimentos; a Silvana González, Solana Gonzáles, Alejandra Ramos por su colaboración en los experimentos; a Ana Ferreira (Publicación I) y María Laura Núñez (Publicación II) por su colaboración para realizar estos trabajos; a Elize Van Lier por las determinaciones de progesterona; a José Piaggio por su paciencia, su buena energía y sus ganas de colaborar con los análisis estadísticos; a los propietarios de los establecimientos Yamandú Costa (La Chacra) y Fernando Aldama (Bohemia): al Tano Bianchi por poner a disposición el establecimiento “La Torcaza” para realizar un experimento.

A Geraldine Schlapp, Paula Arévalo, Magdalena Cárdenas y Lucía Goyeneche; por la amistad y los buenos momentos que compartimos y seguiremos compartiendo.

A mis amigas de la vida: María, Cori, Mariana, Maite, Mauge, Mariela, Maia, Lucía, María Lucía; que son fundamentales en mi vida.

A mis padres (Pepe e Inés); Marian y Rodri; mis abuelos (Manuel y María) y la chacra (La Juanita). Para mí son una familia increíble, completa y que me gustaría repetir.

A toda mi familia y amigos, que son únicos y divinos.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS -----	i
1. RESUMEN -----	1
2. INTRODUCCIÓN -----	3
2.1 Ciclo estral de la oveja y la cabra-----	4
2.2 Desarrollo folicular en ondas-----	5
2.3 Progesterona y desarrollo folicular-----	7
2.4 Sincronización de la ovulación: Tratamientos con Progesterona-----	8
2.5 Inseminación Artificial-----	11
3. CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA -----	12
4. HIPÓTESIS -----	13
5. OBJETIVOS -----	13
5.1 Objetivo General-----	13
5.2 Objetivos Específicos-----	13
6. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN -----	14
7. MATERIALES Y MÉTODOS -----	15
8. RESULTADOS -----	19
9. DISCUSIÓN -----	27
10. CONCLUSIONES GENERALES -----	30
11. REFERENCIAS -----	31
12. PUBLICACIONES -----	37

Publicación I: Re-use of intravaginal progesterone devices associated with the Short-term Protocol for timed artificial insemination in goats.

Publicación II: Ovarian responses and pregnancy rate with previously used intravaginal progesterone releasing devices for fixed-time artificial insemination in sheep.

1. RESUMEN

Los Tratamientos Cortos consisten en 5-6 días de exposición a progesterona asociado a una dosis de prostaglandina F2 α y gonadotrofina coriónica equina. Con el desarrollo de estos tratamientos para la sincronización de la ovulación en pequeños rumiantes, surge la posibilidad de que los dispositivos liberadores de progesterona –diseñados para tratamientos de 11 a 14 días- contengan progesterona remanente después de su uso, y que puedan ser nuevamente utilizados. A partir de esta hipótesis se plantearon cuatro experimentos diseñados para estudiar el efecto de la reutilización de dispositivos intravaginales con progesterona (CIDR-G), estableciendo las concentraciones séricas de progesterona, el desarrollo folicular, la respuesta ovulatoria y la fertilidad en caprinos y ovinos.

Se utilizaron CIDR-G de primer uso (dispositivos nuevos), segundo uso (previamente utilizados por 5-6 días) o tercer uso (previamente utilizados dos veces por 5-6 días). En dos de los experimentos realizados (uno en ovinos y otro en caprinos) se realizó el monitoreo diario -o cada 12 horas próximo a la ovulación- del desarrollo folicular; se determinaron las concentraciones séricas de progesterona en muestras tomadas diariamente o con mayor frecuencia en los momentos de inserción y retiro de los dispositivos; y se detectó el comportamiento estral. Con el objetivo de evaluar la fertilidad obtenida con los CIDR-G reutilizados se hicieron los mismos grupos experimentales y se realizó inseminación artificial a tiempo fijo con semen fresco por vía cervical (en caprinos) e intrauterina (en ovinos). A los 30-40 días de la inseminación se realizó el diagnóstico gestacional por ultrasonografía transrectal. Las concentraciones séricas de progesterona inducidas con los dispositivos de primer uso fueron mayores que las inducidas con dispositivos reutilizados tanto en caprinos como en ovinos. Sin embargo, aún con los dispositivos reutilizados los valores alcanzados en cada hembra fueron mayores a 4,0 nmol/L (~1,3 ng/mL). Con los dispositivos de primer uso se indujo la emergencia de una nueva onda folicular en el 100% de las hembras, mientras que con los dispositivos de segundo y tercer uso la emergencia de una nueva onda folicular se produjo en el 80% de los animales (P: NS). El Tratamiento Corto -tanto con dispositivos nuevos como reutilizados- permitió que una alta proporción de las ovejas alcanzara la ovulación (90%) a las ~66 horas de finalizado el tratamiento. La tasa de preñez en general fue elevada -superior al 60%- considerando que fue alcanzada mediante tiempo fijo, tanto en caprinos como en ovinos. Sin embargo, en los animales con bajas concentraciones de progesterona (dispositivos de tercer uso), hubo un efecto negativo sobre la fertilidad obtenida. Estos resultados sugieren que la fertilidad en pequeños rumiantes se ve disminuida en la medida que bajan las concentraciones circulantes de progesterona. Posiblemente dicho resultado pueda estar vinculado a un menor recambio folicular con la consecuente ovulación en cierta proporción de los animales de un folículo persistente.

En suma, a partir de estos experimentos se confirma la eficacia de los Tratamientos Cortos para sincronizar la ovulación en ovinos y caprinos; demostrando que utilizando estos tratamientos es posible la reutilización de los dispositivos liberadores de progesterona hasta tres veces alcanzando resultados aceptables; y particularmente se muestra que en la medida que bajan las concentraciones de progesterona se afecta la tasa de preñez.

Palabras clave: CIDR-G; Ultrasonografía; Inseminación Artificial a Tiempo Fijo; Ovinos, Caprinos

ABSTRACT

The Short-term Protocol consists of 5-6 days of exposure to progesterone associated with a dose of prostaglandin F2 α and a dose of equine chorionic gonadotropin. The intravaginal progesterone-releasing devices (0.3 g of progesterone) could contain remaining progesterone after a Short-term Protocol. Four experiments were designed to study the effects of the reused devices (CIDR-G) in the serum progesterone concentrations, follicular development, ovulatory response and fertility in goats and sheep. The experimental design consisted of the use of CIDR-G of first use (new devices), second use (previously used for 5-6 days) or third use (previously used twice for 5-6 days) associated with the Short Term Protocol in goats and sheep. In each species (experiment 1 and 3) daily ultrasonography -or every 12 hours close to ovulation- was performed to assess follicular development, daily blood samples for progesterone determination by radioimmunoassay were taken and estrous behavior was detected. In order to evaluate the fertility, in experiment 2 (goats) and 4 (sheep) females were subjected to a Short-term Protocol associated with reused devices followed by fixed timed artificial insemination (FTAI) with fresh semen via cervical (in goats) or intrauterine (in sheep) insemination. Pregnancy rate was determined 30-40 days after insemination by transrectal ultrasonography. Serum progesterone concentrations induced by first use CIDR-G were higher than second and third use devices in both, sheep and goats. A new follicular wave was induced in 100% of the females with first use devices, while only 80% of the females ovulated from a new follicular wave when second and third use devices were used. This protocol allowed an adequate follicular control resulting in a high pregnancy rate, over 60% - through FTAI- with new and reused devices. However, in the females with low serum progesterone concentrations it was a diminished in fertility. These results support the hypothesis that low progesterone concentrations may be affecting follicular turnover, and thus fertility in small ruminants. In conclusion, these series of experiments demonstrated that Short-term Protocol associated with reused devices is effective to synchronize ovulation in sheep and goats. Moreover, reuse of CIDR-G associated with Short-term Protocol resulted in an acceptable pregnancy rate.

Keywords: CIDR-G; Ultrasonography; Timed Artificial insemination; Ovine; Caprine.

2. INTRODUCCIÓN

La producción de pequeños rumiantes en nuestro país es un área con grandes posibilidades de desarrollo tanto por sus características productivas como por su demanda a nivel nacional e internacional. La evolución del stock ovino en Uruguay disminuyó de 12 a 7,5 millones de cabezas en los últimos 10 años (SUL, 2012). Por otra parte, en el escenario internacional hay una gran demanda de carne ovina debido a una disminución en la producción mundial. En el caso de la lana la situación actual es similar. Asimismo, la población caprina se ha mantenido constante en los últimos 10 años en nuestro país, con pocas posibilidades de desarrollar esta producción (FAO, 2012). Esta especie se utiliza para la producción de leche y quesos. Este subproducto le da a la leche un valor agregado muy alto. Las cabras lecheras pueden ser explotadas de forma intensiva, no obstante la producción por lo general es en rebaños semi-intensivos.

Las técnicas de reproducción asistida en pequeños rumiantes han tenido un importante desarrollo en los últimos 30 años, siendo probablemente la sincronización del estro y la inseminación artificial las dos tecnologías con más impacto a nivel mundial, debido a su bajo costo y su fácil aplicación. El uso de los programas de inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) en cabras y ovejas constituye una gran ventaja para el manejo reproductivo de un establecimiento comercial, gracias a la posibilidad de eliminar la necesidad de la detección de celos. Esta alternativa permite optimizar el uso de recursos humanos, un mayor control en el manejo reproductivo y facilita el trabajo técnico dentro de una inseminación. El éxito en una IATF radica fundamentalmente en conocer el momento preciso de ovulación, y este momento está determinado por el tratamiento hormonal utilizado y el estado ovárico al inicio del tratamiento. Por lo tanto, el diseño de un sistema de sincronización de la ovulación eficiente se basa en el conocimiento de las bases biológicas de la dinámica folicular ovárica y de la regresión del cuerpo lúteo.

La incorporación de la ultrasonografía y del radioinmunoanálisis ha permitido generar un importante avance en el estudio de la fisiología ovárica de diferentes especies. La ultrasonografía transrectal fue utilizada para el estudio de la fisiología ovárica en rumiantes por primera vez en vacas (Pierson y Ginther, 1984; Sirois y Fortune, 1988). Esto dio lugar a nuevo conocimiento que permitió definir y/o modificar conceptos importantes vinculados a la foliculogénesis, como la existencia de ondas de desarrollo folicular (Savio y col., 1988; Sirois y Fortune, 1988). Recién en la década de los 90 la ultrasonografía fue aplicada al estudio ovárico en ovinos y caprinos, permitiendo determinar que estas especies presentan también un crecimiento folicular en ondas (Ginther y Kot., 1994; Ginther y col., 1995). El uso de la ultrasonografía ovárica asociado a mediciones hormonales, ha permitido el desarrollo de nuevos tratamientos farmacológicos que incrementan la eficiencia de las técnicas de reproducción asistida en especies domésticas como la vaca, la oveja y la cabra (Bó y col., 2003; Baruselli y col., 2004; Menchaca y Rubianes, 2004).

Los tratamientos tradicionales para la sincronización del estro consisten en el uso de dispositivos intravaginales de progesterona y sus análogos (progestágenos). Éstos tienen un papel inhibitorio sobre la actividad del eje hipotálamo-hipofisario, de esta manera es

que la fase folicular se ve bloqueada y luego de retirar los dispositivos se desencadena y resulta en la manifestación del estro y la ovulación. La duración de los tratamientos tradicionales fue variando debido a que al principio se pretendía simular la vida media del cuerpo lúteo. Por lo tanto el dispositivo de progestágeno se mantenía en la vagina durante 14-15 días en ovejas y 17-19 días en cabras (Robinson, 1965). Más adelante, la duración de los tratamientos se redujo a 11-12 días y se asoció una dosis de prostaglandina F₂α (PGF₂α) previo al retiro del dispositivo (Corteel y col., 1988; Leyva y col., 1998). Cuando los tratamientos se aplican durante el anestro estacional es necesario asociar el progestágeno a una gonadotropina al momento de retirar el dispositivo, la más utilizada es la gonadotropina coriónica equina (eCG).

Como alternativa a los Tratamientos Tradicionales, y gracias a la información en fisiología ovárica generada en los últimos años surge un tratamiento alternativo en pequeños rumiantes: Tratamiento Corto con progesterona (Rubianes, 1998). Este tratamiento incorpora parte de la información generada, así como permite un protocolo de fácil aplicación. Se basa en la aplicación de un progestágeno por 5 a 7 días asociado a la administración de eCG y PGF₂α al momento de retirar el dispositivo. Utilizar estos Tratamientos Cortos asociados a dispositivos liberadores de progesterona que fueron diseñados para un período de tiempo mayor (12 a 14 días), permite plantear la posibilidad de reutilizar estos dispositivos. Si bien el objetivo en el avance de los tratamientos de sincronización generalmente se focaliza en mejorar las tasas de preñez, es relevante destacar la importancia de disminuir los costos de dichos tratamientos para lograr así una mayor adopción de los mismos.

2.1 Ciclo estral de la oveja y la cabra

Tanto los ovinos como los caprinos presentan una actividad reproductiva poliéstrica estacional, regulada principalmente por las horas de luz de cada día. Esta estacionalidad se explica básicamente por la acción de la hormona melatonina, que es sintetizada a partir del neurotransmisor serotonina y se produce en la glándula pineal. El proceso de liberación de melatonina es un proceso de fototransducción donde la exposición a la luz regula la liberación de esta hormona, que se libera durante la noche. Al disminuir las horas de luz de cada día, aumenta la liberación de melatonina que en la cabra y en la oveja estimula la liberación de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) del hipotálamo. Cambios en la liberación de GnRH provocan cambios correspondientes en la secreción de hormona luteinizante (LH), que son responsables del desarrollo folicular, la ovulación y el desarrollo del cuerpo lúteo (Błaszczuk y col., 2004). La estacionalidad reproductiva también se ve afectada por factores genéticos y ambientales, y es importante destacar que constituye un factor limitante para la producción de estas especies. Es por esto que el desarrollo de herramientas como los tratamientos de inducción del estro (Scaramuzzi y col., 1980) y el efecto macho (revisado por Ungerfeld y col., 2004) han cobrado gran importancia en los últimos años.

El ciclo estral de la cabra y de la oveja tienen una duración de 21 (rango: 19 a 23 días) y 17 (rango: 15 a 19 días) días, respectivamente. Este ciclo presenta una fase folicular relativamente corta (3-4 días) y una fase luteal que se extiende desde el día 0 (día 0: ovulación) hasta el día 16-18 en la cabra y 13-15 en la oveja. Luego de esta fase luteal,

la $PGF2\alpha$ secretada por el útero, induce en la hembra no gestante la regresión del cuerpo lúteo, un descenso en la concentración plasmática de progesterona, una disminución en la inhibición del eje hipotálamo-hipofisario y la posterior ovulación. El estro tiene una duración de 18 a 72 horas y de 16 a 50 horas en ovejas y cabras, respectivamente. Esta variación se puede explicar por la edad, raza, situación geográfica y contacto con machos (Evans y Maxwell, 1990).

La fase luteal comienza con la ovulación, y al inicio de esta etapa hay una elevada frecuencia en la pulsatilidad de LH, que incrementa el número y actividad de células luteales, este proceso se conoce como *luteinización*. Las células luteales son responsables de las altas concentraciones de progesterona durante este período. Las concentraciones de progesterona alcanzan su valor máximo después de unos seis días de la ovulación y en las hembras no gestantes comienzan a disminuir transcurridos unos 13-14 días en la cabra y 11-12 días en la oveja. La progesterona suprime la pulsatilidad de GnRH inhibiendo la pulsatilidad de LH (Thiery y Martin, 1991; Smith y col, 1993). La LH es la hormona responsable del crecimiento de los folículos luego de que alcanzan un determinado diámetro. Por lo tanto, la inhibición de la secreción de esta hormona induce la regresión de los folículos mayores a 5 mm, lo que permite la emergencia de una nueva onda de crecimiento folicular. Después de ocurrida la luteólisis, los folículos dominantes continúan su crecimiento, y son los responsables de la secreción de estrógeno que determina el comportamiento estral y también generan una retroalimentación positiva a nivel central con un incremento en la pulsatilidad de LH (Mc Neilly y col 1991). Esto determina que el folículo continúe su crecimiento liberando mayor cantidad de estrógeno que induce un pico de GnRH generando el pico preovulatorio de LH (Campbell y col, 1995). El pico de LH ocurre entre las 8 y 18 horas de iniciado el estro. Luego de 18-24 horas del pico de LH se produce la ovulación de los folículos que alcanzaron un diámetro mayor a 5mm (Evans y Maxwell, 1990).

El estro se define como el período durante el cual la hembra manifiesta un comportamiento de actividad sexual y donde acepta la monta del macho. Los estrógenos secretados por los folículos ovulatorios son los responsables de los cambios anatómicos y comportamentales en esta etapa del ciclo estral. Durante el estro existe un incremento del flujo sanguíneo y de la actividad secretora en las glándulas del útero, cervix y vagina. La vulva y la vagina se encuentran congestionadas y aparece abundante secreción de mucus que varía a lo largo del período estral. La manifestación del estro es más marcada en cabras que en ovejas. Los signos más característicos del comportamiento estral en caprinos son inquietud, elevación constante del rabo, frotamiento continuo con el macho y comportamiento homosexual montando a otras hembras del rebaño. En las ovejas, la hembra permite la monta del macho. En ambas especies el único signo que debe ser interpretado como presencia de estro es la aceptación de la hembra a ser montada por el macho (Evans y Maxwell, 1990).

2.2 Desarrollo folicular en ondas

El desarrollo de información vinculada a la fisiología ovárica en diferentes especies en los últimos años estuvo dado por la incorporación de la ultrasonografía para el estudio del desarrollo folicular y del cuerpo lúteo. Mediante la ultrasonografía fue posible el

estudio de la dinámica ovárica durante períodos prolongados ya que representa un método poco invasivo (Sirois y Fortune, 1988; Ginther y y Kot, 1994; Ginther y col., 1995).

El uso de la ultrasonografía permitió elucidar que las vacas tienen un crecimiento folicular en ondas y que éste se produce en tres fases (reclutamiento, selección y dominancia) (Lucy y col., 1992). Posteriormente, se desarrolló la técnica de ultrasonografía para el estudio de ovarios en ovinos y caprinos, y se encontró que también presentan un crecimiento folicular en ondas. Este crecimiento se pudo observar tanto en las cabras (Ginther y Kot, 1994; de Castro y col., 1999) como en las ovejas (Ginther y col., 1995). También fue demostrado durante la estación de anestro (Bartlewsky y col., 1998) y durante la gestación temprana en ovejas (Bartlewsky y col., 2000) y cabras (Pinczak y col., 2001). Esta información ha tenido un gran impacto en especies de producción debido a que permitió el desarrollo y la mejora de tratamientos farmacológicos para hacer más eficiente la aplicación de técnicas de reproducción asistida en estas especies (Bó y col., 2003; Menchaca y Rubianes, 2004). Por otra parte, mediante la ultrasonografía también ha habido un importante desarrollo en el conocimiento de la fisiología ovárica de otras especies como equinos (Palmer y Driancourt, 1980), cérvidos (Mc Corkell y col., 2006), llamas (Adams y col., 1990) y camélidos (Manjunatha y col., 2012), entre otros. También en humanos fue demostrado mediante esta técnica que el patrón de desarrollo folicular en la mujer ocurre en ondas de crecimiento y regresión (Baerwald y col., 2003). Recientemente esta técnica fue incorporada en humanos para incrementar la fertilidad, estudiar patologías ováricas, contracepción hormonal (Adams y col., 2012).

Además de haber demostrado que la vaca, la oveja, la cabra, la yegua y la mujer presentan un desarrollo folicular en ondas (Ginther y col., 1989; Ravindra y col., 1994; Ginther y Kot. 1994; Bergfelt y Ginther, 1993; Baerwald y col., 2003); experimentos publicados a partir de la década de los 90 muestran que el mecanismo que regula la dinámica folicular esta principalmente basado en respuestas diferenciales de los folículos a la hormona folículo estimulante (FSH) y LH (Ginther y col., 1996). Trabajos realizados por Adams y col. (1992) muestran que hay un incremento en las concentraciones de FSH previo a la emergencia de cada onda folicular, y que esta descarga de FSH es responsable del reclutamiento de los folículos al inicio de cada onda. Las ondas foliculares comienzan con una etapa de reclutamiento, donde solo los folículos dependientes de la gonadotrofinas son reclutados, y este número es muy variable dependiendo de la especie (Driancourt, 2001). Todos estos folículos son potencialmente capaces de ovular, aunque posteriormente a esta etapa de reclutamiento se produce un proceso de selección donde el folículo dominante continúa creciendo y los restantes se vuelven subordinados y comienzan el proceso de atresia. La razón por la cual el folículo dominante puede crecer con bajos niveles de FSH mientras que los subordinados pasan a un estado de atresia folicular puede estar relacionada a la síntesis de receptores para LH en las células de la granulosa de este folículo dominante (Ginther y col., 1996). Estos tres conceptos: reclutamiento, selección y dominancia son los que definen el desarrollo folicular.

En la cabra y en la oveja una onda folicular se define como la emergencia de un grupo de folículos antrales pequeños (3 mm) de los cuales uno o más alcanza un diámetro ≥ 5 mm (revisado por: Rubianes y Menchaca, 2003; Evans 2003). Durante el intervalo interovulatorio ocurren con mayor frecuencia 2 a 3 ondas en la vaca (Sirois y Fortune, 1988), 2 a 4 ondas en la oveja (Ginther y col., 1995) y 2 a 5 ondas en la cabra (Ginther y Kot, 1994; de Castro y col., 1999). Las características más importantes del crecimiento folicular en pequeños rumiantes fueron descritas en cabras por Rubianes y Menchaca (2003) y en ovejas por Evans (2003). Entre ellas se destacan: en cada onda se presenta por lo menos un folículo que alcanza un diámetro ≥ 5 mm; el folículo más grande de cada onda crece durante 5-7 días, con una tasa de crecimiento de ~ 1 mm/día; el diámetro máximo alcanzado por el folículo mayor de una onda difiere entre las ondas; a medida que avanza la fase lútea y las concentraciones de progesterona sérica aumentan, el diámetro máximo alcanzado por el folículo más grande es menor, se favorece el recambio folicular y los intervalos entre ondas son más cortos; durante la fase luteal media-tardía se ha propuesto que los folículos que no crecen más de 4 mm no serían parte del fenómeno de ondas influenciado este mecanismo por la progesterona; en la mayoría de los casos los folículos que ovulan son aquellos que tenían mayor diámetro en el momento de la luteólisis; cuando ocurren ovulaciones de más de un folículo; estos por lo general provienen de la misma onda folicular y ovulan en un rango generalmente menor a las 12 horas.

Como ya fue descrito, la emergencia de un grupo de folículos pequeños, es seguida de la selección de un folículo dominante (Ginther y col., 1997). Como consecuencia del efecto inhibitorio del folículo que continúa su crecimiento y se transforma en dominante, los folículos subordinados cesan su crecimiento a los pocos días de la emergencia de la onda. La regresión del folículo dominante está asociada con la emergencia de una nueva onda folicular. Este mecanismo se conoce como dominancia folicular (Driancourt, 2001). El folículo dominante a medida que aumenta su tamaño, aumenta su producción de estradiol, androstenediona e inhibina que son los responsables de inhibir la secreción de FSH y por lo tanto el crecimiento de otros folículos (Campbell y col., 1995). Tanto en la oveja como en la cabra en ocasiones ocurre la selección de 2 a 3 folículos que continúan su crecimiento lo que ha dado lugar al concepto de codominancia folicular en estas especies (Rubianes y Menchaca, 2003).

2.3 Progestágenos y desarrollo folicular

El estudio de la relación entre los progestágenos y el patrón de ondas foliculares ha sido estudiado en los últimos años gracias al desarrollo de técnicas como la ultrasonografía y el radioinmunoanálisis tanto en bovinos (Savio y col., 1993), como en ovinos (Rubianes y col., 1996; Viñoles y col., 1999) y en caprinos (de Castro y col., 1999). Las altas concentraciones séricas de progestágenos tienen un efecto inhibitorio sobre la pulsatilidad de LH tanto en la vaca (Savio y col., 1993), como en la oveja (Viñoles y col., 1999) y en la cabra (Menchaca y Rubianes, 2001). Estas concentraciones séricas de progestágenos se correlacionan negativamente con el tamaño folicular y está demostrado que concentraciones supraluteales –superiores a las observadas durante una fase luteal normal- afectan positivamente el recambio folicular, frenando el crecimiento del folículo dominante y promoviendo el recambio folicular (Adams y col., 1992; Rubianes y col.,

1996). Los niveles subluteales de progesterona promueven el crecimiento excesivo y la persistencia del folículo de mayor diámetro, aumentando así la edad de los folículos ovulatorios (folículos envejecidos). De esta manera, una exposición inadecuada a los progestágenos induce ovulación de folículos “envejecidos” (Viñoles y col., 2001), con una fertilidad disminuida (Revah y Butler, 1996). De manera similar en ovinos se ha encontrado un efecto perjudicial sobre la tasa de preñez luego de un tratamiento largo (12 días) con bajos niveles de progesterona (Johnson y col., 1996; Ungerfeld y Rubianes, 1999) o sus análogos (Viñoles y col., 2001). Trabajos en cabras muestran que los progestágenos afectan el recambio folicular (Menchaca y Rubianes, 2002); sin embargo, en esta especie no se ha evaluado de manera precisa el efecto de diferentes concentraciones de progesterona sobre la dinámica folicular y la fertilidad. Estos trabajos han demostrado la necesidad de mantener concentraciones elevadas de progesterona durante el desarrollo del folículo preovulatorio para favorecer el recambio folicular, lo que predispondría a una mayor fertilidad. El efecto de la progesterona sobre la dinámica folicular y la fertilidad tiene importantes implicancias para el desarrollo y mejora de los tratamientos de sincronización del estro y la ovulación (Bó y col., 2003; Rubianes y Menchaca, 2006). La progesterona es la hormona más utilizada para el control ovárico en rumiantes y su acción sobre la dinámica folicular sigue siendo un pilar fundamental y es en base a esto que hasta el día de hoy se sigue trabajando para generar y mejorar los protocolos de sincronización de la ovulación (Nash y col., 2012; Fleisch y col., 2012; Knights y col., 2011; Letelier y col., 2011).

2.4 Sincronización de la ovulación: Tratamientos con progesterona

En los últimos años la manifestación estral ha dejado de cobrar importancia debido a las limitantes asociadas a su detección y los estudios se han focalizado en sincronizar la ovulación y mejorar la fertilidad obtenida. Esto permite optimizar el trabajo de los recursos humanos y obtener una producción de animales más estable y organizada.

Los tratamientos que utilizan progesterona y sus análogos se basan en los efectos de dicha hormona sobre la fase luteal del ciclo, simulando la acción de la progesterona natural producida en el cuerpo lúteo luego de la ovulación y que es responsable de regular la liberación de LH por parte de la hipófisis. Los primeros trabajos en los que se utilizó progesterona para sincronizar el estro, fue de forma inyectable (Dutt y Casida, 1948). Una dosis intramuscular de 25 mg de progesterona disuelta en aceite de oliva puede mantener concentraciones plasmáticas de dicha hormona de aproximadamente 0,5 ng/mL durante 34 horas (Contreras-Solís y col., 2008). Esto podría explicar la baja tasa de fertilidad obtenida con estos protocolos, probablemente debido a la persistencia de dicha hormona en el útero (Dutt y Casida, 1948). Posteriormente, surgió la opción de los dispositivos intravaginales que contienen progestágenos y que permiten, al ser removidos abruptamente de la vagina, disminuir drásticamente las concentraciones circulantes de esta hormona. Desde la década de los 60 los dispositivos intravaginales que contienen progestágenos han sido utilizados para sincronizar el estro y la ovulación en ovinos (Robinson, 1965). Posteriormente, se encontró que estos dispositivos podían ser utilizados obteniendo resultados satisfactorios también en caprinos (Corteel y col., 1988).

Los dispositivos intravaginales que liberan progestágenos actúan de manera que ésta es absorbida por la mucosa vaginal, en cantidades suficientes para inhibir la liberación de la LH y FSH por la hipófisis frenando así la aparición del estro y la ovulación. Los progestágenos más comúnmente utilizados son el acetato de fluorogestona (20 mg/esponja) y el acetato de medroxiprogesterona (60 mg/esponja). Otro progestágeno es el acetato de melengestrol, aunque para su utilización debe ser incorporado en el alimento cada 8 a 12 horas por un período de 8 a 14 días (Gordon, 1996). En la década de los 80, fue desarrollado en Nueva Zelanda el CIDR-G (*controlled internal drug release*), que es un dispositivo intravaginal en forma de T con un revestimiento moldeado de elastómero de silicona impregnado con 0,3 gramos de progesterona sobre una espina inerte de nylon. Desde entonces, este dispositivo ha sido ampliamente difundido en todo el mundo debido a su fácil aplicación, aceptables resultados, y permitir el uso de progesterona natural en vez de análogos sintéticos.

La exposición a la progesterona por si sola induce una pobre respuesta estral y un inadecuado desarrollo del cuerpo lúteo durante el anestro estacional, por lo tanto asociar esta hormona con tratamientos gonadotróficos mejora los resultados. La hormona gonadotrófica eCG administrada al final del tratamiento con progesterona ha sido utilizada durante años para la sincronización de la ovulación tanto en ovinos como en caprinos (Gordon, 1996). Durante la estación reproductiva esta hormona es necesaria para lograr una mayor sincronización de la ovulación y de esta formar poder implementar programas de IATF. En el anestro estacional es necesaria para la inducción del estro y de la ovulación.

Tratamientos Tradicionales

Estos tratamientos se basan en el papel inhibitorio que tienen los progestágenos sobre el eje hipotálamo-hipofisario. Tradicionalmente, los tratamientos con progestágenos tenían una duración de 14 a 19 días -dependiendo de la especie- y actualmente, la duración de los mismos se redujo a 11-12 días y se asocia a una dosis de PGF2 α previo al retiro del dispositivo (Corteel y col., 1988). Estos tratamientos se asocian a una dosis de eCG al retiro del dispositivo para lograr una mayor sincronización de la ovulación debido al efecto LH de esta hormona.

La inserción de los dispositivos de progesterona induce un incremento en las concentraciones plasmáticas de progesterona que se mantienen elevadas durante los primeros 3-4 días, para luego de 6-7 días alcanzar concentraciones subluteales (~1ng/ml) al final del tratamiento (Rubianes y col., 1998). Las bajas concentraciones de progesterona al final del tratamiento afectan la fertilidad por su efecto sobre el transporte espermático y consecuente reducción de espermatozoides intactos en el útero y oviducto (Hawk y Conley, 1972); y el efecto sobre el desarrollo folicular debido al crecimiento excesivo y la persistencia del folículo de mayor diámetro (Viñoles y col., 1999). Asimismo, fue demostrado que el pico de LH y el momento ovulatorio (Van Cleef y col., 1998) se vuelven más variables cuando las concentraciones de progesterona son muy bajas al final del tratamiento. Una de las alternativas propuestas fue el recambio del dispositivo intravaginal en la mitad del tratamiento con el objetivo de inducir concentraciones altas durante todo el protocolo, aunque esta medida no resultó del todo

efectiva debido a que no se logró aumentar la tasa de preñez (Baril y col., 1998). Esta es una de las principales causas que ha llevado a que estos tratamientos largos sean cuestionados en los últimos años (Viñoles y col., 2001; Menchaca y Rubianes, 2004).

Tratamientos Cortos

Si bien los resultados en la sincronización del estro con tratamientos tradicionales son aceptables, existen evidencias de que los niveles subluteales de progesterona promueven el crecimiento y la persistencia del folículo de mayor diámetro (Flynn y col., 2000; Viñoles y col., 2001). Esto provoca la ovulación de folículos “envejecidos” cuando se utilizan tratamientos de 12 a 14 días (Viñoles y col., 2001). La progesterona afecta de manera negativa la secreción pulsátil de LH y el crecimiento terminal de los folículos antrales es inducido por una mayor frecuencia en la pulsatilidad de esta hormona. Es por esto que cuando existen niveles bajos de progesterona plasmática se incrementa la pulsatilidad de LH, y por lo tanto aumenta de tamaño el folículo de mayor diámetro. Frente a esta situación, en condiciones fisiológicas al disminuir las concentraciones de progesterona se establece una retroalimentación positiva entre el estradiol y la GnRH-LH desencadenándose el pico preovulatorio de LH y la ovulación. Existen situaciones (por ejemplo, con el uso de tratamientos largos) donde la progesterona se mantiene en niveles subluteales y por lo tanto se incrementa la pulsatilidad de LH pero el pico preovulatorio está inhibido. En consecuencia, el folículo persiste y prolonga su tiempo de vida. Como resultado ocurre la ovulación de folículos “envejecidos” que predisponen a una menor fertilidad. Si bien existe consenso en este mecanismo, la información disponible es controversial en ovinos, debido a que en un estudio realizado por Evans y col. (2001) no se encontró una asociación entre la edad de los folículos ovulatorios y la calidad de los embriones obtenidos.

Como respuesta a estos conocimientos se han desarrollado tratamientos de corta duración con solo 5-7 días de administración de progestágenos (Tratamientos Cortos) (Ungerfeld y Rubianes, 1999). Estos tratamientos se han asociado con PGF2 α al momento de insertar o retirar el dispositivo y con eCG al momento del retiro. Existen diferentes trabajos que han validado este nuevo protocolo tanto durante la estación reproductiva como durante la estación de anestro (Menchaca y col., 2007; Martemucci y D'Alessandro, 2011). Menchaca y col (2007), determinaron la respuesta endócrina, luteal, folicular y ovulatoria provocada por los tratamientos cortos, y de esta manera es que se pudo determinar con exactitud el momento de la ovulación e inseminar sin la detección de celo. En cabras, el momento óptimo para realizar la IATF por vía cervical es a las 54 horas de retirado el dispositivo logrando tasas de preñez superiores al 60% (Menchaca y col., 2007; Cox y col., 2012).

Los dispositivos intravaginales contienen 0,3 g de progesterona, éstos fueron desarrollados para ser aplicados en ovinos por un período de tiempo cercano a 30 días bloqueando el estro y la ovulación (Wheaton y col., 1993). De ahí surge la hipótesis de que el uso de dispositivos durante 5-7 días podría dejar progesterona remanente permitiendo la reutilización de los mismos. Trabajos realizados por van Cleef y col. (1992) muestran que un CIDR-B (1,9 g de progesterona) retirado de vagina de vacas todavía contiene progesterona y la cantidad depende del tiempo que el dispositivo fue

utilizado. La reutilización de dispositivos conteniendo 1,0 g de progesterona fue probada en vacas utilizando tratamientos de 7-8 días permitiendo tasas de preñez aceptables similares a aquellas obtenidas con dispositivos nuevos (Bó y col., 2003). Esto tiene implicancias económicas al reducir los costos del tratamiento lo que favorece la implementación de los programas de inseminación artificial. Sin embargo, considerando la información presentada anteriormente y en contraposición con esta ventaja, la reutilización de los dispositivos intravaginales podría inducir concentraciones subluteales de progesterona afectando así la tasa de preñez finalmente obtenida. La información generada sobre diferentes concentraciones séricas de progesterona inducidas con dispositivos intravaginales reutilizados asociados a los Tratamientos Cortos, es escasa tanto en cabras como en ovejas.

2.5 Inseminación artificial

La inseminación artificial en pequeños rumiantes puede realizarse por vía vaginal, cervical o intrauterina. Los métodos difieren en cuanto a su complejidad y expectativas de éxito. El método más comúnmente utilizado es la inseminación cervical utilizando semen fresco. Sin embargo, cuando se utiliza semen congelado-descongelado en ovinos los resultados con la inseminación cervical han sido muy bajos (Evans y Maxwell, 1990).

En la cabra y en la oveja, la inseminación artificial presenta la dificultad de atravesar el cervix con la cánula de inseminación para alcanzar la luz uterina. Esto ocurre debido a un menor tamaño corporal en comparación con otras especies como las vacas y a la anatomía del cervix (Kershaw y col., 2005). En la cabra, se puede lograr una mayor penetración que en la oveja y esto mejora significativamente los resultados en los programas de inseminación artificial (Evans y Maxwell, 1990). Por este motivo, en la cabra la inseminación por vía cervical es la técnica más indicada, mientras que en la oveja en ciertas condiciones es recomendable el uso de otras técnicas que permitan la deposición del semen en la luz uterina.

La inseminación por laparoscopia es la alternativa más eficaz, principalmente en ovinos, para superar la barrera que representa el cervix. Ésta permite el abordaje del útero y la deposición del semen directamente en la luz de los cuernos, de esta forma se obtiene una mejor tasa de preñez tanto con semen fresco como congelado.

La IATF permite prescindir de la detección de celos, y esto favorece su aplicación en programas de control reproductivo. Cuando se pretende implementar un programa de IATF necesariamente debe ser conocido el momento de la ovulación, el cuál está determinado por el tratamiento de sincronización utilizado (revisado por Menchaca y Rubianes, 2004).

3. CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA

De acuerdo a la información citada anteriormente, resulta clara la necesidad de incrementar la producción de ovinos y caprinos en nuestro país. Para ello, mejorar la eficiencia en la reproducción de estas especies constituye un aspecto fundamental. Sumado a esto, es importante destacar la estacionalidad reproductiva en estos animales, y por lo tanto la necesidad de mejorar y hacer más accesible para los productores herramientas como programas de sincronización de celos e inseminación a tiempo fijo que permiten una mayor producción en menor tiempo. Así como también la incorporación de nueva genética que también incrementaría la actual producción.

La mejora en la eficiencia de los tratamientos de inducción y sincronización de la ovulación y la inseminación artificial en ovinos y caprinos son los temas en los que estoy trabajando desde el inicio de mi vida académica. Durante los últimos años he trabajado en Tratamientos Cortos de sincronización de la ovulación en pequeños rumiantes para implementarlos en programas de IATF utilizando IA cervical e intrauterina tanto en caprinos como en ovinos. Estos tratamientos fueron desarrollados y puestos en práctica en Uruguay generándose un importante aporte a dicha área durante los últimos 10 años. Siguiendo con esta línea de trabajo es que surge este plan de trabajo en el cual el uso de dichos tratamientos con progesterona para la sincronización de la ovulación me permite pensar en reutilizar estos dispositivos de progesterona que fueron diseñados para Tratamientos Tradicionales (14 días). Existen reportes en bovinos que obtienen resultados satisfactorios con la reutilización de dispositivos. No obstante, en pequeños rumiantes la información vinculada a la reutilización de estos dispositivos es escasa. La posibilidad de la reutilización de dispositivos de progesterona permitiría disminuir los costos de los programas de sincronización de la ovulación y de esta manera hacerlo mas accesible para los productores. A su vez, se lograría el uso más eficiente de estos dispositivos con menores residuos para liberar al medio ambiente. Por su parte, determinar qué efecto tienen las bajas concentraciones de progesterona sobre la dinámica folicular y la fertilidad genera información novedosa para el estudio de la fisiología reproductiva en pequeños rumiantes.

En suma, la información sobre la reutilización de dispositivos liberadores de progesterona para la sincronización de la ovulación en pequeños rumiantes es escasa. Por lo tanto con este plan de trabajo se pretende determinar la eficacia de la reutilización de estos dispositivos sobre la dinámica folicular y la fertilidad en cabras y ovejas.

4. HIPÓTESIS

Las concentraciones de progesterona inducidas con dispositivos intravaginales liberadores de progesterona reutilizados, asociados a Tratamientos Cortos de sincronización del estro y la ovulación permiten el control ovárico y una tasa de preñez adecuada en ovinos y caprinos. Esto permite disminuir los costos de los programas de IATF en ovinos y hacer más accesible su aplicación.

5. OBJETIVO

5.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de diferentes concentraciones séricas de progesterona inducidas con la reutilización de dispositivos intravaginales sobre la dinámica folicular y la tasa de preñez utilizando los Tratamientos Cortos en cabras y ovejas.

5.2 Objetivos Específicos

1. Determinar las concentraciones séricas de progesterona, así como la respuesta folicular y ovulatoria con los Tratamientos Cortos utilizando dispositivos intravaginales de primer, segundo y tercer uso en cabras.
2. Determinar las concentraciones séricas de progesterona, respuesta folicular y ovulatoria, y las características del ciclo subsiguiente, con los Tratamientos Cortos utilizando dispositivos intravaginales de primer, segundo y tercer uso en ovejas.
3. Determinar el efecto de la reutilización de los dispositivos liberadores de progesterona asociados a Tratamientos Cortos sobre la fertilidad obtenida con IATF tanto en cabras como en ovejas.

6. ESTRATEGIAS DE LA INVESTIGACIÓN

Reutilización de dispositivos intravaginales asociados con Tratamientos Cortos en cabras. (Publicación I)

Experimento 1: Concentraciones séricas de progesterona, dinámica folicular y respuesta ovárica.

Se utilizaron 30 cabras lecheras, multíparas, de 2 a 4 años de edad, de la raza Pardo Alpina x Saanen, con una condición corporal de $3,1 \pm 0,3$ (escala 1 a 5) y un peso de $47,1 \pm 8,5$ kg. El experimento fue realizado durante el anestro estacional (Diciembre). Las hembras recibieron un Tratamiento Corto que consistió en la inserción de un CIDR-G por 5 días asociado a la administración de PGF2 α al momento de la inserción y de eCG al momento del retiro del dispositivo. Día 0 fue considerado el día de inserción del CIDR-G. Las cabras fueron asignadas aleatoriamente a tres grupos experimentales: CIDR-G de 1er uso (n=10), CIDR-G de 2do uso (n=10), o CIDR-G de 3er uso (n=10). Se determinaron las concentraciones séricas de progesterona en muestras tomadas diariamente (Día -1 a 6), y con mayor frecuencia en los momentos de inserción (Día 0, Día 0+4h, Día 0+12h) y retiro de los dispositivos (Día 5, Día 5+12h). Se registró el comportamiento estral diariamente durante el tratamiento y cada 8 horas durante las 96 horas siguientes al retiro del dispositivo. Se realizó el monitoreo diario (Día -3 a 5) -o cada 12 horas, desde el retiro del CIDR-G hasta la ovulación, para determinar el momento ovulatorio- del desarrollo folicular y luteal.

Experimento 2: Tasa de Preñez

Se utilizaron 261 cabras lecheras, de 2 a 4 años de edad, de las razas Pardo Alpina y Saanen. Las hembras tenían una condición corporal de $3,0 \pm 0,1$. El experimento se realizó en dos réplicas durante la estación reproductiva (Abril, n=130) y durante el anestro estacional (Octubre, n=131). Se utilizó el mismo diseño y grupos experimentales que en el Experimento 1: CIDR-G de 1er (n=85), 2do (n=89) y 3er (n=87) uso. La inseminación cervical fue realizada a partir de las 54 horas de retirar el dispositivo. La tasa de preñez fue determinada por ultrasonografía a los 30-35 días de la inseminación.

Reutilización de dispositivos intravaginales asociados con Tratamientos Cortos en ovejas. (Publicación II)

Experimento 3: Concentraciones séricas de progesterona, dinámica folicular, respuesta ovárica y actividad luteal subsiguiente

Se utilizaron 30 ovejas multíparas de la raza Corriedale con una condición corporal de $2,8 \pm 0,3$ (escala 0 a 5) y un peso de $54,2 \pm 5,1$ kg durante la estación reproductiva (Marzo-Abril). Previo a iniciar el tratamiento, el estro fue sincronizado con dos dosis de PGF2 α separadas por 7 días. Luego de la segunda dosis de PGF2 α se detectó el estro dos veces diarias. Al momento de la inserción del CIDR-G las ovejas estaban en la fase luteal media (10 a 13 días luego del estro, n=25) o en la fase luteal temprana (2 a 5 días luego

del estro, n=5), y este factor fue considerado para el armado balanceado de los grupos experimentales. A todos los animales se les administró una dosis de PGF2 α para inducir la luteólisis al colocar los dispositivos y de esta forma poder analizar el efecto de la progesterona exógena. Las hembras fueron tratadas con un Tratamiento Corto que consistió en la inserción de un CIDR-G por 6 días asociado a la administración de PGF2 α y de eCG al momento del retiro del CIDR-G. Día 0 fue considerado el día de inserción del dispositivo. Las ovejas fueron asignadas a tres grupos experimentales: CIDR-G de 1er (n=10), 2do (n=10), y 3er (n=10) uso. Se determinaron las concentraciones séricas de progesterona en muestras tomadas diariamente (Día -1 a 8), y con mayor frecuencia en los momentos de inserción (Día 0, Día 0+4h, Día 0+12h) y retiro (Día 6, Día 6+12h) de los dispositivos durante el Tratamiento Corto; y diariamente durante el ciclo subsiguiente para evaluar la actividad luteal de este ciclo. Se registró el comportamiento estral diariamente durante el tratamiento, cada 12 horas durante las 72 horas siguientes al retiro del dispositivo; y diariamente durante el siguiente ciclo, para determinar la duración del mismo. Durante los experimentos se realizó el ultrasonografía diaria (Día -3 a 6) -o cada 12 horas, desde el retiro del CIDR-G hasta la ovulación, para determinar el momento ovulatorio- para el monitoreo del desarrollo folicular.

Experimento 4: Tasa de Preñez y Prolificidad

Se utilizaron 319 ovejas Merino, con una condición corporal de $2,7\pm 0,2$. El experimento fue realizado durante el anestro estacional (Noviembre). Las hembras fueron tratadas con un Tratamiento Corto que consistió en la inserción de un CIDR-G por 6 días asociado a la administración de PGF2 α y de eCG al momento del retiro del CIDR-G. Las ovejas fueron asignadas aleatoriamente a dos grupos experimentales: CIDR-G de 1er (n=158) o de 3er (n=161) uso. La inseminación intrauterina fue realizada a las 52-57 horas de retirar el dispositivo. La tasa de preñez y el número de fetos fue determinado por ultrasonografía a los 40 días de la inseminación.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

Animales e instalaciones

Se realizaron cuatro experimentos, dos de ellos en las instalaciones del Laboratorio de Fisiología de la Reproducción, Facultad de Veterinaria, UdelaR (35° LS, Montevideo, Uruguay), uno en los establecimientos caprinos “La Chacra” y “Bohemia” (35° LS, Canelones, Uruguay) y el otro en el Establecimiento “La Torcaza” (31° LS, Salto, Uruguay). Se utilizaron cabras con más de 60 días posparto de las razas Pardo Alpina y Saanen (Experimentos 1 y 2) y ovejas multíparas de la raza Corriedale y Merino (Experimentos 3 y 4). Para los experimentos 1 y 3 todos los animales fueron trasladados al menos con un mes de anticipación al Laboratorio de Fisiología de la Reproducción para permitir la adaptación de los mismos. Se mantuvieron bajo un régimen de estabulación alimentados con heno de alfalfa (2000 g/animal por día) y alimento balanceado (800 g/animal por día); y el agua fue administrada *ad libitum*. Para los experimentos realizados en predios comerciales (experimentos 2 y 4) los animales se

encontraban en un régimen semi-intensivo en el caso de los caprinos y en pastoreo en el caso de los ovinos; y se utilizaron instalaciones adecuadas para su manejo.

Tratamientos hormonales

Para la sincronización de la ovulación, se utilizó el Tratamiento Corto descrito por Rubianes y Menchaca (2003) que consistió en la inserción de un CIDR-G (0,3 g de progesterona, Eazy-breed, InterAg, Hamilton, Nueva Zelanda) por 5-6 días asociado a la administración im de PGF 2α (10 mg dinoprost, Lutalyse, Pfizer, NY, EEUU) al colocar/retirar los dispositivos -dependiendo del experimento- y a la administración de 300 UI de eCG (Novormon, Syntex, Buenos Aires, Argentina) al retiro de los mismos. El Día 0 se definió como el día de inserción del dispositivo intravaginal. Se utilizaron CIDR-G sin uso previo (1er uso), CIDR-G previamente usado durante 5 días por una vez (2do uso), o por dos veces (3er uso). Luego del retiro de los dispositivos intravaginales, éstos fueron inmersos y lavados en una solución de cloruro de benzalconio (0,5%, Droguería Paysandú, Montevideo, Uruguay) durante 10 minutos para asegurar la desinfección de los mismos (Bardón y col., 2003).

Determinación del comportamiento estral

Caprinos

El estro fue definido como la aceptación de la monta detectada mediante el uso de machos cabríos sin permitir la cópula mediante sujeción del macho con una cuerda.

Ovinos

Se utilizaron capones androgenizados tratados con tres dosis intramusculares de 200 mg de cyclopentilpropionato de testosterona (Dispert, Montevideo, Uruguay) administrados cada 7 días, empezando dos semanas antes de iniciar el experimento. Los machos fueron pintados con tierra de colores diariamente durante la detección del estro y las hembras fueron consideradas en estro cuando aparecían pintadas al momento de la detección.

Ultrasonografía ovárica

El seguimiento ovárico se inició un mes previo a cada experimento con el objetivo de permitir la adaptación de los animales a dicho manejo. Las imágenes ováricas se obtuvieron mediante ultrasonografía transrectal con un ecógrafo Aloka 500 SSD (Tokyo, Japón) provisto de un transductor lineal de 7.5 MHz. Los animales se colocaron en un cepo, se retiró la materia fecal y se introdujo entre 30 y 50 ml de gel de carboximetyl celulosa en el recto por medio de una jeringa para facilitar el contacto entre el transductor y la mucosa rectal. El procedimiento para localizar los ovarios fue el mismo que el descrito por Ginther y Kot (1994). Se realizó un mapeo de las estructuras observadas, es decir de los folículos mayores de 3 mm y del cuerpo lúteo. Los folículos fueron clasificados como pequeños (3 a <4 mm), medianos (4 to <5 mm) o grandes (≥ 5 mm de diámetro). Todas las estructuras se identificaron en cada ecografía y se dibujaron

en un mapeo de acuerdo a su ubicación relativa en el ovario para el posterior análisis de la dinámica folicular.

Una onda folicular se definió como la emergencia de un grupo de folículos pequeños que dan origen a uno o más folículos grandes. La ovulación se definió como el colapso de al menos un folículo grande. Se determinaron las siguientes características de las ondas foliculares para cada hembra: a) día de emergencia del folículo ovulatorio; b) recambio folicular (emergencia de una nueva onda ovulatoria luego de la inserción del dispositivo); c) diámetro del mayor folículo al momento de la ovulación; d) días de vida del folículo ovulatorio; e) momento ovulatorio, determinado por la desaparición del folículo de mayor diámetro luego del retiro del dispositivo (ecografía ovárica cada 12 horas).

Obtención de muestras sanguíneas y procesamiento

Las muestras para las determinaciones hormonales fueron obtenidas por extracción de aproximadamente 10 mL de sangre mediante venopunción yugular. Las muestras diarias se tomaron entre las 8 y 9 AM, a excepción de los días de la inserción y retiro de los dispositivos donde se tomó más de una muestra diaria como se describe en cada experimento. Las muestras sanguíneas fueron colocadas en tubos de vidrio y se dejaron coagular a temperatura de laboratorio (~20°C) durante una hora para luego ser centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos. Se extrajo el suero, y fue conservado en tubos eppendorf de 1,5 mL en un freezer a -20 grados centígrados hasta su procesamiento para la determinación de progesterona sérica por radioinmunoanálisis.

Determinación de Progesterona sérica por radioinmunoanálisis

La Progesterona fue determinada utilizando un Kit comercial de Radioinmunoanálisis Iodo¹²⁵ de fase sólida (Coat-a-Count, DPC, Los Angeles, CA, USA), con una sensibilidad de 0,39 nmol/L. El valor de los controles fue 2,3, 8,6 y 26,0 nmol/L para concentraciones bajas, medias y altas, respectivamente. Los coeficientes de variación intra-ensayo fueron 7,3, 7,3 y 4,9 %; y los inter-ensayo 8,7, 7,3 y 5,5 % para las concentraciones bajas, medias y altas, respectivamente.

Inseminación Artificial Intrauterina

La inseminación artificial por vía intrauterina se realizó por laparoscopia (Karl Store Hopkins, Tuttlingen, Alemania). Esta consiste en una fibra óptica flexible que permite la propagación lumínica y la visualización interna de los órganos mediante una lente incorporada sin necesidad de un abordaje quirúrgico. La hembra es mantenida en posición decúbito dorsal con el tren posterior elevado. Se realizan dos punciones de 5 a 7 mm de diámetro en la región ventral del abdomen y el endoscopio es introducido por la punción del lado izquierdo para la visualización de los cuernos. El inyector de inseminación es colocado por la punción del lado derecho, provisto de una aguja en su extremo mediante la cual se punciona la pared de los cuernos depositando el semen en la luz uterina.

Inseminación Artificial Cervical

El semen se depositó próximo a la entrada del cervix, mediante el uso de un vaginoscopio y pistola de inseminación multidosis (Walmur, Montevideo, Uruguay).

Obtención y procesamiento del semen

El semen se colectó mediante una vagina artificial y cada eyaculado fue evaluado por volumen, concentración y motilidad espermática. Posteriormente se diluyó en leche descremada y UHT (ultra-high-temperature) para alcanzar una concentración de 200×10^6 espermatozoides/hembra en 0,1 mL de volumen final y 100×10^6 espermatozoides/hembra en 0,2 mL de volumen final cuando la inseminación fue realizada por vía cervical o intrauterina, respectivamente.

Diagnóstico de gestación

Se realizó mediante ultrasonografía transrectal a los 30-40 días de la inseminación mediante un transductor de 5 MHz (Dramiński, Olsztyn, Polonia).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos acerca de la dinámica folicular (diámetro, tasa de crecimiento y días de vida del folículo ovulatorio) y de los intervalos de tiempo (retiro del CIDR-G – estro; retiro del CIDR-G – ovulación) fueron comparados por análisis de varianza (ANOVA) y test de sobrevivencia, respectivamente. Las concentraciones de progesterona se compararon por ANOVA para muestras repetidas incluyendo el efecto del tratamiento y del tiempo, así como su interacción. La tasa de preñez fue analizada mediante la prueba de regresión logística incluyendo el efecto del tratamiento y del macho (Experimentos 2 y 4) y de la estación reproductiva en el caso del Experimento 2. El número de fetos en el Experimento 4 fue comparado por Regresión de Poisson. (Snedecor y Cochran, 1980). El análisis estadístico se realizó con el Software Stata 8.0. Los resultados fueron expresados como $\text{media} \pm \text{D.S.}$ y las diferencias se consideraron significativas cuando $P < 0,05$.

8. RESULTADOS

Reutilización de dispositivos intravaginales asociados con Tratamientos Cortos en cabras. (Publicación I)

Experimento 1: Concentraciones séricas de progesterona, dinámica folicular y respuesta ovárica.

Las concentraciones séricas de progesterona inducidas por los tres tratamientos se muestran en la Figura 1. Al inicio del experimento, las concentraciones séricas de progesterona estaban bajo el límite de detección del radioinmunoanálisis, confirmando la ausencia de actividad luteal en las cabras tratadas. La concentración de progesterona inducida por los dispositivos de 1er uso durante todo el tratamiento fue diferente ($P < 0,05$), comparado con la inducida por los dispositivos de 2do y 3er uso. Esta diferencia fue mayor durante las primeras 24 horas luego de insertar el dispositivo. Todos los grupos experimentales presentaron un incremento significativo en las concentraciones séricas de progesterona a las 4 horas de insertar los dispositivos, y los valores mas elevados se registraron a las 12 horas ($19,0 \pm 7,3$, $10,3 \pm 1,9$ y $7,7 \pm 2,4$ nmol/L, para los dispositivos de 1er, 2do y 3er uso, respectivamente; $P < 0,05$). En el momento del retiro de los dispositivos las concentraciones de progesterona fueron diferentes para los dispositivos de 1er, 2do y 3er uso ($9,8 \pm 2,3$, $5,9 \pm 1,6$ y $4,5 \pm 1,4$ nmol/L, respectivamente; $P < 0,05$). Los valores individuales de progesterona sérica alcanzados en cada cabra siempre fueron mayores a 4,0 nmol/L ($\sim 1,3$ ng/mL), independientemente del grupo experimental.

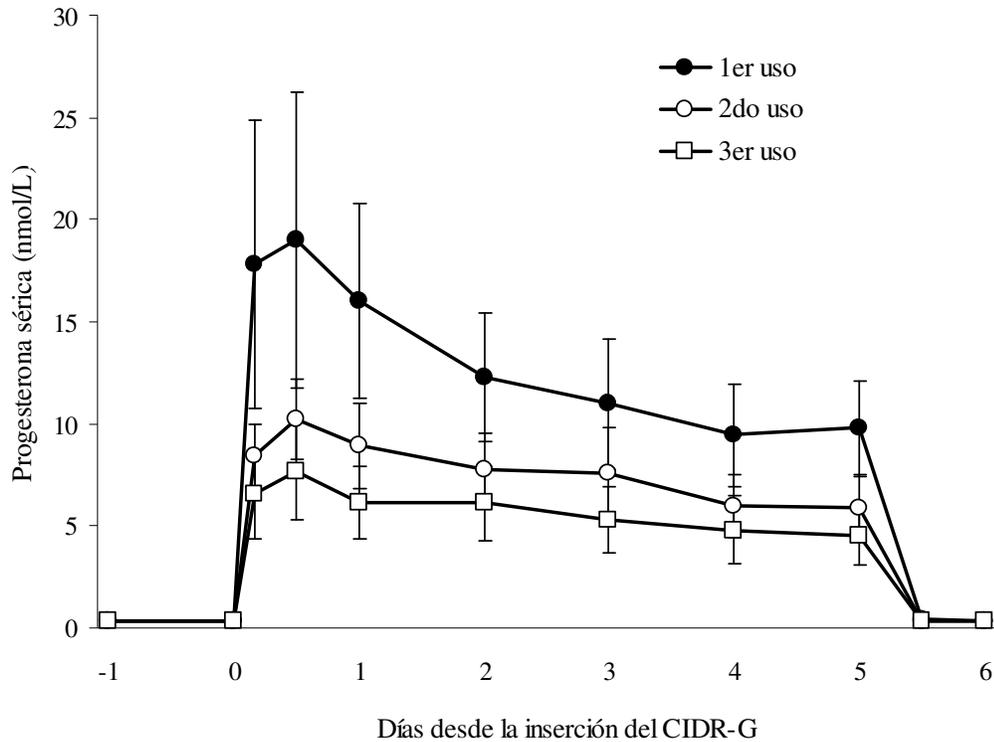


Figura 1. Concentraciones séricas de progesterona (nmol/L, media±DS) en cabras durante el anestro estacional que recibieron un Tratamiento Corto durante 5 días con CIDR-G de 1er (n=10), 2do (n=10) y 3er (n=10) uso. El Día 0 corresponde a la inserción del dispositivo y administración de PGF2 α y el Día 5 al retiro del CIDR-G y administración de eCG.

Las características de la respuesta estral y de la dinámica folicular se resumen en la Tabla I. El Tratamiento Corto fue efectivo en la inducción del estro y la ovulación en todas las cabras tratadas, y no se encontraron diferencias significativas en el momento del estro, en el momento de la ovulación, ni en la tasa ovulatoria para ninguno de los tres grupos experimentales ($P>0,05$). Este tratamiento permitió un recambio folicular en todas las hembras que fueron tratadas con los dispositivos de 1er uso. Sin embargo, con los dispositivos de 2do y 3er uso el recambio folicular se produjo en el 80% de los animales, aunque no hubo diferencias significativas entre los grupos. Los datos correspondientes al día de emergencia, días de vida o permanencia y diámetro del folículo ovulatorio fueron similares entre los tres grupos experimentales.

Tabla I. Respuesta ovárica inducida con CIDR-G de 1er, 2do y 3er uso, asociado a los Tratamientos Cortos en cabras durante el anestro estacional.

CIDR-G	1er uso	2do uso	3er uso	P
Estro y ovulación	10/10	10/10	10/10	NS
Inicio del estro* (h)	27,6±5,1	25,8±2,9	30,6±10,0	NS
Momento de la ovulación* (h)	64,8±6,2	61,8±4,0	66,0±10,3	NS
Tasa ovulatoria	2,1±0,7	2,1±0,9	2,5±1,0	NS
Cabras que ovularon de una nueva onda folicular** (%)	10/10 (100%)	8/10 (80%)	8/10 (80%)	NS
Día de emergencia del folículo ovulatorio**	1,8±1,2	1,0±1,3	1,9±1,9	NS
Días de vida del folículo ovulatorio	5,6±1,2	6,1±1,4	5,4±1,9	NS
Diámetro folicular (mm) en la ovulación	8,7±1,3	8,5±0,9	8,4±1,2	NS

* desde el retiro del CIDR-G

** luego de la inserción del CIDR-G

Experimento 2: Tasa de Preñez

La tasa de preñez se vio afectada por el tratamiento no existiendo efecto de la estación del año ni interacción, por lo tanto se analizaron los datos en conjunto para ambas estaciones (Tabla II). La tasa de preñez fue mayor para los dispositivos de 1er uso comparado con los dispositivos de 3er uso. No se encontraron diferencias significativas entre los dispositivos de 2do uso comparado con los de 1er y 3er uso.

Tabla II. Tasa de preñez obtenida con un Tratamiento Corto con progesterona utilizando CIDR-G de 1er, 2do y 3er uso en cabras lecheras.

	Tasa de preñez (%)
CIDR-G de 1er uso (n=85)	64/85 (75,3 %) ^a
CIDR-G de 2do uso (n=89)	60/89 (67,4 %) ^{ab}
CIDR-G de 3er uso (n=87)	54/87 (62,1 %) ^b

Letras diferentes en una misma columna indican diferencia significativa (P<0,05).

Reutilización de dispositivos intravaginales asociados con Tratamientos Cortos en ovejas. (Publicación II)

Experimento 3: Concentraciones séricas de progesterona, dinámica folicular, respuesta ovárica y actividad luteal subsiguiente

En la Figura 2 se presentan las concentraciones séricas de progesterona inducidas por los tres tratamientos en las ovejas que respondieron con estro y ovulación (27/30; 90%). Hubo un efecto del tratamiento utilizado sobre las concentraciones de progesterona sérica alcanzadas en los tres grupos. No obstante, en todos los grupos experimentales los valores individuales se mantuvieron superiores a 4,0 nmol/L (~1,3 ng/ml) durante todo el tratamiento.

En el momento de iniciar el protocolo y administrar la PGF2 α las concentraciones de progesterona endógena se encontraban en valores similares para las ovejas que recibieron un CIDR-G de 1er, 2do o 3er uso (14,0 \pm 1,8 nmol/L; 16,6 \pm 2,2 nmol/L; 14,6 \pm 1,1 nmol/L; respectivamente, P>0,05). Luego de 4 horas de insertado el dispositivo hubo un incremento significativo en las concentraciones séricas de progesterona para el CIDR-G de 1er uso (24,3 \pm 3,0 nmol/L), mientras que con los CIDR-G de 2do y 3er uso las concentraciones se mantuvieron similares (18,1 \pm 1,9 y 14,4 \pm 0,7 nmol/L, respectivamente, P: NS). Las concentraciones séricas de progesterona comenzaron a disminuir significativamente a las 12 horas de insertado el dispositivo para los dispositivos de 1er, 2do y 3er uso (18,7 \pm 1,6, 15,3 \pm 1,7, 11,8 \pm 0,5 nmol/L, respectivamente). Luego del Día 1 las concentraciones fueron decreciendo lentamente en los tres grupos hasta el momento del retiro del CIDR-G (Día 6) y disminuyeron drásticamente 12 horas más tarde.

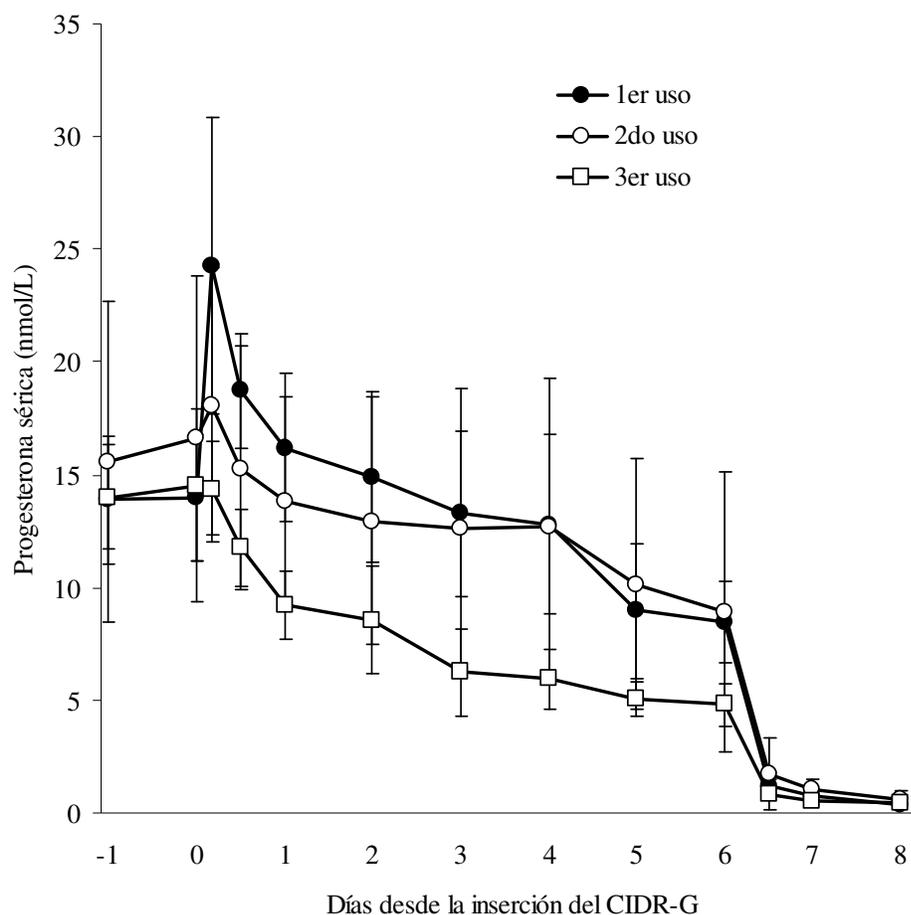


Figura 2. Concentraciones séricas de progesterona (nmol/L, media±DS) en ovejas durante la estación reproductiva, tratadas con CIDR-G de 1er (n=10), 2do (n=10) y 3er (n=10) uso durante 6 días asociado a eCG y PGF2 α . El Día 0 corresponde a la inserción del dispositivo y el Día 6 al retiro del mismo. Al momento de la inserción del CIDR-G todos los animales recibieron una dosis adicional de PGF2 α .

Las variables vinculadas al estro, ovulación y dinámica folicular se muestran en la Tabla III. El 90% (27/30) de las ovejas que recibieron el Tratamiento Corto respondieron manifestando estro y ovulación. El intervalo entre el retiro del dispositivo y el inicio del estro y el momento de la ovulación fue similar entre los diferentes grupos. Este tratamiento permitió un recambio folicular en todas las hembras que fueron tratadas con los dispositivos de 1er uso. Sin embargo, esto no sucedió con los dispositivos de 2do y 3er uso, aunque no hubo diferencias significativas entre los grupos. Los datos correspondientes al día de emergencia, días de vida y diámetro del folículo ovulatorio, fueron similares entre los tres grupos experimentales.

Tabla III. Respuesta ovárica inducida con CIDR-G de 1er, 2do y 3er uso, asociado a los Tratamientos Cortos en ovejas.

CIDR-G	1er uso (n=10)	2do uso (n=10)	3er uso (n=10)	P
Ovejas con ovulación/total	8/10	9/10	10/10	NS
Inicio del estro* (h)	42,0 ± 6,4	34,7 ± 11,1	37,2 ± 6,8	NS
Momento de la ovulación* (h)	68,3 ± 5,5	66,0 ± 12,7	62,4 ± 5,1	NS
Tasa ovulatoria	1,5 ± 0,7	1,7 ± 0,5	1,5 ± 0,7	NS
Ovejas que ovularon de una nueva onda folicular** (%)	8/8 (100,0%)	7/9 (77,8%)	8/10 (80,0%)	NS
Día de emergencia del folículo ovulatorio**	2,9 ± 1,8	1,8 ± 2,4	2,5 ± 1,1	NS
Días de vida del folículo ovulatorio	5,4 ± 1,8	6,5 ± 2,2	5,6 ± 1,0	NS
Diámetro folicular (mm) en la ovulación	5,6 ± 0,6	6,7 ± 0,8	5,6 ± 0,5	NS

*desde el retiro del CIDR-G

**desde la inserción del CIDR-G

Ovejas con respuestas diferentes

El Tratamiento Corto no fue efectivo en sincronizar la ovulación en 3 de las 30 ovejas tratadas. Dos pertenecieron al grupo tratado con un CIDR-G de 1er uso y la tercera al grupo tratado con un CIDR-G de 2do uso. Como fue señalado anteriormente, de las 30 hembras tratadas 25 se encontraban en fase luteal medio-tardía (10 a 13 días post-estro) y 5 en fase luteal temprana (2 a 5 días postestro) al iniciar el tratamiento. Las tres hembras que no respondieron al tratamiento se encontraban en la fase luteal temprana (días 2, 5 y 5 post-estro, respectivamente) y como se observa en la Figura 3 las respectivas concentraciones de progesterona al iniciarse el tratamiento eran bajas. Luego de retirar el CIDR-G y administrar la segunda dosis de PGF2 α (Día 6) las concentraciones de progesterona sérica disminuyeron significativamente pero no obstante esas tres ovejas mantuvieron concentraciones superiores a 1,0 ng/ml lo que refleja una persistencia de actividad luteal. Luego, las concentraciones de progesterona se incrementaron nuevamente durante 2 o 3 días y disminuyeron abruptamente y llegaron a valores subluteales. Esta disminución en las concentraciones de progesterona fue acompañada de comportamiento estral dos días después.

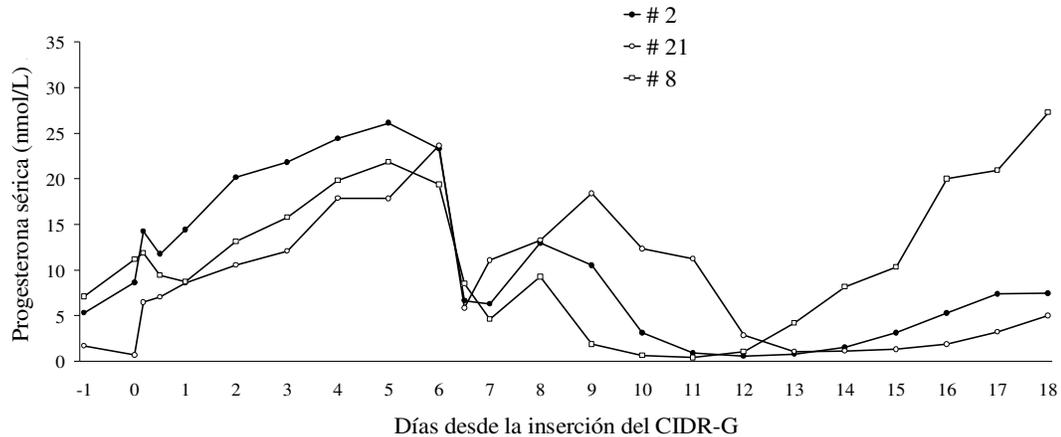


Figura 3. Concentraciones séricas de progesterona (nmol/L), de las ovejas que no respondieron a los tratamientos con CIDR-G de 1er, 2do y 3er uso durante 6 días. El Día 0 es la inserción del dispositivos y Día 6 el retiro. Al momento de la inserción y del retiro del CIDR-G todos los animales recibieron una dosis de PGF2 α . Las ovejas se encontraban en la fase luteal temprana (días 2, 5 y 5 post-estro; ovejas #21, #8 y #2, respectivamente) y pertenecían al tratamiento con CIDR-G de 1er uso (#8 y #21) y de 2do uso (#2)

Actividad del cuerpo lúteo subsiguiente

La duración de la actividad luteal y el ciclo estral subsiguiente no estuvo afectada por el dispositivo utilizado. Todas las ovejas que habían respondido con estro y ovulación (n =27) tuvieron un ciclo estral de duración normal (15 a 18 días). La duración del ciclo estral subsiguiente fue similar para las ovejas tratadas con dispositivos de 1er, 2do y 3er uso (16,5 \pm 0,9, 16,3 \pm 0,9 y 16,7 \pm 0,7 días, respectivamente). Tampoco se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de progesterona durante este ciclo para los tres grupos experimentales. Luego de la ovulación, las concentraciones de progesterona aumentaron y adquirieron los valores mas altos para los dispositivos de 1er (22,9 \pm 4,3 nmol/L) 2do (28,0 \pm 6,2 nmol/L) y 3er (21,2 \pm 6,6 nmol/L) uso en los días 11,3 \pm 0,9, 10,2 \pm 1,4 y 10,4 \pm 1,3 luego de la ovulación. Éstos valores decrecieron significativamente 13 días después de la ovulación y llegaron a valores subluteales (<3,18 nmol/L o 1 ng/mL) 14,3 \pm 1,0 días luego de la ovulación, sin encontrarse diferencias significativas entre los grupos. La duración de la fase luteal fue similar para los dispositivos de 1er, 2do y 3er uso (14,4 \pm 0,7, 14,4 \pm 1,3, 14,1 \pm 1,0 días, respectivamente).

Las concentraciones séricas de progesterona sí estuvieron afectadas por el número de ovulaciones (P< 0,05) y los datos se presentan por separado para las ovejas que ovularon uno o más de un folículo en la Figura 4. Esto no estuvo influenciado por el grupo experimental al que habían sido asignadas (P=NS). Las concentraciones de progesterona sérica fueron aumentando a medida que fue avanzando la fase luteal hasta alcanzar valores máximos al día 10 (19,8 \pm 1,7 nmol/L) y 11 (23,3 \pm 1,6 nmol/L) luego de la ovulación para las ovejas con ovulaciones simples o múltiples, respectivamente. Estos valores decrecieron significativamente al día 13 post-ovulación tanto para ovejas con

ovulaciones simples o múltiples y llegaron a niveles subluteales en los días 14 y 15, respectivamente.

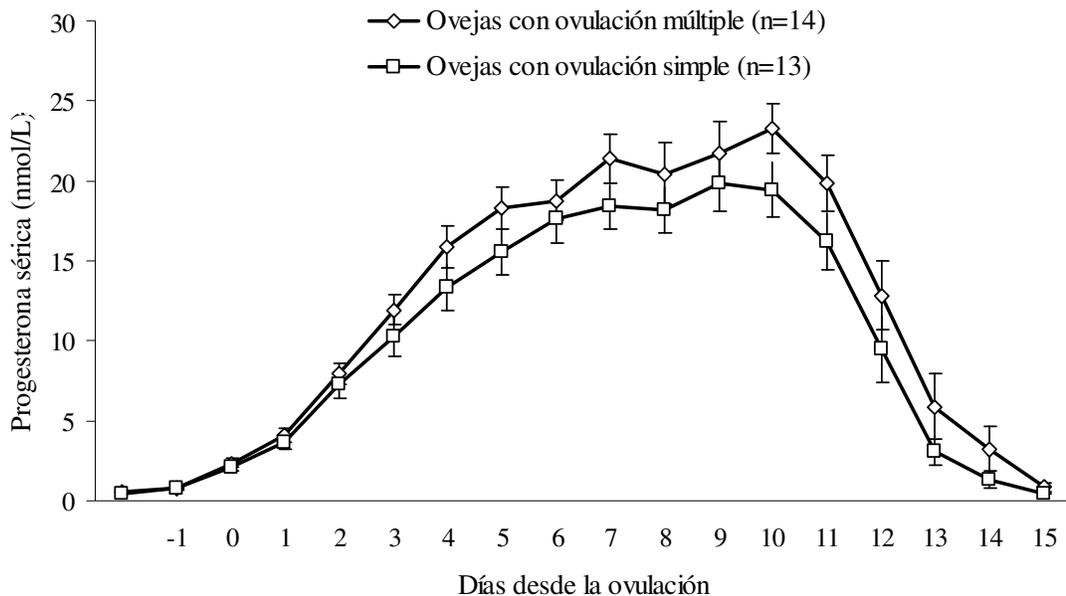


Figura 4. Concentraciones séricas de progesterona (nmol/L, media \pm DS) en el ciclo subsiguiente en ovejas que recibieron un Tratamiento Corto asociado a CIDR-G de 1er, 2do y 3er uso. Se presentan las ovejas con ovulaciones simples (n=13) o múltiples (n=14; 13 ovejas con 2 ovulaciones y una con 3 ovulaciones).

Experimento 4: Tasa de Preñez y Prolificidad

La fertilidad obtenida con dispositivos de 1er y 3er uso se muestran en la Tabla IV. La tasa de preñez obtenida con dispositivos de 3er uso mostró una tendencia estadística (P=0.06) a disminuir cuando es comparada con dispositivos de 1er uso. No se encontraron diferencias significativas en las otras variables analizadas.

Tabla IV. Tasa de preñez y número de fetos obtenidos con Inseminación Artificial a Tiempo Fijo luego de un tratamiento corto durante 6 días usando CIDR-G de 1er y 3er uso en ovejas.

	Tasa de Preñez	Fetos/Ovejas preñadas	Fetos/Ovejas tratadas
CIDR-G de 1er uso (n=158)	80,4% (127/158)	123,6% (157/127)	99,4% (157/158)
CIDR-G de 3er uso (n=161)	71,4 % (115/161)	126,1% (145/115)	90,1% (145/161)
<i>P</i>	0,06	NS	NS

9. DISCUSION

CIDR-G reutilizados: Concentraciones séricas de progesterona y dinámica folicular

Los dispositivos de primer uso indujeron mayores concentraciones de progesterona sérica comparado con los dispositivos reutilizados una y dos veces, y la mayor diferencia fue encontrada el primer día luego de su inserción, tanto en cabras como en ovejas. El pico en la concentración de progesterona sérica inducido con los dispositivos nuevos al inicio del tratamiento coincide con reportes previos, donde se describe un rápido incremento de las concentraciones de progesterona hasta el día 3 luego de la inserción de un CIDR-G (Wheaton y col., 1993; Vilariño y col., 2010; Souza y col., 2011).

Con los dispositivos reutilizados se lograron obtener concentraciones séricas de progesterona mayores a 8 y 14 nmol/L durante el primer día del tratamiento en cabras en anestro y en ovejas ciclando, respectivamente. Estas concentraciones se mantuvieron por encima de 4 nmol/L hasta el momento del retiro del dispositivo en todos los grupos experimentales. Concentraciones séricas luteales de progesterona -4,0 nmol/L (~1,3 ng/mL)- son suficientes para el bloqueo de la pulsatilidad de LH y la consecuente ovulación en ovejas (Goodman y Kash, 1980). Tanto con los dispositivos nuevos como con los reutilizados se logró bloquear el estro y la ovulación hasta el momento del retiro de los mismos, después de lo cual las concentraciones séricas de progesterona disminuyeron a valores subluteales. Estos resultados coinciden con un trabajo realizado en cabras (Souza y col., 2011), donde también evaluaron las concentraciones séricas de progesterona con dispositivos reutilizados-autoclavados hasta dos veces. Asimismo, en bovinos se encontró un mayor incremento en las concentraciones séricas de progesterona al inicio del tratamiento con dispositivos nuevos en comparación con reutilizados (Zuluaga y Williams, 2008). En ovinos, se obtuvieron resultados similares en un trabajo previo realizado por nuestro grupo, en el cual se compararon dispositivos nuevos con dispositivos reutilizados solo una vez durante seis días (Vilariño y col., 2010). Es importante destacar que en los presentes experimentos las concentraciones de progesterona, independientemente si los dispositivos fueran nuevos o reutilizados, se mantuvieron por encima de 4,0 nmol/L durante todo el tratamiento tanto en cabras como ovejas.

Como fue descrito en la introducción, las altas concentraciones de progesterona inducen el recambio folicular en ovejas y en cabras; y esto debe ser tenido en cuenta al momento de elección de un protocolo de sincronización de la ovulación. Las altas concentraciones de progesterona afectan adversamente la frecuencia de los pulsos de LH, por lo tanto se altera la secreción pulsátil de esta hormona y esto causa que el folículo dominante detenga sus funciones y comience a regresar (Stock y Fortune, 1993). De acuerdo con estudios previos en cabras, las altas concentraciones de progesterona alcanzadas luego de la inserción de un CIDR-G inducen el recambio folicular y el nuevo folículo continúa creciendo y ovula luego del retiro del dispositivo (Menchaca y col., 2007). De esta forma, con los Tratamientos Cortos la posibilidad de inducir la ovulación de folículos con una persistencia prolongada se ve disminuida en comparación con los Tratamientos Tradicionales (12 a 14 días) (Menchaca y Rubianes, 2004). En los experimentos donde

fue evaluada la dinámica folicular se encontró que en el 100% de las cabras y ovejas tratadas con CIDR-G de 1er uso se indujo el recambio folicular, mientras que con los dispositivos reutilizados este recambio folicular parece estar levemente disminuido (~80% de los animales). Esta relación entre las altas concentraciones de progesterona y la dinámica folicular fue estudiada previamente en cabras (Menchaca y Rubianes, 2001; Menchaca y Rubianes, 2002), ovejas (Rubianes y col., 1996), y ciervos (Mc Corkell y col., 2007), utilizando progesterona durante 5 a 7 días. McCorkell y col. (2007) sugirieron que las altas concentraciones de progesterona en ciervos wapiti suprimieron el crecimiento folicular, y esto permitió el incremento de FSH, resultando en la emergencia de una nueva onda folicular. En suma, con la información descrita previamente y la interpretación de los resultados actuales, podemos sugerir que el recambio folicular en estos pequeños rumiantes puede ser inducido por la progesterona por si sola. Esto marca una diferencia importante con los bovinos donde el recambio folicular inducido con las dosis habitualmente utilizadas requiere también el uso de estrógenos y/o progesterona inyectable (Bó y col., 2003).

Tratamientos Cortos con progesterona

El inicio del estro y el momento de la ovulación fueron sincronizados entre las 30-40 y las 60-70 horas luego del retiro del CIDR-G y de la administración de la eCG; y no fueron afectados por el uso de dispositivos nuevos o reutilizados. Estos resultados coinciden con reportes previos que utilizan el Tratamiento Corto en ovejas (Vilariño y col., 2010) y en cabras (Menchaca y col., 2007). Recientemente y posterior a nuestro experimento, fue publicado un trabajo en cabras Toggenburg, donde se logró sincronizar el estro y la ovulación en el 100% de las hembras utilizando el Tratamiento Corto con CIDR-G que habían sido utilizados previamente por 6 y 12 días (Souza y col., 2011). De manera similar en ovinos, se utilizó el Tratamiento Corto asociado a esponjas intravaginales con 40 o 20 mg de acetato de fluorogestona y los resultados muestran que reducir la dosis de este progestágeno a la mitad permitió sincronizar el estro y la ovulación (Letelier y col., 2009). Esta información tiene implicancias prácticas, debido a que en los programas de IATF la sincronización de la ovulación es fundamental para lograr una alta tasa de fertilidad con solo una inseminación sin detectar el estro. Asimismo, en los últimos años existe cierto interés por disminuir el uso de tratamientos hormonales en animales de producción con el objetivo de asegurar la calidad y la seguridad en los productos de origen animal para consumo humano y para protección del medio ambiente (Martin y col., 2004). Si bien la magnitud del impacto de estos tratamientos en relación a otras actividades humanas parece insignificante, el hecho de poder reutilizar los dispositivos hasta tres veces o disminuir la dosis de progestágenos en éstos es una alternativa para disminuir costos y hacer más accesibles estas biotecnologías para el sector productivo.

Tres ovejas no respondieron al Tratamiento Corto. Al momento de insertar el CIDR-G y administrar la primera dosis de PGF2 α , estas ovejas se encontraban en la fase luteal media temprana (2 a 5 días después del estro) y no hubo una respuesta luteolítica frente a la administración de PGF2 α . Cuando se administró la segunda dosis de PGF2 α (6 días después) hubo una respuesta luteolítica parcial, que no permitió lograr una luteólisis completa y posterior ovulación. En ovejas, una dosis de PGF2 α a partir del Día 3 del

ciclo estral induce la regresión del cuerpo lúteo (Rubianes y col., 2003). En este experimento las hembras no respondieron a la PGF2 α , y una posible interpretación de este resultado es que el uso de una prostaglandina natural (Dinoprost) podría no ser tan efectiva como lo son algunos análogos sintéticos como el cloprostenol (Pursley y col., 2012). No obstante, este fenómeno solo fue observado en el 10% de los animales tratados.

Tratamientos Cortos: características del ciclo subsiguiente

En ovinos, la reutilización de los CIDR-G asociados a los Tratamientos Cortos permitió obtener una actividad luteal normal en el ciclo subsiguiente, sin encontrarse diferencias significativas entre las hembras que fueron tratadas con dispositivos de primer, segundo o tercer uso. La actividad luteal inducida por el tratamiento es de interés particular dado que el mantenimiento de la gestación es dependiente de la competencia del cuerpo luteo inducido. Trabajos realizados en vacas *Bos indicus* sugieren que luego de la emergencia de una nueva onda folicular inducida por un tratamiento con progesterona y estrógeno, las menores concentraciones de progesterona inducidas con dispositivos reutilizados podrían promover mayor pulsatilidad de LH. De esta forma, el crecimiento del nuevo folículo se ve favorecido adquiriendo mayor diámetro al momento de la ovulación. Como consecuencia esto se lo asocia a una mayor capacidad de formar un cuerpo lúteo más competente que produzca más progesterona y por lo tanto mejore la fertilidad de esa hembra (Bó y col., 2003). Previamente, trabajos realizados por Burke y col. (2001) encontraron que el tamaño del folículo ovulatorio afecta el tamaño y la funcionalidad del cuerpo lúteo subsiguiente en vacas. Esta información podría explicar la hipótesis de que los dispositivos reutilizados pueden beneficiar las concentraciones de progesterona luego de la ovulación. Sin embargo, en el presente trabajo no se afectó la fase luteal subsiguiente, lo que permite suponer que las concentraciones de progesterona inducidas por los dispositivos reutilizados probablemente no fueron lo suficientemente bajas como para producir diferencias en el tamaño folicular al momento de la ovulación.

Fertilidad obtenida con la reutilización de dispositivos

La tasa de preñez obtenida en ovinos y caprinos fue similar a la obtenida en reportes previos utilizando el Tratamiento Corto, siendo entre un 60 y 80% (Menchaca y Rubianes, 2004; 2007; Martemucci y D'Alessandro, 2011). Con los dispositivos de 3er uso, se obtuvo una tasa de preñez menor que con los dispositivos de 1er y 2do uso. Ungerfeld (2009) encontró que el uso de Tratamientos Cortos durante 6 días con CIDR-G reutilizado (durante 12 o 18 días) produjo una disminución en la fertilidad en ovejas. En el presente trabajo observamos que si bien la fertilidad disminuyó con los dispositivos reutilizados, los valores fueron aceptables tanto para cabras (~70%) utilizando CIDR-G de 1er, 2do y 3er uso; como para ovejas (~60%) utilizando CIDR-G de 1er y 3er uso; considerando que se realizó una única inseminación sin detectar el estro.

10. CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados de estos experimentos demostraron que los dispositivos intravaginales liberadores de progesterona (CIDR-G, 0,3 g) luego de ser utilizados 2 o 3 veces son tan eficaces como los dispositivos nuevos para sincronizar el estro y la ovulación cuando se los aplican en un Tratamiento Corto, tanto en caprinos como en ovinos.

Las concentraciones de progesterona disminuyeron en la medida que se utilizó el dispositivo 2 o 3 veces, aunque en todos los animales se mantuvieron concentraciones séricas superiores a las necesarias para inhibir la pulsatilidad de la LH y la ovulación. Cuando se utilizaron dispositivos de primer uso se indujo el recambio folicular y la ovulación de un nuevo folículo en el 100% de las hembras, mientras que este recambio folicular se produjo en el 80% de los animales con los dispositivos de segundo y tercer uso. Las características de cada onda folicular y de los folículos ovulatorios fueron similares para las hembras tratadas con dispositivos nuevos o reutilizados.

La aplicación de Tratamientos Cortos asociados a dispositivos nuevos y reutilizados no modificó la actividad luteal del siguiente ciclo en ovinos. Las concentraciones séricas de progesterona durante el siguiente ciclo fueron similares entre las ovejas tratadas con CIDR-G nuevos y reutilizados.

El Tratamiento Corto fue efectivo en inducir y sincronizar el inicio del estro y el momento de la ovulación en el 100% de las cabras y en el 90% de las ovejas, sin mostrar diferencias entre dispositivos nuevos y reutilizados. La tasa de preñez fue del 75 al 80% cuando se utilizaron dispositivos de 1er uso, lo que confirma la eficacia de los Tratamientos Cortos en pequeños rumiantes, considerando que solo requieren una única inseminación sin detectar el estro. La reutilización de los dispositivos afectó la tasa de preñez que cayó más de diez puntos porcentuales cuando se utilizaron dispositivos por tercera vez. No obstante, la fertilidad puede considerarse aceptable al lograrse más del 60% de las hembras preñadas con estos dispositivos utilizados 3 veces. Este resultado adquiere particular interés en programas comerciales, debido a la posibilidad de obtener una fertilidad aceptable disminuyendo notoriamente el costo de estos tratamientos.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Adams GP, Singh J, Baerwald AR, 2012. Large animal models for the study of ovarian follicular dynamics in women. *Theriogenology* (*in press*).
2. Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JCH, Ginther OJ, 1992. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J Reprod Fert*;94:177-88.
3. Adams GP, Sumar J, Ginther OJ, 1990. Effects of lactational and reproductive status on ovarian follicular waves in llamas (*Lama Glama*). *J Reprod Fert*;90:535-45.
4. Baerwald A, Adams G, Pierson R, 2003. Characteristics of ovarian follicular wave dynamics in women. *Biol Reprod*;69:1023-31.
5. Bardón JC, Combessies GM, Cordeviola JM, Fiscalini B, Martínez AH, Noseda RP, 2003. Evaluación de la acción de iodopovidona y amonios cuaternarios en los dispositivos intravaginales TRIU-B frente a distintos patógenos reproductivos. En: *Proceeding of V Simposio Internacional de Reproducción Animal*;379 (abstract).
6. Baril G, Freitas VJF, Saumande J, 1998. Les traitements progestagènes d'induction/synchronisation de l'oestrus chez la chevre: le ponts sur les recherches récents. *Revue Méd Vét*;149:359-66.
7. Baruselli PS, Reis EL, Marques MO, Nasser LF, Bó GA, 2004. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anetrous beef cattle in tropical climates. *Anim Reprod Sci*;82-83:479-86.
8. Bartlewsky PM, Beard AP, Rawlings NC, 2000. Ultrasonographic study of ovarian function during early pregnancy and after parturition in the ewe. *Theriogenology*;53:673-89.
9. Bartlewsky PM, Beard AP, Cook SJ, Rawlings NC, 1998. Ovarian follicular dynamics during anestrus in ewes. *J Reprod Fert*;113:275-85.
10. Bergfelt DR, Ginther OJ, 1993. Relationship between FSH and follicular waves during the estrous cycle in mares. *Theriogenology*;39:781-96.
11. Blaszczyk B, Udala J, Gaczarzewicz D, 2004. Changes in estradiol, progesterone, melatonin, prolactin and thyroxine concentrations in blood plasma of goats following induced estrus in and outside the natural breeding season. *Small Rum Res*;51:209-19.
12. Bó GA, Baruselli PS, Martínez MF, 2003. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Anim Reprod Sci*;78:307-26.
13. Burke CR, Mussard ML, Grum DE, Day ML, 2001. Effects of maturity of the potential ovulatory follicle on induction of oestrus and ovulation in cattle with oestradiol benzoate. *Anim Reprod Sci*;66:161-74.
14. Campbell BK, Scaramuzzi RJ, Webb R, 1995. Control of follicle development and selection in sheep and cattle. *J Reprod Fert* *Suppl*;49:335-50.
15. Contreras-Solis I, Díaz T, López G, Caigua A, López-Sebastián A, Gonzalez-Bulnes A, 2008. Systemic and intraovarian effects of corpus luteum on follicular dynamics during oestrous cycle in hair breed sheep. *Anim Reprod Sci*;104:47-55.

16. Corteel JM, Lebouef B, Baril G, 1988. Artificial breeding of adults goats and kids induced with hormones to ovulate outside the breeding season. *Small Rum Res*;1:19-35.
17. Cox JF, Allende R, Lara E, Leiva A, Diaz T, Dorado J, Saravia F, 2012. Follicular Dynamics, Interval to Ovulation and Fertility After AI in Short-Term Progesterone and PGF2 α Oestrous Synchronization Protocol in Sheep. *Reprod Dom Anim (in press)*.
18. de Castro T, Rubianes E, Menchaca A, Rievero A, 1999. Ovarian dynamics, serum estradiol, and progesterone concentrations during the interovulatory interval in goats. *Theriogenology*;52:399-411.
19. Driancourt MA, 2001. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation or reproduction. *Theriogenology*;55:1211-39.
20. Dutt RH, Casida LE, 1948. Alteration of the estrual cycle in sheep by use of progesterone and its effects upon subsequent ovulation and fertility. *Endocrinology*;43:208-17.
21. Evans AC, 2003. Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. *Anim Reprdo Sci*;78:289-306.
22. Evans ACO, Flynn JD, Quinn KM, Duffy P, Madgwick S, Crosby TF, Boland MP, Beard AP, 2001. Ovulation of aged follicles does not affect embryo quality or fertility after a 14-day progestagen estrus synchronization protocol in ewes. *Theriogenology*;56:923-36.
23. Evans G, Maxwell WMC, 1990. En: Evans G, Maxwell WMC. *Inseminación artificial en ovejas y cabras*, Zaragoza, Acribia, pp. 143-164.
24. Evans G, Armstrong DT, 1984. Reduction of sperm transport in ewes by superovulation treatments. *J Reprod Fertil*;70:47-53.
25. FAO, 2012. Disponible en <http://faostat3.fao.org/home/index.html#>. Fecha de consulta: 20/08/2012.
26. Fleisch A, Werne S, Heckendorn F, Hartnack S, Piechotta M, Bollwein H, Thun R, Janett F, 2012. Comparison of 6-day progestagen treatment with Chrongest[®] CR and Eazi-breed[™] CIDR[®] G intravaginal inserts for estrus synchronization in cyclic ewes. *Small Rum Res (in press)*.
27. Flynn JD, Duffy P, Boland MP, Evans AOC, 2000. Progesterone synchronisation in the absence of a corpus luteum results in the ovulation of a persistent follicle in cyclic ewe lambs. *Anim Reprod Sci*;62:285-96.
28. Ginther OJ, Kot K, Kulick LJ, Wiltbank MC, 1997. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. *Theriogenology*;48:75-87.
29. Ginther OJ, Wiltbank MC, Fricke PM, Gibbons JR, Kot K, 1996. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol Reprod*;55:1187-94.
30. Ginther OJ, Kot K, Wiltbank MC, 1995. Association between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. *Theriogenology*;43:689-703.
31. Ginther OJ, Kot K, 1994. Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. *Theriogenology*;42:987-1001.
32. Ginther OJ, Knopf L, Kastelic JP, 1989. Ovarian follicular dynamics in heifers during early pregnancy. *Biol Reprod*;41:247-54.

33. Goodman RL, Karsh FJ, 1980. Pulsatile secretion of luteinizing hormone: differential suppression by ovarian steroids. *Endocrinology*;107:1286-90.
34. Gordon IR, 1996. *Controlled Reproduction in Sheep and Goats*. CAB International, Oxford.
35. Hawk HW, Conley HH, 1972. Investigations of sperm transport failure in ewes administered synthetic progesterone. *J Anim Sci*;34:609-13.
36. Johnson SK, Dailey RA, Inskeep EK, Lewis PE, 1996. Effect of peripheral concentrations of progesterone on follicular growth and fertility in ewes. *Dom Anim Endocr*;13:69-79.
37. Kershaw CM, Khalid M, Mc Gowan MR, Ingram K, Leethongdee S, Wax G, Scaramuzzi RJ, 2005. The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. *Theriogenology*;64:1225-35.
38. Knights M, Ramgattie R, Siew N, Singh-Knights D, Bourne G, 2011. Effectiveness of a short-term treatment with progesterone injections on synchrony of lambing and fertility in tropical hair sheep. *Anim Rep Sci*;126:70-5.
39. Letelier CA, Contreras-Solis I, García-Fernández RA, Sánchez MA, García-Palencia P, Sánchez B, Ariznavarreta C, Tresguerres JAF, Flores JM, Gonzalez-Bulnes A, 2011. Effects of oestrus induction with progestagens or prostaglandin analogues on ovarian and pituitary function in sheep. *Anim Rep Sci*;126:61-9.
40. Letelier CA, Contreras-Solis I, García-Fernández RA, Ariznavarreta C, Tresguerres JA, Flores JM, Gonzalez-Bulnes A, 2009. Ovarian follicular dynamics and plasma steroid concentrations are not significantly different in ewes given intravaginal sponges containing either 20 or 40 mg of fluorogestone acetate. *Theriogenology*;71:672-82.
41. Leyva V, Buckrell BC, Walton JS, 1998. Regulation of follicular activity and ovulation in ewes by exogenous progestogen. *Theriogenology*;50:395-416.
42. Lucy MC, Savio JD, Badinga L, De la Sota RL, Thatcher WW, 1992. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J Anim Sci*;70:3615-26.
43. Manjunatha BM, Pratap N, Samir Al-Bulushi, Hago BE, 2012. Characterization of ovarian follicular dynamics in dromedary camels (*Camelus dromedarius*). *Theriogenology (in press)*.
44. Martemucci G, D'Alessandro AG, 2011. Synchronization of oestrus and ovulation by short time combined FGA, PGF 2α , GnRH, eCG treatments for natural service of AI fixed-time. *Anim Reprod Sci*;123:32-39.
45. Martin GB, Rodger J, Blache D, 2004. Nutritional and environmental effects on reproduction in small ruminants. *Reprod Fert Dev*;16:491-501.
46. McCorkell RB, Woodbury MR, Adams GP, 2007. Evaluation of an ovarian synchronization scheme for fixed-time artificial insemination in wapiti. *Theriogenology*;67:1217-23.
47. Mc Corkell RB, Woodbury MR, Adams GP, 2006. Ovarian follicular and luteal dynamics in waptiti during the estrous cycle. *Theriogenology*;65:540-56.
48. Mc Neilly AS, Picton HM, Campbell BK, Baird DT, 1991. Gonadotrophic control of follicle growth in the ewe. *J Reprdo Fertil*;43:177-86.
49. Menchaca A, Rubianes E, 2007. Pregnancy rate obtained with short-term protocol for timed artificial insemination in goats. *Reprod Dom Anim*;42:590-93.

50. Menchaca A, Miller V, Salveraglio V, Rubianes E. Endocrine, luteal and follicular responses after the use of the Short-Term Protocol to synchronize ovulation in goats. *Anim Rep Sci* 2007;102:76-87.
51. Menchaca A, Rubianes E, 2004. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reprod Fert Dev*;16:403-14.
52. Menchaca A, Rubianes E, 2002. Relation between progesterone concentrations during the early luteal phase and follicular dynamics in goats. *Theriogenology*;57:1411-9.
53. Menchaca A, Rubianes E, 2001. Effect of high progesterone levels during the early luteal phase on the length of the ovulatory cycle of the goat. *Anim Rep Sci*;68:69-76.
54. Nash JM, Mallory DA, Ellersieck MR, Pooch SE, Smith MF, Patterson DJ, 2012. Comparison of long- versus short-term CIDR-based protocols to synchronize estrus prior to fixed-time AI in postpartum beef cows. *Anim Rep Sci*;132:11-6.
55. Palmer E, Driancourt MA, 1980. Use of ultrasonic echography in equine gynecology. *Theriogenology*;13:203.
56. Pierson RA, Ginther OJ, 1984. Ultrasonography of the bovine ovary. *Theriogenology*; 21:495-504.
57. Pinczak A, Menchaca A, Rubianes E, 2001. Seguimiento ultrasonográfico ovárico y uterino durante la gestación temprana de la cabra. IV Simposio Internacional de Reproducción Animal. Córdoba, Argentina, p. 298 (abstract).
58. Pursley JR, Martins JPN, Wright, Stewart ND, 2012. Compared to dinoprost tromethamine, cloprostenol sodium increased rates of estrus detection, conception and pregnancy in lactating dairy cows on a large commercial dairy. *Theriogenology*;78:823-9.
59. Ravindra JP, Rawlings NC, Evans AOC, Adams GP, 1994. Ultrasonographic study of ovarian follicular dynamics in ewes during the oestrus cycle. *J Reprod Fert*;101:501-9.
60. Revah I, Butler WR, 1996. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. *J Reprod Fert*;106:39-47.
61. Robinson TJ, 1965. Use of progestagen-impregnated sponges inserted intravaginally or subcutaneously for control of oestrous cycle in sheep. *Nature*;206:39-41.
62. Rubianes E, Menchaca A, 2006. Advances in estrus synchronisation and superovulation treatments in sheep. *Acta Scientiae Veterinariae*;34 (Supl):251-63.
63. Rubianes E, Menchaca A, 2003. The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats. *Anim Reprod Sci*;78:271-287.
64. Rubianes E, Menchaca A, Carbajal B, 2003. Response of the 1 to 5 aged ovine corpus luteum to Prostaglandin F_{2α}. *Anim Reprod Sci*;78:47-55.
65. Rubianes E, de Castro T, Kmaid S, 1998. Estrous response after a short progesterone priming in seasonally anestrous goats. *Theriogenology*;49:356 (abstract).
66. Rubianes E, de Castro T, Carbajal B, 1996. Effect of high progesterone levels during the growing phase of the dominant follicle of Wave 1 in ultrasonically monitored ewes. *Can J Anim Sci*;76:473-5.

67. Savio JD, Thatcher WW, Morris GR, Entwistle K, Drost M, Mattiacci MR, 1993. Effects of induction of low plasma progesterone concentrations with a progesterone-releasing intravaginal device on follicular turnover and fertility in cattle. *J Reprod Fertil*;98:77-84.
68. Savio JD, Keenan L, Boland MP, Roche JF, 1988. Pattern of growth of dominant follicles during the estrous cycle of heifers. *J Reprod Fert*;83:663-71.
69. Scaramuzzi RJ, Martensz ND, Van Look PF, 1980. Ovarian morphology and the concentration of osteroids, and of gonadotrophins during the breeding season in ewes actively immunized against oestradiol-17 beta or oestrone. *J Reprod Fertil*;59:303-10.
70. Sirois J, Fortune JE, 1988. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol Reprod*;39:308-17.
71. Smith MF, McIntush A, Smith GW, 1993. Mechanisms associated with corpus luteum development. *J Anim Sci*;72:1857-72.
72. Snedecor G, Cochran WG, 1982. *Métodos estadísticos*. Editorial Continental S.A. México, DF.
73. Souza JMG, Torres CAA, Maia ALRS, Brandao FZ, Bruschi JH, Viana JHM, Oba E, Fonseca JF, 2011. Autoclaved, previously used intravaginal progesterone devices induces estrus and ovulation in anestrous Toggenburg goats. *Anim Reprod Sci*;129:50-5.
74. Stata Corp 2003. *Stata Statistical Software: Release 8.0* College Station, TX: Stata Corporation.
75. Stock AE, Fortune JE, 1993. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology*;132:1108-114.
76. SUL, 2012. Disponible en: <http://www.sul.org.uy/estadisticas.asp>
Fecha de consulta: 20/07/2012.
77. Thiery JC, Martin GB, 1991. Neurophysiological control of the secretion of gonadotrophin-releasing hormone and luteinizing hormone in the sheep. A review. *Rep Fertil Dev*;3:137-73.
78. Ungerfeld R, 2009. The induction of oestrus in ewes during the non-breeding season using pre-used CIDRs and oestradiol-17 β treatment. *Small Rum Res*;84:129-31.
79. Ungerfeld R, Forsberg M, Rubianes E, 2004. Overview of the response of anoestrous ewes to the ram effect. *Reprod Fert Dev*;16:479-90.
80. Ungerfeld R, Rubianes E, 1999. Effectiveness of short progestagen priming for the induction of fertile oestrus with eCG in ewes during late seasonal anoestrus. *Anim Sci*;68:349-53.
81. Van Cleef J, Karsch FJ, Padmanabhan V, 1998. Characterization of the endocrine events during the peri-estrous period in sheep after estrous synchronization with control internal drug releasing (CIDR) device. *Domest Anim Endocrinol*;15:23-34.
82. Van Cleef J, Lucy MC, Wilcox CJ, Thatcher WW, 1992. Plasma and milk progesterone and plasma LH in ovariectomized lactating cows with new or used controlled internal drug release devices. *Anim Reprod Sci*; 27:91-106.

83. Vilariño M, Rubianes E, van Lier E, Menchaca A, 2010. Serum progesterone concentrations, follicular development and time of ovulation using a new progesterone releasing device (DICO®). *Small Rum Res*;91:219-24.
84. Viñoles C, Forsberg M, Banchero G, Rubianes E, 2001. Effect of long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. *Theriogenology*;55:993-1004.
85. Viñoles C, Meikle A, Forsberg M, 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*;51:1351-61.
86. Wheaton JE, Carlson KM, Windels HF, Johnston LJ, 1993. CIDR: A new progesterone-releasing intravaginal device for induction of oestrus and cycle control in sheep and goats. *Anim Reprod Sci*;33:127-41.
87. Zuluaga JF, Williams GL, 2008. High-pressure steam sterilization of previously used CIDR inserts enhances the magnitude of the acute increase in circulating progesterone after insertion in cows. *Anim Reprod Sci*;107:30-5.

12. PUBLICACIONES

Publicación I: Re-use of intravaginal progesterone devices associated with the Short-Term Protocol for timed artificial insemination in goats. Vilariño M., Rubianes E., Menchaca A. Theriogenology, 2011;75:1195-1200.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X10006230>

Publicación II: Ovarian responses and pregnancy rate with previously used intravaginal progesterone releasing devices for fixed-time artificial insemination in sheep. Vilariño M., Rubianes E., Menchaca A. Theriogenology 2013;79:206-10.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X12005705>