



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay

UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**EFFECTO DE LA ADMINISTRACION DE UNA SOLUCION
NEOGLUCOGENICA SOBRE LA FOLICULOGENESIS Y LA TASA
OVULATORIA EN OVEJAS CORRIEDALE EN PASTOREO**

CARLOS RAFAEL LOPEZ MAZZ

TESIS DE MAESTRIA EN REPRODUCCION ANIMAL

**URUGUAY
2009**



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay

UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**EFFECTO DE LA ADMINISTRACION DE UNA SOLUCION
NEOGLUCOGENICA SOBRE LA FOLICULOGENESIS Y LA TASA
OVULATORIA EN OVEJAS CORRIEDALE EN PASTOREO**

CARLOS RAFAEL LOPEZ MAZZ

DV. MSc. PhD. Raquel Pérez Clariget
Directora de Tesis

Ing. Agr. PhD. Ricardo Rodríguez Iglesias
Co - director

DV. MSc. Alvaro López
Co - director

2009

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE

DEFENSA DE TESIS

Rodolfo Ungerfeld Moron; MSc, PhD.

Facultad de Veterinaria - Uruguay

Edgardo Rubianes Mangini; MSc, PhD.

Agencia Nacional de Investigación e Innovación - Uruguay

Georgget Banchemo Hunziker; DMV, MSc, PhD.

Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias - Uruguay

Para Victoria y Rodrigo

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de tesis ha sido posible gracias al apoyo de varias Instituciones y de una gran cantidad de personas a las cuales quiero transmitir mi más sincero agradecimiento.

A la Facultad de Agronomía y en especial a la Estación Experimental Bernardo Rosengurtt, por su permanente apoyo durante estos años. A la Facultad de Veterinaria, mi otra casa, por recibirme como estudiante en el inicio del Programa de Postgrados y a la Comisión Académica de Postgrado y la Comisión Coordinadora del Interior de la Universidad de la República por el apoyo financiero que me permitió culminar mis estudios de maestría.

A Raquel, mi directora de tesis, por su apoyo permanente, estímulo constante y su espíritu crítico. Le agradezco su incansable esfuerzo para introducirme en el mundo de la investigación “dura y pura” tratando de rescatarme de mi constante visión productiva de los ovinos.

A Ricardo Rodríguez Iglesias por sus aportes y sugerencias en los difíciles momentos del comienzo de esta tesis y por las largas horas compartidas realizando laparoscopia.

Un agradecimiento para Álvaro López por su apoyo y colaboración en los momentos más duros del trabajo de campo, luchando con la glucemia de las ovejas y la propia.

A todos los funcionarios de la Estación Experimental Bernardo Rosengurtt. A Carlos García por su participación y apoyo en el trabajo de campo. A Carlos Ney Acosta, Oscar Cáceres, Baltasar Martínez, Ricardo Penen y Dorrel Bentancor que me ayudaron con el cuidado y el manejo de las ovejas. Mi agradecimiento a Tito, María y Blanquita, por su colaboración permanente en estos años.

A todos mis compañeros del grupo disciplinario de Fisiología y Reproducción Animal que me hicieron el aguante durante este tiempo, asumiendo muchas de mis responsabilidades académicas.

Un agradecimiento especial a Yerú Pardiñas, compañero de trabajo y director de la Estación Experimental Bernardo Rosengurtt, por su confianza y permanente apoyo.

A Fernando Perdigón y Pablo Marinho, por su apoyo y su tiempo para hacer las laparoscopias.

A Gonzalo Uriarte del Laboratorio “Miguel C. Rubino”, por su excelente disposición e invaluable ayuda con el procesamiento de las muestras de glucosa.

A Gonzalo Leániz del Laboratorio Santa Elena por la importante contribución con las muestras de Acetolena®.

Al Profesor Brian Crooker y el laboratorio de la Universidad de Minnesota donde se procesaron las muestras de IGF-I. A Mariana Carriquiry por su ayuda con el procesamiento de las muestras de IGF-I y su invaluable colaboración en los análisis estadísticos.

A Juan Burgueño, Ana Espasandín, Juan Cabris y Antonia Scarsi por su apoyo en los análisis estadísticos.

A Leticia Quagliotto del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable por la “Glicil glicina” que me permitió realizar parte del procesamiento de las muestras de IGF-I en nuestro país.

Al laboratorio Bayer ® por proporcionarme las tiras reactivas para la determinación de la glucosa y a Diana Buchelli por facilitarme el equipo para las determinaciones de las mismas.

A Graciela Quintans y Georgget Banchemo del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria por brindarme todo el apoyo para poder realizar los estudios ultrasonográficos.

Un agradecimiento a Ana Astessiano, Carolina Chiesa y Alicia Vaz compañeras de trabajo que me dieron todo su apoyo.

A todos los estudiantes de grado, becarios y tesistas que siempre aportan su esfuerzo con entusiasmo y dedicación. Sin la participación de ellos todo sería mucho más difícil, a ellos y en ellos mi absoluto convencimiento de que el trabajo colectivo es necesario y nos señala el camino para alcanzar objetivos comunes. A Germán Panissa, Pancho Peñagaricano, Matías Ocampo, Onna Syrvis, Jorge Souza, Andrea Regalado, Nicolás Vázquez, Julieta Souza y Francisco Pelfort.

A mis padres y mi hermano por su apoyo permanente.

Especialmente para Mariel, gracias por la paciencia, por el corazón y por esos ojos.

INDICE

AGRADECIMIENTOS	i
LISTA DE CUADROS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	ix
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES ESPECIFICOS	4
1. Estacionalidad reproductiva, ciclo estral y control endocrino	5
2. Ovogénesis y foliculogénesis	7
3. Nutrición de los ovinos en pastoreo	10
3.1. Metabolismo de los carbohidratos	10
3.2. Glucosa y neoglucogenesis hepática	10
3.3. Importancia de la glucosa en los procesos productivos y reproductivos	11
4. Factores que afectan la tasa ovulatoria	11
4.1. Efecto de la nutrición sobre la tasa ovulatoria	12
4.2. Efecto de la composición de la dieta (energía-proteína) y tiempo de administración sobre la tasa ovulatoria	13
4.3. Efecto de la nutrición sobre la glucemia, hormonas metabólicas y reproductivas	16
5. Posibles mecanismos de acción para la multiovulación	18
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
HIPOTESIS	21
OBJETIVOS	21
ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACION	22
MATERIALES Y METODOS GENERALES	23
EXPERIMENTOS PILOTOS	30
Materiales y métodos	
Resultados	
Discusión	

EXPERIMENTO I	38
Materiales y métodos	
Resultados	
Discusión	
EXPERIMENTO II	43
Materiales y métodos	
Resultados	
Discusión	
CONCLUSIONES GENERALES	55
IMPLICANCIAS PRÁCTICAS	55
ABREVIATURAS	57
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	58
ANEXOS	

Publicación I: "Comparison of different doses of two neoglucogenic solution in sheep with different physiological status". XV Congreso Internacional sobre Reproducción, Porto Seguro, Brasil, 2004.

Publicación II: "Effect of administration of a gluconeogenic solution on ovulation rate and glycemia in cyclic Corriedale sheep". Proceedings of the Symposium on Reproduction in Small Ruminants, Colonia del Sacramento, Uruguay, 2004. *Reproduction, Fertility and Development*, 16(4), p. 522.

Publicación III: "La administración de una solución neoglucogénica incrementa el reclutamiento folicular en ovejas en anestro". Congreso de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal (ALPA). Asociación Peruana de Producción Animal (APPA). XX Reunión ALPA - XXX Reunión APPA - V Congreso GDP, Cusco, Perú, 2007. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, v. 15, 1, p. 328-329.

LISTA DE CUADROS

Cuadro I	Antecedentes de trabajos experimentales administrando oralmente soluciones neoglucogénicas en base a glicerol y propilenglicol y su efecto sobre la tasa ovulatoria.	15
Cuadro II	Porcentaje de ovejas Corriedale de una muestra de la majada experimental de la EEBR ciclando espontáneamente en el mes de abril, número de ovulaciones únicas, dobles y tasa ovulatoria.	24
Cuadro III	Efecto del tipo de anticoagulante, temperatura de almacenamiento y tiempo de procesamiento sobre la concentración de glucosa en plasma (media \pm EEM; g/L) en ovejas (Experimento 1.1)	31
Cuadro IV	Efecto de diferentes técnicas para determinar la concentración de glucosa en plasma y del origen de la muestra de sangre sobre la glucemia (media \pm EEM; g/L) en ovejas (Experimento 1.2).	32
Cuadro V	Concentración de glucosa (media \pm EEM; g/L) según el lugar donde permanecieron alojadas las ovejas (galpón o potrero), desde 12h previas hasta 24h posteriores al comienzo de la administración de las soluciones.	35
Cuadro VI	Concentración de glucosa en plasma (media \pm EEM; g/L) en ovejas tratadas con dosis incrementales de una solución neoglucogénica preparada (SGP), una solución neoglucogénica comercial (SGC) y agua destilada.	36
Cuadro VII	Glucemia (media \pm EEM;g/L) en ovejas Corriedale después de la administración de dosis incrementales (75, 100, 125 y 150 mL) de agua destilada o una solución neoglucogénica comercial.	40
Cuadro VIII	Efecto de la inducción y sincronización de celo utilizando durante 6 días una EIV con 10 mg de MAP, efecto macho y ovejas en celo, sobre el porcentaje de estro y ovulación en ovejas Corriedale en anestro estacional (noviembre) en el GC y SGP.	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Porcentaje de señalada anualizado para los últimos 20 años (Fuente: SUL en base DICOSE e INAC).	2
Figura 2	Evolución de las diferentes categorías de ovinos (Fuente: DICOSE).	3
Figura 3	Evolución del total ovinos, total de ovejas de cría y porcentaje de señalada (Fuente: DICOSE).	4
Figura 4	Estrategia metodológica utilizada en el desarrollo de la tesis	23
Figura 5	Peso vivo (kg) y condición corporal (unidades) de las ovejas de la majada experimental previo al inicio de los servicios durante el periodo 1996-2004.	25
Figura 6	Representación gráfica del diseño experimental para validar el tipo de solución neoglucogénica, la dosis y la frecuencia de administración.	35
Figura 7	Representación gráfica del diseño del experimento I	39
Figura 8	Representación gráfica del diseño del experimento II	45
Figura 9	Distribución de ovejas en celo en el GC y SGP luego de retirar las EIV (hora 0) e introducir los machos y ovejas en celo.	47
Figura 10	Concentración plasmática de glucosa (media \pm EEM; g/L) en ovejas a las que se les administró una SGP o agua destilada en relación al momento de inicio de los tratamientos (hora 0).	48
Figura 11	Concentración plasmática de insulina (μ UI/ml) en ovejas del GC y SGP.	49
Figura 12	Concentración en plasma de IGF-I (ng/mL) en ovejas a las que se les administró una SGP y agua destilada en relación al momento de las dosificaciones.	50
Figura 13	Número total de folículos de 2 mm en el grupo SGP y GC y de 3 mm en el grupo SGP y GC en relación al día de inicio de las dosificaciones.	51

RESUMEN

La presente tesis tuvo como objetivos desarrollar una metodología para aumentar la glucemia durante 24 horas utilizando la administración oral de una solución neoglucogénica y evaluar los efectos de una hiperglucemia inducida durante 24 horas durante la fase folicular, sobre los cambios metabólicos, la foliculogénesis, y la tasa ovulatoria en estación reproductiva y en anestro estacional en ovejas pastoreando campo nativo.

Se realizaron tres trabajos pilotos y dos trabajos experimentales. Se observó que el tipo de anticoagulante utilizado para colectar las muestras de sangre afecta la estimación de la concentración de glucosa plasmática, mientras que, no se observó efecto de la temperatura y el tiempo de almacenamiento sobre la estimación de la misma. Asimismo, para una misma muestra de sangre, los valores de glucemia determinados con el método enzimático (kit de laboratorio) estuvieron en promedio un 21,5 % por encima que cuando la determinación fue realizada con la técnica de las tiras reactivas (glucometer). Los resultados revelan la presencia de correlaciones significativas y positivas entre la glucemia estimada por la técnica de las tiras reactivas en sangre yugular y periférica.

Dosis incrementales de 75, 100, 125 y 150 mL administradas cada 6 horas no resultaron en un aumento de la glucemia durante 24 horas. Por su parte, la administración de 125 mL cada 6 horas de una solución neoglucogénica preparada (70% glicerol, 20% propilenglicol y 10% agua destilada) demostró ser un método efectivo para inducir una hiperglucemia durante 24 horas en ovejas pastoreando campo nativo.

Una hiperglucemia inducida durante 24 horas a ovejas en anestro estacional, inducidas a ovular con esponjas intravaginales conteniendo 10 mg de acetato de medroxiprogesterona asociado con efecto macho y ovejas en celo, aumentó la concentración plasmática de insulina y disminuyó la concentración plasmática de IGF-I durante el periodo de hiperglucemia. Tanto la glucosa como la insulina volvieron a los valores anteriores al tratamiento 48 horas después de la última administración de la solución neoglucogénica.

La hiperglucemia incrementó el número de folículos de 2 mm de diámetro a las 24 horas de iniciada, aumentó el diámetro del folículo ovulatorio y tendió a incrementar los folículos de 3 mm 72 horas después. Sin embargo, no modificó el número de cuerpos lúteos registrados en ambos ovarios.

En conclusión, como resultado de esta tesis se cuenta con una metodología efectiva para inducir una hiperglucemia durante 24 horas en ovejas pastoreando campo nativo. Los datos también sugieren que una hiperglucemia de 24 horas provocada en fase folicular en ovejas en anestro estacional inducidas a ovular promovió cambios en la concentración de las hormonas insulina e IGF-I y en la foliculogénesis, pero falló en aumentar la tasa ovulatoria en ovejas Corriedale pastoreando campo nativo.

Palabras claves: Tasa ovulatoria, solución neoglucogénica, glucosa, insulina, IGF-I, foliculogénesis, ovejas Corriedale.

ABSTRACT

This thesis aimed to develop a methodology to increase glycemia for 24 hours using oral administration of a neoglucogenic solution and evaluate the effects of hyperglycemia induced for 24 hours during the follicular phase, on the metabolic changes, folliculogenesis, and ovulation rate in breeding season and seasonal anestrus in sheep grazing native pasture.

There were three work pilots and two experimental. It was noted that the type of anticoagulant used to collect blood samples affects the estimation of plasma glucose concentration, whereas no effect of temperature and storage time on the estimation of it. Also, for the same sample of blood glucose values determined using enzymatic method (laboratory kit) were on average 21.5% higher than when the determination was made with the technique of test strips (glucometer). The results reveal the presence of a positive correlation between the glucose estimated by the technique of test strips in jugular and peripheral blood.

Incremental doses of 75, 100, 125 and 150 mL given every 6 hours did not result in an increase in glucose for 24 hours. For its part, the administration of 125 mL every 6 hours in a prepared neoglucogenic solution (70% glycerol, 20% propylene glycol and 10% distilled water) proved to be an effective method to induce hyperglycaemia for 24 hours in sheep grazing native pasture.

Hyperglycemia induced for 24 hours in anoestrus ewes, induced to ovulate with intravaginal sponges containing 10 mg of medroxyprogesterone acetate associated with male effect and ewes in estrus, increased plasma insulin and decreased plasma IGF-I during the period of hyperglycemia. Both glucose and insulin returned to pre-treatment values 48 hours after the last administration of the neoglucogenic solution.

Hyperglycemia increased the number of follicles 2 mm in diameter at 24 hours after the start, increased the diameter of the ovulatory follicle and follicles tended to increase from 3 mm 72 hours later. However, did not alter the number of corpora lutea recorded in both ovaries.

In conclusion, as a result of this thesis has an effective methodology to induce hyperglycaemia for 24 hours in sheep grazing native pasture. The data also suggest that a 24 hour hyperglycemia induced follicular phase in seasonally anestrus ewes induced to ovulate, promoted changes in the concentration of the hormones insulin and IGF-I and folliculogenesis, but failed to increase ovulation rate in Corriedale sheep grazing native pasture.

Keywords: ovulation rate, neoglucogenic solution, glucose, insulin, IGF-1, folliculogenesis, Corriedale sheep.

INTRODUCCIÓN

La producción ovina en el Uruguay tiene más de 150 años de historia y durante ese período ha tenido una destacada participación en el desarrollo económico y social de nuestro país. Desde el comienzo de su explotación comercial (1860), los ovinos mostraron un importante potencial para producir y reproducirse en los sistemas pastoriles extensivos. En el período de 1860 a 1868, la población ovina aumentó significativamente, pasando de 3 a 16 millones de cabezas y duplicó en el mismo período, el rendimiento de la producción de lana por animal (Barrán, 1974).

La producción agropecuaria en el Uruguay, se desarrolla en un área cercana a los 16 millones de hectáreas y representa el 8,8% del PBI agropecuario (DIEA, 2007). En el año 2007, el rubro ovino contribuyó con el 6,7% del total de las exportaciones del país, representando un incremento del 16% respecto al año 2006 (SUL, 2007). La producción de lana en base sucia para el período 2005/06 fue de 46,3 millones de kilos, un 18% más que el año 2004 (SUL, 2007). Para el mismo período, la faena comercial de ovinos se incrementó un 28% en relación al año 2004, observándose un aumento del 50% de corderos faenados respecto a las categorías de animales adultos. De esta forma, se consolida la presencia de nuevos productos de carne ovina de calidad (cordero pesado, pesado precoz), los cuales incorporan mayor valor agregado a los productos cárnicos ovinos de exportación (Vincent, 2002; Azzarini, 2003). En el año 2008 el ingreso de divisas por concepto de exportaciones totales de carne ovina logró el record de U\$ 71 millones, un incremento del 46 % con respecto al año anterior (INAC, 2008).

La producción ovina es una actividad con un fuerte impacto social (Barrán, 1974) con una cadena agroindustrial generadora de una importante cantidad de fuentes de trabajo (Instituto de Economía, 1999). Montossi et al. (2003) estiman que el 57% del total de los ingresos de los pequeños y medianos productores ganaderos, está asociado de alguna manera con la producción ovina.

Un 98% de las explotaciones ganaderas en el Uruguay presentan sistemas mixtos de producción integrados por bovinos y ovinos (DIEA, 2007). La característica mixta de estos sistemas productivos, a pesar de los diferentes hábitos de alimentación de ambas especies establece una clara competencia por el recurso forrajero existente.

Del total de establecimientos que tienen ovinos, solamente el 21% se dedica de manera especializada a esta actividad, concentrando el 31,6% de la población ovina y ocupando el 13% de la superficie destinada a la ganadería, con un muy bajo porcentaje de praderas permanentes o algún tipo de mejoramiento de campo (Salgado, 2004).

La población ovina a junio del año 2007 era de 10,4 millones de cabezas, observándose una reducción del 6,3% respecto al año 2006, con una disminución porcentual de un 17% y 1,8% respectivamente, para las categorías de capones y ovejas de cría (DICOSE, 2007). Se consolida de

esta manera, una tendencia a una menor cantidad de animales productores de lana y un incremento de hembras de cría en la majada nacional.

La ovinocultura en el Uruguay, presenta una clara regionalización productiva, desarrollándose en suelos con bajo potencial de producción de forraje y donde las pasturas nativas son el componente central del manejo nutricional. Un 66% de los ovinos, se concentran en suelos de basalto y cristalino, 55% y 11% respectivamente (De los Campos et al., 2002). Las características de estos suelos y las especies vegetales existentes, determinan que el 65% de la producción anual de forraje (en kg de materia seca/ha/año) es producida en primavera y verano y solamente el 20% en el otoño (Formoso, 2006).

La dinámica de estos sistemas pastoriles incluye procesos de transferencia de energía muy ineficientes (Viglizzo, 1981), que conjuntamente con las variaciones agro climatológicas, el tipo de suelos y la composición botánica del tapiz, determinan una importante variación anual e interanual en las características cuanti y cualitativas de las pasturas producidas.

En este contexto y desde hace muchos años, la majada nacional manifiesta una clara ineficiencia reproductiva, que se traduce en porcentajes de señalada, que hace más de cuatro décadas se encuentran entre un 60% y 75% (Cardelino, 1970; Azzarini, 1983; Azzarini & Fernández Abella, 2004). Este porcentaje de señalada fluctúa entre años, como consecuencia de las variaciones en las precipitaciones y por consiguiente de la disponibilidad de forraje (Figura 1).

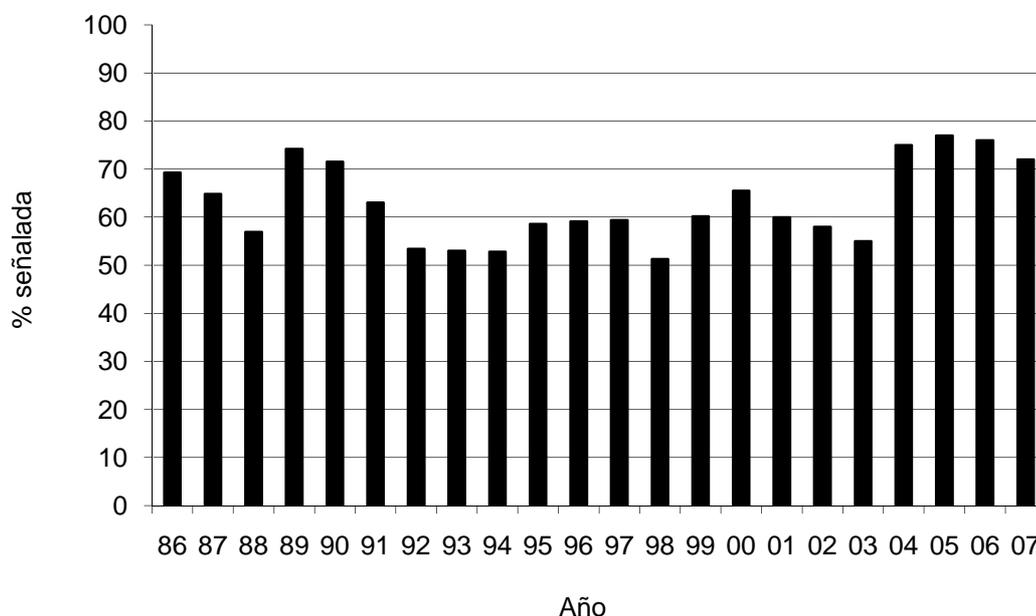


Figura 1. Porcentaje de señalada anualizado para los últimos 20 años (Fuente: SUL en base DICOSE).

La composición racial de la majada nacional presenta una clara mayoría de razas de doble propósito (Corriedale 60%, Ideal 8% y Merilín 3%), sin embargo, hasta la mitad de la década del 90 la producción ovina presentó un

perfil definitivamente lanero, donde la carne ovina era un producto secundario y de baja calidad.

A mediados de la década de los 90, condiciones desfavorables en el mercado internacional de la lana y una coyuntura favorable para el desarrollo de la producción bovina (Vincent, 2002), determinaron una drástica reducción del número de ovejas a nivel mundial; que en el caso de Uruguay se materializó en una disminución cercana al 60% del total de existencias entre el año 1993 y el 2003 (DICOSE, 2007). Simultáneamente comenzó un proceso de reestructuración de la majada nacional (Figura 2) con una disminución en la categoría de capones y un incremento en las ovejas, marcando una orientación más clara hacia la cría y la producción de corderos (Salgado, 2004; Vincent, 2002).

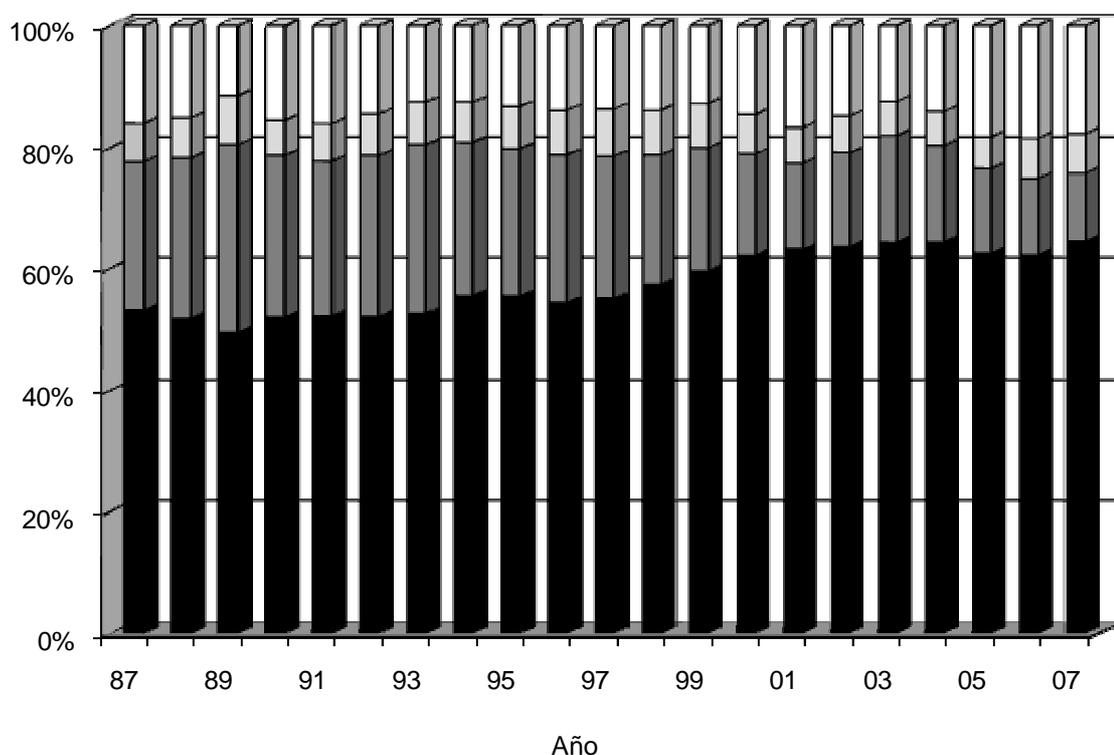


Figura 2. Evolución de las diferentes categorías de ovinos. Ovejas encarneradas (■), capones (■), borregas 2-4 sin encarnerar (■), borregas diente de leche (□). (Fuente: DICOSE).

En los primeros meses del año 2008, el mercado internacional para la lana y la carne ovina muestra una demanda sostenida y precios elevados, con expectativas que los mismos se mantengan en el tiempo. Esta promisorio situación, se encuentra nuevamente con la restricción de una población ovina, que a junio de 2008, se estima, sufra una nueva disminución del orden del 3% respecto al año 2007 (OPYPA, 2007). Si bien las ovejas de cría se han mantenido en los últimos 4 años en torno a los 5 millones de

cabezas y los índices de señalada han promediado para ese período el 74%, un 9% superior a los valores históricos, la prolificidad de las majadas sigue siendo insuficiente para poder incrementar la población ovina (Figura 3).

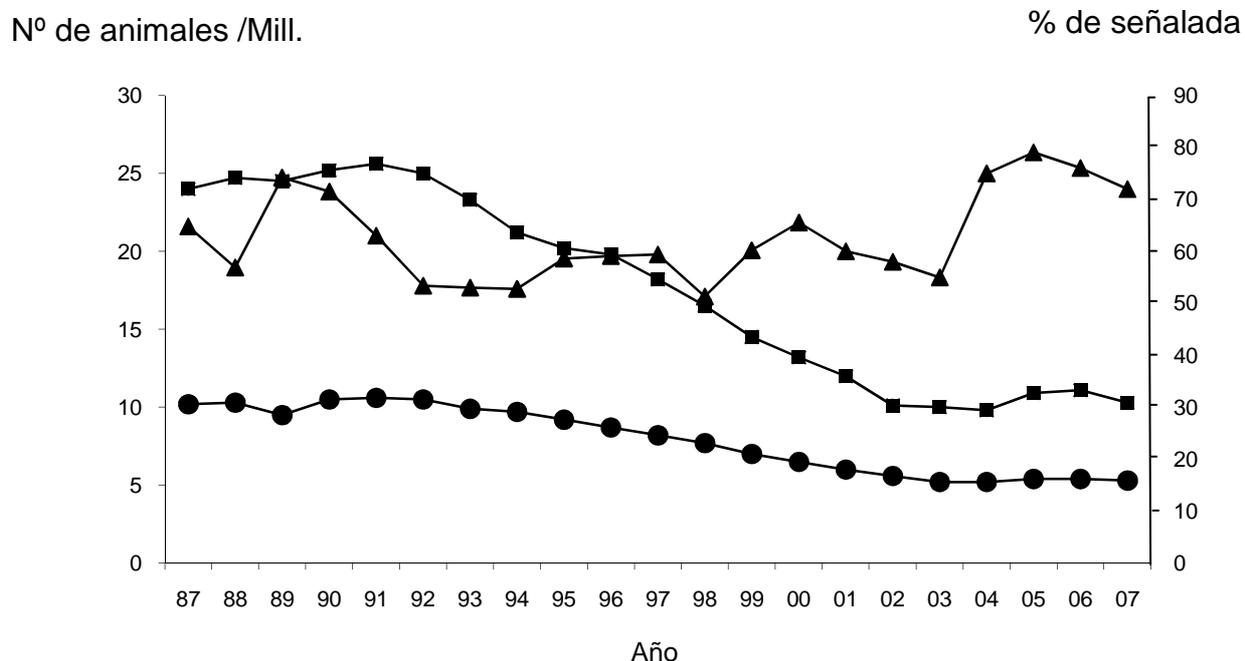


Figura 3. Evolución del total de ovinos, total de ovejas de cría y porcentaje de señalada. Total de ovinos (■), ovejas encarneradas (●) y porcentaje de señalada (▲). (Fuente: DICOSE).

En este contexto, cualquier estrategia que apunte a incrementar los actuales porcentajes de señalada, debe necesariamente contemplar el incremento del porcentaje de ovejas con partos múltiples y la disminución de la mortalidad de corderos.

ANTECEDENTES ESPECIFICOS

La influencia de la alimentación sobre el potencial productivo de los ovinos se conoce desde hace mucho tiempo. A comienzos del siglo XX, Francis & Marshall (1905) mencionaban el efecto que la alimentación y el medio ambiente ejercen sobre la fertilidad de la oveja y otras especies.

La tasa reproductiva (número de corderos viables destetados anualmente por oveja destinada a la reproducción) es una de las variables que mayor impacto tiene en la eficiencia biológica y económica de los sistemas de producción ovina (Azzarini, 1992). De los tres componentes que definen la tasa reproductiva: fertilidad (número de ovejas preñadas / número de ovejas servidas con un carnero de probada fertilidad), prolificidad (número de cordero nacidos / número de ovejas paridas) y supervivencia de los corderos (número de corderos vivos al destete / número de corderos nacidos), la prolificidad es la que expresa y maximiza el potencial reproductivo de la especie ovina (Azzarini, 1992). La prolificidad está determinada por la tasa ovulatoria (número de ovocitos liberados en un estro), por la tasa de

fertilización (ovocitos fecundados / total de ovocitos liberados) y la supervivencia embrionaria y fetal. La tasa ovulatoria (TO) determina el potencial de la prolificidad y en consecuencia la tasa reproductiva, el porcentaje de señalada, el número de corderos y los kilos de carne que se pueden comercializar.

1. Estacionalidad reproductiva, ciclo estral y control endocrino

En los mamíferos un mecanismo circadiano alojado en el núcleo supraquiasmático hipotalámico que recibe los estímulos lumínicos a través del eje retinohipotalámico es propuesto como responsable de captar la longitud del día como base para regular los cambios estacionales en la fisiología y el comportamiento. Ese regulador circadiano endógeno modula la secreción rítmica de la melatonina producida en la noche por la glándula pineal (Goldman, 2001).

La oveja es una especie poliéstrica estacional de día corto (Hafez, 1952), alternando en el año un período de actividad sexual con celos y ovulaciones y un periodo de anestro. El comienzo de la actividad sexual está influenciado por la raza, factores genéticos, la edad y el peso vivo de la hembra.

En nuestras condiciones pastoriles, la estación reproductiva para la raza Corriedale se extiende desde fines del mes de enero hasta el mes julio, con un período de mayor fertilidad y prolificidad en los meses de marzo y abril (Cavestany et al., 1991; Fernández Abella et al., 1996).

El control y la regulación de la actividad reproductiva se realizan a través de un mecanismo neuroendocrino que incluye la interacción del hipotálamo, la hipófisis, los ovarios y el útero. La hormona liberadora de las gonadotrofinas (GnRH) sintetizada en el hipotálamo (Austin & Short, 1988), es la principal señal neuroendocrina que regula la secreción de las gonadotrofinas hipofisarias (Clarke & Cummins, 1982; Moenter et al., 1992). La GnRH modula la síntesis y secreción de las gonadotrofinas (hormona folículo estimulante-FSH y hormona luteinizante-LH) actuando a nivel de células localizadas en la adenohipofisis a través de una alta afinidad con sus receptores de membrana (Thiéry & Martin, 1991). Durante la estación reproductiva, la frecuencia de pulsos de secreción de GnRH/LH es fundamental para que se desencadene la secuencia de eventos neuroendocrinos que conducen a la ovulación.

El ciclo estral (CE) se define como el intervalo de tiempo comprendido entre dos estros consecutivos. Una vez que la hembra alcanza la pubertad, durante la estación de cría y bajo control neuroendocrino, la oveja presenta cada 17 días en promedio, un estro que dura de 24 a 36 horas y una ovulación que ocurre 24 a 30 horas después de iniciado el celo (Hafez, 1996). Presenta una fase luteal, que se extiende desde la ovulación hasta la luteolisis, la cual está dominada por la presencia de un cuerpo lúteo (CL) que secreta altas concentraciones de progesterona. La luteolisis, que ocurre alrededor del día 14 o 15 del CE determina el comienzo de la fase folicular. Esta fase que comienza cuando se dispara el mecanismo oxitocina luteal-prostaglandina $F_2\alpha$ uterina ($PGF_2\alpha$) y culmina con una nueva ovulación

(Gordon et al., 2000) se caracteriza por la remoción del mecanismo de retroalimentación negativa de la progesterona sobre la síntesis y liberación de la GnRH-LH y el comienzo de un activo crecimiento y desarrollo folicular.

Los estrógenos y la inhibina producidos por los folículos ováricos y la progesterona y oxitocina sintetizados por el CL, participan activamente de la regulación neuroendocrina del CE a través de mecanismos de retroalimentación negativos y positivos (Scaramuzzi et al., 1993). Esta secuencia de eventos está controlada por una activa interrelación entre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario y el útero. En la región preóptica media del hipotálamo anterior se encuentran el 95% de los 2500 cuerpos celulares que sintetizan y liberan en forma pulsátil la GnRH. El 50% de los axones de esas células nerviosas terminan en la eminencia media formando un camino final común para muchos de los factores que afectan la secreción de gonadotropinas (Thiéry & Martin, 1991). Es probable también, que otras células presenten receptores para feromonas o estímulos nutricionales, las cuales generen señales que se transmitan mediante mecanismos interneuronales a las células que producen GnRH. La GnRH liberada al sistema porta hipotalámico-hipofisario actúa en los gonadotrofos de la región anterior de la hipófisis para regular la secreción de LH y FSH (Hafez, 1996).

La alta concentración de progesterona en la fase luteal del CE bloquea la acción del estradiol a nivel del sistema nervioso central, inhibiendo la frecuencia de pulsos de GnRH y afectando la concentración de LH y FSH en sangre periférica (Kasa Vubu et al., 1992). La progesterona actúa sobre el hipotálamo, bloqueando el generador de pulsos de GnRH y expresando pulsos de LH de baja frecuencia y gran amplitud. Los péptidos opioides endógenos han sido señalados como mediadores de la acción inhibitoria que sobre la secreción de LH realizan la progesterona y las bajas concentraciones de estrógenos (Whisnant et al., 1992). La progesterona y el estradiol modulan (inhiben o estimulan) la presencia de receptores de GnRH en la glándula pituitaria. Durante la fase luteal la progesterona actúa disminuyendo el número de receptores para GnRH a través de la disminución en la expresión de GnRH-R mRNA (Laws et al., 1990). La misma hormona actuaría también afectando la expresión de los genes que codifican las subunidades α y β de LH y FSH a nivel hipofisario (Gordon et al., 2000). En ratas, al comienzo de la fase folicular del CE, el incremento de los estrógenos plasmáticos actúa indirectamente a través del hipotálamo, produciendo una elevación de la expresión de GnRH-R mRNA en la pituitaria (Bauer-Dantoin et al., 1995). La síntesis y liberación de GnRH regula el comienzo del pico preovulatorio de LH, la receptividad sexual y la ovulación. Resultados de Karsch et al. (1997) muestran evidencias en las ovejas, del rol determinístico que el incremento masivo de GnRH tiene en la secreción del pico de LH y en la ovulación.

El incremento sostenido de los estrógenos induce el comportamiento de celo y alcanza un pico de máxima concentración, que desencadena el pico preovulatorio de LH y FSH. Finalmente se desarrollan una serie de eventos fisiológicos que culminan con una ovulación. En forma simultánea la LH inicia el proceso de luteinización de las células de la teca interna y la

granulosa y por su acción luteotrófica en los ovinos, participa en el posterior desarrollo y maduración del CL y producción de progesterona (Hafez, 1996).

El factor luteolítico por excelencia es la $\text{PGF}_{2\alpha}$. Una clara interacción entre las hormonas esteroideas ováricas y la pituitaria posterior se establece en el desarrollo de la luteolisis. El marcado incremento del estradiol por el folículo preovulatorio actúa en el generador central de pulsos de oxitocina incrementando la frecuencia de pulsos episódicos de alta frecuencia (McCracken, 1995). La oxitocina neurohipofisaria actuando sobre los receptores endometriales para oxitocina dispara la liberación de pequeñas cantidades de $\text{PGF}_{2\alpha}$ uterina. Esta inicia una retroalimentación positiva, que involucra la liberación de oxitocina luteal y $\text{PGF}_{2\alpha}$ de origen luteal y uterina, que mediante mecanismos autocrinos y paracrinos amplificarían la señal luteolítica (Gordon et al., 2000). En las primeras 24 horas de iniciada la regresión luteal disminuye dramáticamente la capacidad del CL de sintetizar y secretar progesterona. Esta disminución de la producción de progesterona probablemente esté relacionada con una marcada disminución del flujo sanguíneo al CL (Nett et al., 1976) y no con una disminución del número de células luteales. La disminución del flujo sanguíneo priva a la glándula de los nutrientes, substratos para la esteroidogénesis y del soporte luteotrópico. Esto ha sido confirmado por estudios histológicos ováricos que han mostrado un importante grado de afección de los componentes vasculares del estroma del CL y la presencia de receptores para $\text{PGF}_{2\alpha}$ en las células endoteliales (Nett et al., 1976; Gordon et al., 2000).

2. Ovogénesis y foliculogénesis

La ovogénesis, es el proceso de formación y diferenciación de los gametos femeninos. Tempranamente en el desarrollo embrionario, una multiplicación activa de las células germinales primordiales da origen a las ovogonias, que se localizan en los folículos ováricos. Estas células crecen, se diferencian y constituyen al nacimiento, la población total de ovocitos primarios disponibles en la hembra para toda su vida reproductiva determinando en este momento su máximo potencial reproductivo (Baker, 1982).

En el estroma ovárico, una cantidad de folículos (predeterminada para cada especie) y los ovocitos que éstos contienen, inician un proceso de crecimiento, desarrollo y diferenciación conocido como foliculogénesis; un proceso continuo e irreversible, que está regulado por mecanismos hormonales endocrinos, paracrinos y autocrinos que interactuando en forma dinámica entre sí, estimulan selectivamente o inhiben determinados eventos foliculares (Murphy & Pescador, 1996).

Scaramuzzi et al. (1993), desarrollaron un modelo de clasificación de la población folicular ovárica basado en su dependencia o sensibilidad a las gonadotropinas hipofisarias, clasificándolos en: folículos primordiales, folículos designados, folículos que responden a las gonadotropinas, folículos gonadotropino dependientes y folículos ovulatorios.

En ovejas jóvenes se estima que existe una población de folículos primordiales entre 40.000 y 300.000 (Scaramuzzi et al., 1993), mientras que en ovejas adultas Cahill & Mauleon (1980) reportaron entre 12.000 y 86.000 folículos primordiales de los cuales entre 100 y 400 están en crecimiento en el parénquima ovárico. Estos folículos primordiales se encuentran en estado quiescente, con un ovocito en su interior, desprovisto de zona pelúcida y rodeado por una capa incompleta de células epiteliales planas. Una señal no conocida hasta el momento, determina que estos folículos se activen, el ovocito aumente de tamaño, se diferencien las células de la teca (Hirshfield, 1991) y una importante actividad mitótica resulta en una serie de capas concéntricas de células granulosas alrededor del ovocito (Scaramuzzi et al., 1993). A pesar del desarrollo temprano de receptores para la hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH) en las células de la teca y de la granulosa respectivamente, estos folículos pre-antrales pueden seguir creciendo independiente de las gonadotrofinas hipofisarias (Webb et al., 2003).

En respuesta a la FSH, las células granulosas sintetizan y secretan proteoglicanos los cuales estarían involucrados en la formación del antro folicular (Scaramuzzi et al., 1993). Pruebas in vitro señalan que los pequeños folículos antrales responderían individualmente y de distinta manera a las gonadotrofinas hipofisarias, aunque su desarrollo puede continuar aún en ausencia de FSH y LH. Sin embargo, los folículos mayores a 2 mm de diámetro se tornan absolutamente dependientes de la FSH y de la concentración sanguínea de LH (Scaramuzzi et al., 1993). Un incremento de la sensibilidad de estos folículos a las gonadotrofinas es responsable de que los mismos alcancen el estado de folículo ovulatorio. La transformación de un folículo gonadotrófico dependiente en un folículo ovulatorio requiere de una baja pero crítica concentración de FSH que permita la inducción final de la maduración de las células de la granulosa (Henderson et al., 1988). Finalmente una retroalimentación positiva dentro del folículo asegura una constante y abundante presencia de andrógenos para la síntesis final de estradiol. La fase de reclutamiento folicular, selección y dominancia, determinan el número final de folículos ovulatorios en todas las especies. Sin embargo, la mayoría de los folículos no logran culminar en la ovulación sino que toman el camino de la degeneración celular en un proceso conocido como apoptosis o muerte celular programada (Scaramuzzi et al., 1993). El nivel de atresia folicular es mínimo en los folículos primordiales y designados incrementándose en la medida que los folículos alcanzan mayor desarrollo.

Existe mucha información en relación al crecimiento y desarrollo folicular, pero aún no están claros los mecanismos que explican el control del número de folículos ovulados en cada celo (Scaramuzzi et al., 1993). Un complejo mecanismo integrado por señales sistémicas (gonadotrofinas) y factores intraováricos e intrafoliculares, serían responsables de coordinar el reclutamiento, la selección y el crecimiento de los folículos, desde su estado de folículo primordial, hacia la ovulación o la atresia (Webb et al., 2003). Factores de crecimiento entre los que se conocen: el sistema de factores de crecimiento similar a la insulina (IGF), factores transformadores de crecimiento beta (TGF β) de la superfamilia de las inhibinas, activinas y

folistatina y la familia de las proteínas morfogenética ósea (BMP) que están presentes en las células del estroma ovárico, de la granulosa y de la teca, han sido implicados en la regulación de la transición y sobrevivencia de los folículos primordiales a folículos primarios (Monget et al., 2002; Webb et al., 2003; Knight & Glister, 2006). Factores plasmáticos asociados a la preñez han sido relacionados en los folículos pre-ovulatorios con la expresión de receptores para aromatasa y LH en las células de la granulosa (Monget et al., 2002). En este sentido, Eckery et al. (1997) demostraron la expresión de mRNA para receptores de hormona de crecimiento (GH) en las células de la granulosa de los folículos antrales pequeños y en el ovocito, sugiriendo que éstos pueden estar involucrados en el mantenimiento de la sensibilidad para las gonadotrofinas hipofisarias en la foliculogénesis de las ovejas. Tratamientos con GH incrementaron los niveles séricos del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I) y el número de folículos en crecimiento de 2 a 5 mm sin afectar los folículos ovulatorios. Estos IGF potencializan el desarrollo folicular por su acción mitogénica sobre los folículos pequeños, y conjuntamente con las gonadotrofinas inducen la esteroidogenesis en los folículos antrales. Se conocen seis proteínas de enlace a los IGF (IGFBP) que con una afinidad comparable a la de los receptores de IGF-I e IGF-II actuarían limitando la disponibilidad de los IGF y atenuando la actividad de la FSH (Monget & Monniaux, 1995). Resultados recientes indican la presencia de factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF), producidos por las células de la granulosa, participando en conjunto con las gonadotrofinas en la regulación del desarrollo folicular (Hunter et al., 2004).

La ultrasonografía, que se aplica al estudio de la dinámica folicular en ovejas (Ravindra et al., 1994; Rubianes et al., 1997), y las determinaciones cuantitativas de hormonas por técnicas de radioinmunoanálisis (Meikle & Forsberg, 2001), han permitido determinar con mayor precisión los eventos fisiológicos ováricos. Una onda de desarrollo folicular en los ovinos fue definida como un grupo de folículos que, partiendo de 3 mm de diámetro, alcanzan 5 mm en un período de 48 horas (Bartlewski et al., 1999). Estudios ultrasonográficos en vacas confirmaron la presencia de un patrón de 2 a 3 ondas de desarrollo folicular durante un ciclo estral (Ginther et al., 1989). Los ovinos presentan un rango de dos a cinco ondas de desarrollo folicular durante un intervalo interovulatorio y se ha demostrado una asociación temporal entre la liberación de FSH y la emergencia de cada onda (Noel et al., 1993; Ginther et al., 1995; Evans et al., 2000; Viñoles et al., 2002). Ondas de desarrollo folicular se presentan durante el anestro estacional (Bartkewsky et al., 1998) y durante el período de transición hacia la estación reproductiva (Ginther et al., 1995). Comparando razas prolíficas y no prolíficas Bartlewski et al. (1999) encontraron un mismo patrón de desarrollo folicular. Un patrón similar de crecimiento folicular se encontró en caprinos (De Castro et al., 1999; Evans et al., 2000) y en humanos (Adams, 2007).

3. Nutrición de los ovinos en pastoreo

En nuestros sistemas pastoriles los ovinos presentan importantes limitantes para su desempeño productivo y reproductivo (Ayala et al., 1995; Formoso,

2006). Las ovejas se encuentran expuestas durante parte de su ciclo reproductivo a una dieta con insuficientes niveles de energía y proteína (Carámbula, 1991; Montossi et al., 2004) que afecta su eficiencia reproductiva (Oficialdegui, 1990).

3.1. Metabolismo de los carbohidratos

Las pasturas naturales poseen una alta proporción de carbohidratos estructurales los cuales mediante fermentación ruminal (microbio-enzimático) producen ácidos grasos volátiles (AGV). La estructura física y solubilidad de los carbohidratos determina la velocidad de degradación, grado de utilización y las proporciones relativas de cada uno de los AGV producidos (Mc Donald et al., 1988). La dieta afecta la flora microbiana y ésta a su vez los distintos productos de fermentación. Cuando el forraje representa el 100% de la dieta, como en la mayoría de nuestros sistemas de producción ovina, se produce una proporción aproximada de 70% ácido acético, 16% propiónico y 7% butírico. También se forman pequeñas cantidades de ácido fórmico, isobutírico y valérico. Cuando se incorporan altas proporciones de grano (50% de la dieta) conteniendo carbohidratos de fácil digestión, la relación se modifica a 65%, 18% y 10%, respectivamente (Church, 1988). Los AGV aportan alrededor del 70% - 80% del total de la energía disponible para el animal y el ácido propiónico constituye el precursor fundamental para la producción de glucosa (Mc Donald et al., 1988). Los triacilglicéridos (TAG) almacenados en el tejido adiposo también representan una fuente alternativa de energía. En situaciones de estrés nutricional los TAG son hidrolizados a ácidos grasos y glicerol. Finalmente el glicerol es metabolizado a glucosa en el hígado quedando disponible como fuente de energía.

3.2. Glucosa y neoglucogénesis hepática

En los rumiantes, la glucosa representa la principal fuente de energía para una importante cantidad de tejidos. Es muy poca la cantidad de glucosa absorbida directamente a nivel intestinal, representando apenas el 9% de las necesidades totales. La mayoría de la glucosa utilizada se origina en la neoglucogénesis hepática (NGH), vía metabólica permanente que utiliza los AGV como substratos principales. Esta síntesis de glucosa se realiza principalmente en el hígado (85%) a partir fundamentalmente del propionato, único ácido graso volátil que es glucogénico (Ndibualonji & Godeau, 1993). En comparación con el lactato, los aminoácidos glucoformadores y el glicerol, el ácido propiónico es el substrato glucogénico que más contribuye en la síntesis de glucosa (50%), (Demingné et al., 1991; Ndibualonji & Godeau, 1993). Los hepatocitos del hígado de la oveja tienen una muy alta capacidad de utilización y conversión del propionato en glucosa (Demingné et al., 1986). Cuando se incluyen granos en las dietas, parte del almidón de reserva que éstos contienen alcanzan el intestino delgado sin degradarse, provocando un aumento de la tasa de absorción de glucosa intestinal e incrementando significativamente su concentración en sangre (Landau et al., 1992; Letelier et al., 2008b).

3.3. Importancia de la glucosa en los procesos productivos y reproductivos

La glucosa es un metabolito energético fundamental en los rumiantes. La concentración de glucosa plasmática previo al parto puede afectar la síntesis de lactosa y limitar la producción de calostro. En el ovario, la glucosa participa en el metabolismo folicular y la foliculogénesis (Rabiee et al., 1997), en la maduración del ovocito, el crecimiento de las células de la granulosa y el crecimiento folicular (Nandi et al., 2007; 2008). Son muchos los trabajos que vinculan la glucosa con el incremento en la tasa ovulatoria (Teleni et al., 1989a,b) y estudios recientes (Husted et al., 2008) han concentrado la atención en el efecto que la restricción nutricional en la gestación tardía puede tener en la futura capacidad para mantener la homeostasis de la glucosa en la vida adulta de los animales.

En vacas en lactación temprana y en ovejas en el último tercio de la gestación se observa un considerable aumento de las demandas energéticas. En estas circunstancias la neoglucogénesis hepática puede resultar incapaz de cubrir dichos requerimientos, pudiendo aparecer desajustes metabólicos como la cetosis en las vacas lecheras y la toxemia de la preñez en los ovinos (Bonino, 1985). Los animales son incapaces de mantener una adecuada homeostasis energética, por lo que se produce una disminución de la glucemia y un incremento de los niveles de ácidos grasos libres y cuerpos cetónicos en sangre (Radostitis et al., 1994). Desde hace muchos años se utilizan en bovinos (Emery et al., 1964) y ovinos (Sienra et al., 1984) soluciones energéticas promotoras de la producción de glucosa, con el fin de controlar dichos desajustes metabólicos. Grummer et al. (1994) administrando una solución única de propilenglicol en vacas, en diferentes dosis, incrementaron en forma lineal los niveles de glucosa e insulina en plasma y disminuyeron la concentración de ácidos grasos no esterificados (NEFA). Similares resultados obtuvieron Miyoshi et al. (2001) en vacas logrando acortar el período parto primera ovulación. En nuestro país la administración oral de glicerol o propilenglicol en dosis de 100 a 200 mL/d a ovejas con cuadros clínicos de toxemia de la preñez, demostró una alta eficacia para normalizar la homeostasis energética rápidamente (Sienra et al., 1984).

4. Factores que afectan la tasa ovulatoria

La tasa ovulatoria (TO) es el número de ovocitos liberados por oveja que ovula. El número de ovocitos liberados en cada estro está asociado a la máxima fecundidad que puede alcanzar un individuo (fertilidad y prolificidad). La TO puede estar influenciada en la oveja por muchos factores, entre ellos el potencial genético individual de la oveja (biotipo) y factores ambientales como la época del año, la edad, el peso vivo y la disponibilidad de nutrientes. La administración de gonadotrofinas y la inmunización contra esteroides (Azzarini, 1985a) y/o inhibina también han sido utilizados con el objetivo de incrementar la TO (Azzarini, 1988; Scaramuzzi et al., 1993).

El límite superior de la TO está predeterminado genéticamente para cada individuo (Downing & Scaramuzzi, 1991), sin embargo, la nutrición es el

factor ambiental que mayor influencia ejerce sobre la TO (Lindsay et al., 1975). En algunas razas de ovejas, la acción poligénica o la presencia de ciertos genes mayores o principales como el FecB (Boorola), determinan un marcado efecto sobre la TO (Wlasiuk et al., 2001; Azzarini, 2004; Davis, 2005).

Para ovejas Corriedale en pastoreo, la información nacional indica una variación de la TO, con un máximo en marzo-abril y un promedio para la estación reproductiva de 1,1 a 1,2 (Cavestany et al., 1991; Fernández Abella et al., 1996; Banchemo et al., 2003), con un promedio de 10% a 12% en la tasa mellicera para las majadas nacionales (Banchemo et al., 2003).

4.1. Efecto de la nutrición sobre la tasa ovulatoria

Está bien documentado que la nutrición es uno de los factores ambientales que más influye sobre la TO en las ovejas (Downing & Scaramuzzi, 1991). Es conocido el efecto de la nutrición sobre la fertilidad y la TO, aunque aún permanecen sin dilucidar definitivamente el/los mecanismos fisiológicos responsables del número de ovocitos liberados en cada estro (Smith & Stewart, 1990).

La TO es afectada por el peso vivo (PV) de las ovejas al momento del servicio (Coop, 1966). El efecto de la nutrición sobre el PV determina la existencia de un “efecto estático” de los nutrientes (Scaramuzzi, 2006), ovejas más pesadas presentan mayor TO (Lindsay et al., 1975; Smith & Stewart, 1990), reflejando una historia previa de alimentación de la oveja durante un largo período. En ovejas Corriedale, Coop (1966) encontró un peso crítico de 41 kg a 45 kg al momento de la encarnera, para el biotipo y las condiciones en que estas fueron evaluadas. Información nacional (Orcasberro, 1985) confirma esa relación lineal entre el PV y la TO, con un aumento de un 12 al 20% de corderos nacidos en ovejas que recibieron alimentación diferencial en servicios de abril-mayo. Ganzábal (2005) trabajando con ovejas Corriedale en sistemas de producción intensiva, encontró que por cada kg adicional de PV de las ovejas al servicio, se observaba un incremento de 1,7 corderos nacidos por cada 100 ovejas servidas. Resultados similares a los observados con el PV se encontraron con la condición corporal (CC), ovejas que incrementan su CC presentan mayor TO que aquellas que pierden (Gunn et al., 1984). Confirmando lo anterior, Viñoles et al. (2002) trabajando con ovejas Ideal con CC contrastantes, observaron una mayor TO en las que presentaban mayor CC (4 vs. 1,9 unidades, en una escala de 1 a 5).

El “efecto dinámico” de la nutrición sobre el PV, comúnmente conocido como “flushing”, está relacionado con la práctica de sobrealimentar las ovejas durante 4 a 6 semanas previas a la encarnera para lograr un incremento en la TO (Orcasberro, 1985). Sin embargo, el “flushing” también está asociado a la administración de altos niveles de alimentación previo al comienzo de la encarnera, pero durante períodos de tiempo más cortos.

Se ha demostrado claramente que el estímulo de la nutrición sobre la foliculogénesis puede ocurrir incluso antes que se observen incrementos en el PV de las ovejas. Scaramuzzi et al. (2006) mencionan un “efecto agudo” de la nutrición sobre la TO, el cual se manifiesta en ausencia de un cambio detectable del peso corporal.

Sin embargo, no está claro si estos tres patrones de respuesta reproductiva a la nutrición actúan por uno o múltiples mecanismos, aunque es conocida la relación entre la nutrición, el metabolismo y las respuestas reproductivas a través del flujo de nutrientes y la homeostasis corporal.

4.2. Efecto de la composición de la dieta (energía-proteína) y tiempo de administración sobre la tasa ovulatoria

Desde hace tiempo se han venido desarrollando estudios con el objetivo de determinar el o los estímulos y los respectivos mecanismos de acción responsables de incrementar la TO.

Trabajos realizados en nuestro país, alimentando ovejas con diferentes disponibilidades y tipos de pasturas (naturales o sembradas), y diferentes niveles de energía y/o proteína han mostrado distinto grado de incremento en la TO. Azzarini (1992) reportó un incremento del 20% en el porcentaje de parición (números de corderos nacidos/número de ovejas encarneradas), en ovejas alimentadas con pasturas sembradas, con altos niveles de disponibilidad (3,5 kg de materia seca (MS) del pasto verde/oveja/día, digestibilidad del 59% y una utilización del 30%) durante 21 días previos y 9 días posteriores a la introducción de los carneros, comparado con ovejas que estuvieron sobre campo natural. Ovejas alimentadas durante 12 días en pasturas sembradas (*lotus uliginosus*, cv. *grasslands maku*) con 10% a 18% de proteína cruda (PC) y 1,5 a 2,1 Mcal EM/kg de MS presentaron más ovulaciones dobles (42% vs. 24%) que aquellas que pastorearon campo natural (Banchemo et al., 2002). Utilizando la misma pastura (17% PC) durante 20 días pero con diferentes asignaciones de forraje (2, 4, 6 y 8% del PV), Fernández Abella et al. (2005) aumentaron la TO a partir de asignaciones del 4 % del PV (2%, 1,17 vs. 4%, 1,74). Banchemo & Quintans (2005) suplementando por cortos períodos con expeler de girasol y bloques energéticos-proteicos (PC: 22% y 20%), obtuvieron incrementos significativos en la TO (1,36 y 1,27) con relación a las ovejas que pastorearon campo natural (1,15).

En Australia, la suplementación con grano de lupino durante 4 a 6 días previos al momento del servicio, ha demostrado ser efectivo para incrementar la TO (Stewart & Oldham, 1986; Teleni et al., 1989a; Nottle et al., 1990). En todos los casos la suplementación fue realizada durante la fase luteal del CE y el efecto agudo de este corto período de suplementación estaría relacionado con el momento de la luteolisis. Administrando el mismo suplemento pero durante 11 días (día 2-13 del CE), Downing et al. (1995a) lograron resultados similares, sin modificaciones en los patrones de liberación de LH y FSH. Teleni et al. (1989b) analizando los componentes individuales del grano de lupino observaron que para una dieta de 750 g,

ésta tenía un 14 % de proteína, 12,5% de acetato y 18% de glucosa disponible, la cual puede ser usada por el animal a nivel intestinal por la digestión post ruminal del grano de lupino (Nottle et al., 1988). Los incrementos en la TO podrían estar vinculados al aumento en los niveles de energía digestible y de precursores de glucosa aportados por el grano (Stewart & Oldham, 1986). Sin embargo, Nottle et al. (1988) sostienen que el incremento en la TO no es debido sólo al aporte de energía realizado por el grano, sino también a la digestión post - ruminal de la proteína, la cual realiza un aporte extra de energía a partir de aminoácidos glucogénicos, incrementando de esa manera la concentración plasmática de glucosa.

En nuestro país Viñoles et al. (2005), utilizando dietas a base de maíz y harina de soja durante 6 días, también lograron aumentar la TO sin variaciones en el PV y la CC.

La infusión de glucosa, acetato o la combinación de ambos compuestos energéticos, durante 5 y 9 días en diferentes fases del CE también fueron utilizadas con el objetivo de incrementar la TO en ovejas de diferentes biotipos (Teleni et al., 1989a; Downing et al., 1995b; Muñoz-Gutiérrez et al., 2002).

Con el mismo objetivo de incrementar la TO, se ha administrado oralmente a ovejas en estación reproductiva y en anestro estacional, soluciones neoglucogénicas en base a glicerol y propilenglicol, las cuales aumentan la concentración plasmática de glucosa, (Cuadro I), (Rodríguez-Iglesias et al., 1996; Williams, 2000; Letelier et al., 2008a).

Cuadro I. Antecedentes de trabajos experimentales administrando oralmente soluciones neoglucogénicas en base a glicerol y propilenglicol y su efecto sobre la tasa ovulatoria.

AUTOR	N	RAZA	DOSIS	FASE CICLO ESTRAL	TO
Rodriguez-Iglesias et al., 1996	133	Corriedale	100 mL (dosis única)	ANESTRO ESTACIONAL (FFI)	GC: 1.3 GT: 1.6 P=0.0098
Williams, 2000	80	Suffolk	200 mL/c/12h durante 5d	ESTACION REPRODUCTIVA (Transición – FFI)	GC: 1.2 GT: 1.2 P>0.1
Pevsner et al., 2005	88	Corriedale	100 mL (dosis única)	ANESTRO ESTACIONAL	GC : 1,69 GT : 2,18 P<0,05
Ferrería et al., 2006	140	Corriedale	100 mL (dosis única)	ANESTRO ESTACIONAL	OM GC : 20,9% GT : 33,8% P<0,05
Letelier et al. 2008a	16	Manchega	200 ml/c/12h durante 5d	ESTACION REPRODUCTIVA (Transición – FFI)	GC: 1.3 GT: 1.9 P<0.05

* Composición de la solución neoglucogénica oral: glicerol 70% (1,2,3 - propanetriol), 1,2 propanediol (20%) y 10% agua destilada)

N: cantidad de animales utilizados en los diseños experimentales

FFI: fase folicular inducida

GC: grupo control GT: grupo tratado

OM: ovulaciones múltiples en %

Está demostrado que la administración de dietas ricas en energía y/o proteína, previo al momento del servicio están involucradas en el incremento de la TO. Sin embargo, la característica de la digestión microbiana ruminal en los ovinos establece una dificultad para determinar el efecto individual de los distintos nutrientes (energía y proteína) que integran la dieta y su correspondiente acción sobre la TO.

Dietas altamente energéticas, superiores a los requerimientos de mantenimiento de las ovejas, logran incrementar la TO (Smith, 1985). El

rendimiento energético de los nutrientes y las distintas vías metabólicas asociadas a la síntesis de glucosa y/o su utilización serían responsables de la respuesta en la TO (Teleni et al., 1989a). Por otro lado, Adams et al. (1994) sostienen que el incremento en los niveles de alimentación, afectaría la concentración plasmática de estrógenos, actuando sobre la recirculación entero-hepática de los mismos. Altos niveles de consumo de nutrientes, incrementan la tasa de eliminación de los estrógenos, alterando el mecanismo de retroalimentación negativa sobre el eje hipotálamo-hipofisario y aumentando en consecuencia la secreción y liberación de FSH, estimulando de esta manera uno de los mecanismos responsables del incremento de la TO en las ovejas (Adams & Martín, 1990).

El consumo de PC presenta un nivel crítico por debajo del cual se torna limitante para una adecuada actividad microbiana en el rumen. Está demostrado que niveles de PC en la dieta superiores a 125 g (digestibles/animal/d) incrementa linealmente la TO, siempre que la energía no sea limitante (Fletcher, 1981; Smith & Stewart, 1990). Es de esperar una respuesta de mayor magnitud en la TO cuando el tratamiento es aplicado en animales que vienen con un consumo previo de PC bajo o moderado en comparación con aquellos cuyo consumo es más elevado (Fletcher, 1981).

En las condiciones de producción pastoriles de nuestro país y aún teniendo en cuenta la característica selectividad de los ovinos en pastoreo, los bajos porcentajes de proteína en las pasturas naturales podrían ser restrictivos para un adecuado desempeño reproductivo (Montossi et al., 2000). Esto puede explicar en parte las bajas tasas melliceras de nuestras majadas (Azzarini, 1985a) y la falta de respuesta en la TO cuando se suplementa con maíz ovejas en pastoreo a campo natural (Banchemo & Quintans, 2005).

4.3. Efecto de la nutrición sobre la glucemia, hormonas metabólicas y reproductivas

Hay evidencias que sugieren que el efecto de la nutrición sobre la actividad ovárica en las ovejas está asociado con un incremento en la disponibilidad de glucosa en sangre. La glucosa ha sido mencionada como el metabolito energético responsable de establecer el nexo entre la nutrición y las neuronas secretoras de GnRH, incrementando la pulsatilidad de la LH e interactuando conjuntamente con la insulina (Teleni et al., 1989b). El aumento de la concentración de glucosa es la principal señal que estimula el mecanismo de liberación de la insulina a nivel pancreático (Lehninger, 1980). Existen evidencias que sugieren que la glucosa puede actuar en varios sitios y por varios caminos estimulando el desarrollo de los procesos reproductivos. Cameron (1997), trabajando con carneros, demostró que la hipoglucemia inducida por la administración de insulina disminuye la secreción de LH. Martin & Walkden-Brown (1995) sometiendo esta misma categoría de animales a una restricción nutricional, observaron una disminución en la frecuencia de pulsos de LH, la suplementación energética posterior aumentó su pulsatilidad rápidamente (Martin et al., 1994; Pérez-Clariget et al., 1998).

La insulina, por su acción sobre el crecimiento celular y el metabolismo, podría participar en la respuesta ovárica a la estimulación nutricional (Downing et al., 1995a). El sistema glucosa - insulina estimula la captación de glucosa por las células de la granulosa y la teca de los folículos ováricos, mediado por transportadores proteicos (GLUT-1 y GLUT- 4) ubicados en la membrana celular y cuya producción y función está afectada por los niveles de glucosa, insulina y los esteroides ováricos (Williams et al., 2001; Scaramuzzi et al., 2006).

Recientemente Scaramuzzi et al. (2006), encontraron que la infusión intravenosa de glucosa incrementó la concentración plasmática de hormona de crecimiento (GH), mientras la alimentación con grano de lupino durante 5 días generó un efecto contrario. Los autores relacionan esta falta de consistencia en los resultados a que el efecto nutricional sobre el ovario sería independiente de los cambios en las concentraciones de GH inducidos por la dieta y que la acción de esta hormona sobre la foliculogénesis puede estar relacionada con la acción estimulante a nivel hepático para la secreción IGF- I. Se sabe que muchos de los efectos anabólicos de la GH son mediados por la producción hepática y periférica de IGF- I (Downing et al., 1995b), sin embargo, se discute si este incremento es suficiente para incrementar la TO.

Últimamente, la leptina ha cobrado importancia en cuanto a su rol en el mecanismo por el cual la nutrición ejerce influencia sobre la TO (Muñoz-Gutiérrez, 2005; Korsior-Korzecka & Bobowiec, 2003; Viñoles et al., 2005), confirmando la hipótesis que el efecto de la nutrición sobre la TO tiene más de un camino de acción. La leptina actuaría como señal a nivel folicular, inhibiendo la secreción de estradiol y estimulando la foliculogénesis durante la fase folicular del CE (Muñoz-Gutiérrez et al., 2005). Los ovinos que se encuentran en un balance energético positivo muestran un incremento en la concentración en sangre de leptina e insulina, observándose una mayor tasa de captación de glucosa y un efecto directo sobre el ovario, la foliculogénesis y la TO. Scaramuzzi et al. (2006) sugieren también una posible acción del metabolismo hepático sobre los esteroides, alterando el mecanismo de retroalimentación negativa, entre el ovario y el sistema hipotálamo-hipofisario.

Complejos mecanismos metabólicos serían responsables de vincular períodos cortos de suplementación nutricional con el desarrollo y crecimiento folicular ovárico, a través de la interacción del sistema glucosa-insulina, IGF- I y el sistema leptina (Scaramuzzi et al., 2006). Sin embargo, se ha observado que cortos períodos de suplementación nutricional no afectan la concentración en plasma de IGF- I. En contraste, una restricción alimenticia reduce la concentración de IGF- I en ovejas y vacas lecheras (Lucy, 2000; Gong, 2002; Lozano et al., 2003). El estado nutricional y metabólico de los animales podría ejercer un efecto diferencial sobre los niveles plasmáticos de IGF- I (Scaramuzzi et al., 2006).

5. Posibles mecanismos de acción para la multiovulación

La suplementación nutricional actúa modificando el estado metabólico de los animales (Downing et al., 1995b; Scaramuzzi et al., 2006; Miller et al., 2007). El efecto de la nutrición sobre la respuesta reproductiva, se puede ejercer directamente a nivel del ovario (Smith & Stewart, 1990; Viñoles et al., 2005) o indirectamente a través del eje hipotálamo-hipofisario.

El efecto de la nutrición sobre la TO estaría relacionado con la tasa de entrada de glucosa en el intestino y su transporte a través de la mucosa intestinal a la sangre, independiente del origen proteico o energético del alimento que es suministrado (Teleni et al., 1989b). El ovario de la oveja es capaz de captar importantes cantidades de glucosa la cual representa su mayor fuente de energía (Rabiee et al., 1997; Williams, 2000). Estudios “*in vitro*” en bovinos reportan que la tasa de captación de glucosa por el tejido ovárico y endometrial, y su utilización a través de las diferentes vías metabólicas, está influenciado por el estado fisiológico reproductivo, momento del CE y la disponibilidad de glucosa (Chase et al., 1992).

Downing & Scaramuzzi (1991) sostienen que la nutrición actuaría a nivel del sistema nervioso central a través del eje hipotálamo-hipófisis, aumentando la síntesis y liberación de GnRH y en consecuencia de FSH y LH hipofisaria. Sin embargo, no existe acuerdo en que el estímulo nutricional que actúa sobre la foliculogénesis, sea exclusivamente a través de cambios en la concentración en sangre de la FSH durante la fase folicular del CE. La mayor exposición de los folículos gonadotrofino-dependientes a la FSH estaría relacionada con un incremento de los patrones de secreción de ésta o un aumento de la bioactividad de la hormona asociada con diferentes isoformas de la molécula de FSH (Scaramuzzi et al., 1993). La permanencia de niveles elevados de la concentración sérica de FSH en el período previo a la ovulación, estaría asociada con una prolongación del período de reclutamiento folicular de la onda ovulatoria (Bartlewski et al., 1999; Viñoles et al., 2002). En cambio Catalano & Sirhan, (1993), relacionan el efecto de la nutrición sobre la TO más a un aumento de la sensibilidad del ovario a las gonadotropinas hipofisarias que a un efecto sobre el eje hipotálamo-hipofisario. Otros estudios mantienen la hipótesis que las hormonas metabólicas están directamente involucradas en mediar la inducción nutricional sobre los cambios en el desarrollo folicular, en ausencia de cambios en la concentración plasmática de las gonadotropinas (Downing & Scaramuzzi, 1991). Dentro de las hormonas metabólicas, la somatotrofina y los factores similares a la insulina (IGF- I, IGF- II y sus proteínas de enlace) juegan un destacado rol a nivel del ovario, en el crecimiento folicular inducido por la suplementación nutricional (Lucy, 2000).

Muñoz-Gutiérrez et al. (2004) y Viñoles et al. (2005) basados en resultados experimentales sostienen que la GH, IGF-I y la leptina podrían ser parte de las señales que actuarían a nivel ovárico como nexo entre la nutrición y el incremento de la TO.

En su modelo de desarrollo folicular, Scaramuzzi et al. (1993) vincula el fenómeno de la multiovulación con el número de folículos capaces de

responder a las gonadotrofinas, con el número de folículos que alcanzan el estado de folículos dependientes de las gonadotrofinas, con la viabilidad de este tipo de folículos (la cual está relacionada con su requerimiento individual de FSH) y finalmente con la sensibilidad del eje hipotálamo-hipofisario a los efectos inhibitorios del estradiol y la inhibina sobre la secreción de FSH. Este complejo mecanismo con todos sus componentes interactuando debe intervenir en un momento crítico del CE para desencadenar una respuesta multiovulatoria.

Sin embargo, Dowing & Scaramuzzi (1991) sostienen que la glucosa, los aminoácidos de cadena ramificada u otras señales metabólicas como la insulina o la IGF-I, asociado a un estado nutricional diferencial, pueden actuar reduciendo la cantidad de FSH requerida por los folículos gonadotrofos-dependientes para alcanzar el estado de folículo ovulatorio. Un incremento en la nutrición y/o la administración de infusiones de glucosa, afectaron la dinámica folicular ovárica, incrementando el número de folículos de 2 y 3 mm y el diámetro máximo de los folículos preovulatorios (Muñoz-Gutiérrez et al., 2004; Viñoles et al., 2005).

La suplementación energética incrementa los niveles de glucosa, insulina y leptina en sangre periférica (Muñoz-Gutiérrez et al., 2002; Viñoles et al., 2005), sin embargo, no se observa una respuesta similar en la concentración plasmática de IGF- I. Estudios en bovinos y ovinos, señalan la existencia de un mecanismo de retroalimentación positivo entre la IGF- I y los receptores para FSH y tipo- I para la IGF- I a nivel folicular. Dicho mecanismo podría ser en parte responsable de la amplificación de la acción de la FSH, de la formación del antro folicular, de la expresión de receptores para la enzima aromatasas y la hormona LH durante la fase temprana de diferenciación folicular (Monget & Bondy, 2000). Sin embargo, el estímulo que realiza la IGF- I dependería del estado de desarrollo en que se encuentra el folículo. Es probable, que las células de la granulosa posean una capacidad diferencial para responder al estímulo de la IGF- I en función del grado de desarrollo folicular que se haya alcanzado (Monget et al., 2002).

Varios factores de la familia del sistema de proteínas morfogenéticas ósea (BMP) juegan un importante rol en la regulación del número de folículos ovulatorios y de la TO (Monget et al., 2002). Estos factores que son producidos por el ovocito, por las células de la granulosa y/o de la teca afectan la foliculogénesis a través de acciones parácrinas y/o autócrinas (Pierre et al., 2005). También factores de crecimiento péptidos, incluyendo los miembros de la superfamilia transformadora del factor- β de crecimiento (TGF- β), los cuales son producidos en las células somáticas del ovario y en el ovocito en desarrollo, actúan como reguladores intraováricos de la foliculogénesis (Knight et al., 2007).

Souza et al. (2004) reportaron en biotipos prolíficos (Booroola), la ovulación de un elevado número de folículos de diámetro pequeño con bajo número de células de la granulosa. Ovejas con ovulaciones múltiples presentaban mayores niveles de FSH con relación a aquellas que presentaban ovulaciones simples (Davis et al., 2005), lo cual podría estar relacionado con

un incremento del pool de los pequeños folículos antrales o al aumento del potencial para que más folículos se desarrollen a un estado dependiente de las gonadotrofinas.

La variabilidad en la respuesta a muchos de los tratamientos utilizados para aumentar la TO revela la complejidad de los mecanismos que regulan su control. Cambios morfológicos y bioquímicos ocurren simultáneamente en todos los compartimentos del ovario (Rabiee et al., 1997), confirmando que aún se conoce poco el mecanismo intrínseco de acción de los factores de crecimiento y de los metabolitos energéticos sobre la foliculogénesis y que tanto las gonadotrofinas como el mecanismo de retroalimentación negativa sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario son importantes en la modulación de la respuesta folicular a la estimulación nutricional (Scaramuzzi et al., 2006)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El bajo porcentaje de señalada es una limitante que enfrenta la producción ovina nacional, comprometiendo el desarrollo y la sustentabilidad de futuros proyectos de carne ovina de calidad. El aumento de la eficiencia reproductiva de nuestras majadas es un importante desafío que afronta el rubro ovino en la actualidad.

La eficiencia reproductiva en los ovinos está afectada por el tamaño de camada y esta guarda una relación directa con la tasa ovulatoria. Cuanto mayor sea el número de ovocitos liberados en cada estro, mayor serán las probabilidades de obtener partos múltiples.

La nutrición es dentro de los factores ambientales, el que mayor impacto ejerce sobre la TO y puede actuar a través del efecto estático del PV, del efecto dinámico donde se producen incrementos del PV y la CC asociados a un balance energético positivo en momentos previos a la encarnerada, y/o por los efectos de corto plazo donde no se altera ni el PV ni la CC (Scaramuzzi et al., 2006). Los efectos de corto plazo de la nutrición sobre la actividad ovárica en las ovejas estarían ligados a un incremento de la disponibilidad de glucosa en sangre (Teleni et al., 1989ab; Muñoz- Gutiérrez et al., 2002; Viñoles et al., 2005). La entrada de glucosa mediada por la insulina a nivel ovárico estaría involucrada en el mecanismo que media los efectos de la nutrición sobre la tasa ovulatoria.

La posibilidad de inducir hiperglucemias por cortos períodos de tiempo para aumentar la TO han sido desarrolladas por Downing et al. (1995a) mediante la infusión de glucosa y por Landau et al. (1995) infundiéndola en el abomaso. También cortos períodos (4 a 6 días) de suplementaciones con grano de lupino (Stewart & Oldham, 1986; Nottle et al., 1990) o grano de maíz y harina de soja (Viñoles et al., 2005), han incrementado la TO en coincidencia con un aumento de la concentración plasmática de glucosa.

La administración oral de una solución neoglucogénica (SN) también ha sido utilizada para estimular la TO (Rodríguez-Iglesias et al., 1996; Williams, 2000; Letelier et al., 2008a). La administración de 100 mL de una SN al

momento de retirar las esponjas intravaginales (EIV) conteniendo 10 mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP) incrementó la TO en ovejas Corriedale en pastoreo. En contraste, la TO disminuyó significativamente después del tratamiento con la SN en las ovejas que recibieron una dosificación previa de 60 mg de MAP en la EIV (Rodríguez-Iglesias et al., 1996). Estos autores obtuvieron un incremento en la concentración de glucosa a partir de las 3 h de la administración de la SN, alcanzando un máximo a las 6 h y retornando a los valores iniciales a las 9 h. Sin embargo, Williams (2000) usando la misma SN en dosis única de 50, 100, 150 o 200 mL no logró incrementar la TO, aunque obtuvo aumentos significativos de la glucemia a partir de volúmenes de 100 mL comparado con las ovejas controles. Williams (2000) reporta aumentos de la concentración plasmática de glucosa a partir de la primera hora del inicio del tratamiento, permaneciendo la misma elevada durante 3h con dosis de 150 mL y 8 h con dosis de 200mL. Utilizando dosis de 200 mL cada 12 h Letelier et al. (2008a) lograron incrementar la glucemia durante 24 h y la TO. Los resultados expuestos manifiestan una clara variación e inconsistencia en la respuesta al incremento en la TO.

La importancia económica del tema y el potencial que presentan estas soluciones neoglucogénicas para incrementar la TO, justifican la investigación y el desarrollo de alternativas que apunten a superar la inconsistencia observada en la respuesta a los tratamientos con soluciones energéticas.

HIPOTESIS

Una hiperglucemia por 24 horas, inducida por la administración oral de una solución neoglucogénica a ovejas Corriedale en la fase folicular del ciclo estral, afecta la foliculogénesis e incrementa la tasa ovulatoria.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar el efecto de una hiperglucemia por 24 horas inducida por la administración oral de una solución neoglucogénica en la fase folicular del ciclo estral, sobre los cambios metabólicos, la actividad folicular y la tasa ovulatoria en ovejas Corriedale pastoreando campo nativo.

Objetivos específicos:

1. Desarrollar una metodología que permita incrementar la glucemia por 24 horas en ovejas Corriedale en pastoreo utilizando una solución neoglucogénica administrada en forma oral.
2. Evaluar el efecto del incremento de la glucemia provocada por la administración de una solución neoglucogénica en dosis crecientes, en la fase folicular del ciclo estral sobre la TO en ovejas Corriedale en estación reproductiva pastoreando campo nativo.

3. Evaluar el efecto del incremento de la glucemia por 24 horas provocada por la administración de una solución neoglucogénica, en una fase folicular inducida en ovejas Corriedale en contraestación sobre los cambios metabólicos, la actividad folicular y la TO.

ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACION

En primer lugar se caracterizó la majada de cría de la Estación Experimental Bernardo Rosengurtt (EEBR) con relación a su prolificidad, teniendo en cuenta que de esa población serían seleccionadas las ovejas a ser utilizadas en los futuros diseños experimentales. Para esto se utilizó la base de datos de la unidad de producción ovina de la EEBR, de donde se seleccionaron los respectivos registros de peso vivo (PV) y condición corporal (CC) previo a la encarnerada, así como el tipo de parto (único o mellizos).

Se desarrollaron dos experimentos con el fin de validar la técnica a ser utilizada en la determinación de la concentración de glucosa en sangre. En el primero se compararon distintas estrategias de manejo de las muestras de sangre, utilizando diferentes anticoagulantes, distintos tratamientos de frío y diferentes momentos de procesamiento y determinación de la glucosa, en relación al momento de su extracción. En el segundo, distintas técnicas de determinación de la concentración de glucosa fueron comparadas: glucometer comercial (tiras reactivas) y un método enzimático de laboratorio. Ambas técnicas fueron utilizadas en muestras de sangre extraídas de la vena yugular y de la oreja (sangre periférica).

Posteriormente se desarrolló un experimento con el objetivo de determinar la dosis y composición de una solución neoglucogénica administrada en forma oral capaz de incrementar rápidamente los niveles de glucosa en sangre y mantenerlos elevados por un período de 24 h. Se comparó una solución neoglucogénica de uso comercial (Acetolena®, Santa Elena) y otra preparada en el laboratorio (glicerol 70%, propilenglicol 20% y agua destilada 10%) administrando dosis crecientes a un grupo de ovejas alojadas en un potrero y a otro grupo alojadas en un galpón y se evaluó el efecto de ambos productos sobre la concentración de la glucosa plasmática desde el momento del inicio de su administración y hasta 6 h de finalizada la misma.

Finalmente con la información generada se diseñaron dos experimentos que tuvieron como objetivo central desafiar la hipótesis planteada en esta tesis.

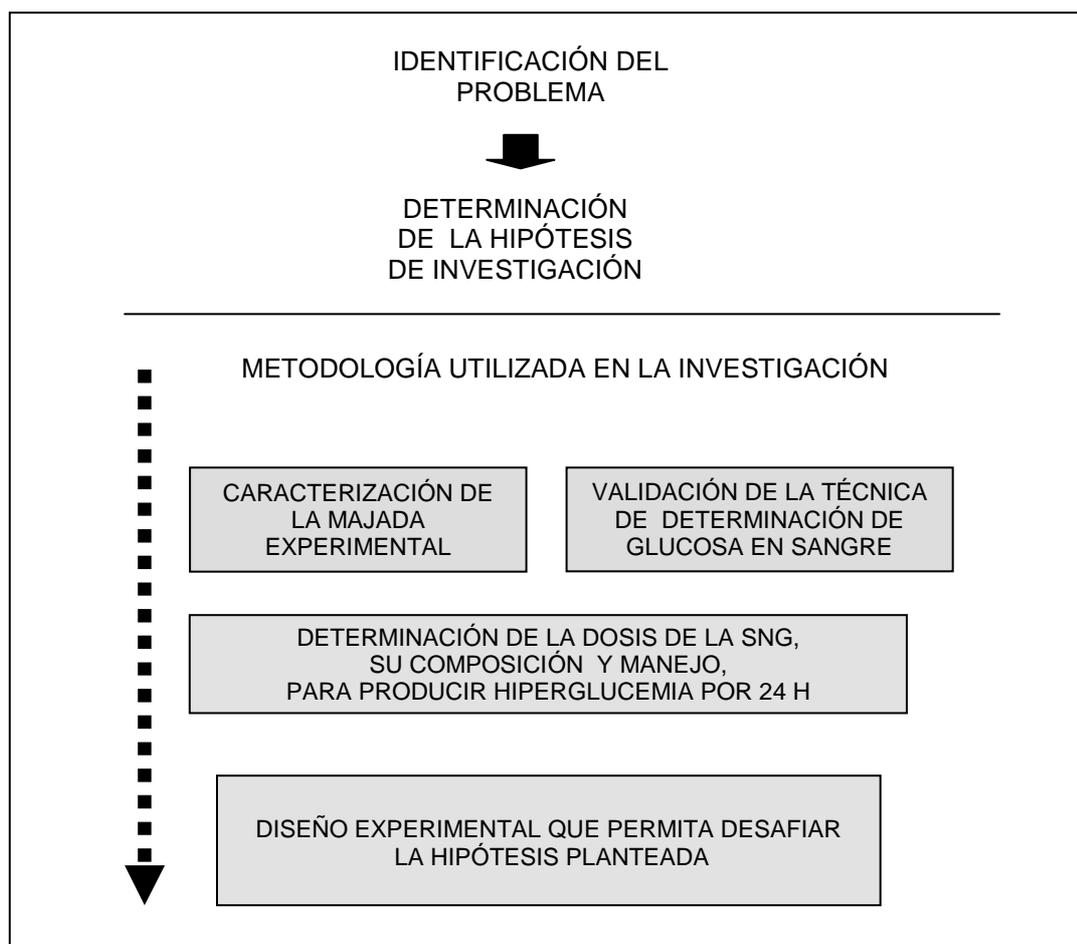


Figura 4. Estrategia metodológica utilizada en el desarrollo de la tesis.

MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

Localización y características agro-climáticas

Todos los experimentos se realizaron en la Estación Experimental “Bernardo Rosengurt” (EEBR) de la Facultad de Agronomía (UDELAR).

La vegetación está representada en una amplia proporción, por pasturas nativas, con un amplio rango de productividad debido a la variabilidad de suelos y un porcentaje de campos con diferentes niveles de mejoramientos. La producción de forraje anual, es bastante equilibrada, con picos en otoño y primavera. Datos de disponibilidad y composición química de la pastura, indican que un 38% de la producción total anual de forraje se concentra en primavera y el 60% restante se distribuye en verano, otoño e invierno (21%, 20% y 21% respectivamente), con porcentajes de proteína cruda (PC) de 8,4%; 6,7%; 10,8% y 12,3%, respectivamente para cada estación del año (Panissa, datos no publicados). El tapiz está dominado mayoritariamente por especies estivales, entre las cuales se observa en mayor proporción gramíneas perennes, y algunas especies invernales. La presencia de leguminosas es baja y la producción de MS/ha/año se encuentra en el entorno de 2500 kg (Cayota et al., 1981).

Animales

En todos los experimentos se utilizaron ovejas de raza Corriedale. Previo al inicio de los experimentos, las ovejas recibieron un tratamiento sanitario con énfasis en el control y prevención de las afecciones parasitarias y podales. Las ovejas permanecieron a lo largo del año en potreros de campo natural o en mejoramientos de baja calidad, en un sistema de pastoreo rotativo. Todas las ovejas habían tenido por lo menos un parto y habían parido y destetado un cordero en la estación de parición previa. En el experimento I fue en el único caso en que se utilizaron borregas de primer servicio (1,5 años). Los corderos son separados definitivamente de las ovejas entre el 1 y 15 de enero de cada año. Entre el 20 de marzo y 20 de abril, durante el período 1996-2004, se registró el peso vivo (PV) y la condición corporal (CC) de las ovejas, previo al comienzo de los servicios. En el mes de abril se realizó un estudio por endoscopia laparoscópica para determinar la TO espontánea de una muestra de ovejas ($n = 21$) de la majada experimental. Las ovejas presentaban un PV de $43,6 \text{ kg} \pm 1,02$ y una CC de $3,7 \pm 0,24$ unidades (media \pm EEM) y una TO de 1,05 (Cuadro II).

Cuadro II. Porcentaje de ovejas Corriedale de una muestra de la majada experimental de la EEBR ciclando espontáneamente en el mes de abril, número de ovulaciones únicas, dobles y tasa ovulatoria

Ovejas	Ovejas ciclando	Ovulaciones únicas	Ovulaciones dobles	Tasa ovulatoria
	%	%	%	
$n = 21$	95, 2 (20/21)	95 (19/20)	5 (1/20)	1,05

El porcentaje de partos múltiples de la majada experimental (EEBR) en el período 1996-2004 se encuentra en un rango de 4% a 10% y todos los partos múltiples registrados fueron dobles. Para el período 2005 al 2007 dicho valor oscila entre 20% a 26% y se observaron tres partos triples. Los valores promedios de PV y CC previo al momento del servicio presentan variaciones entre años, observándose un mínimo para el PV en el año 1999 y un máximo para el año 2000 (media \pm EEM: $40,2 \pm 0,34 \text{ kg}$; $43,1 \pm 0,53 \text{ kg}$ respectivamente). El valor mínimo de CC se registró en el año 2001 con $3,1 \pm 0,03$ unidades y el máximo fue de $3,6 \pm 0,05$ unidades en el año 2002 (Figura 5).

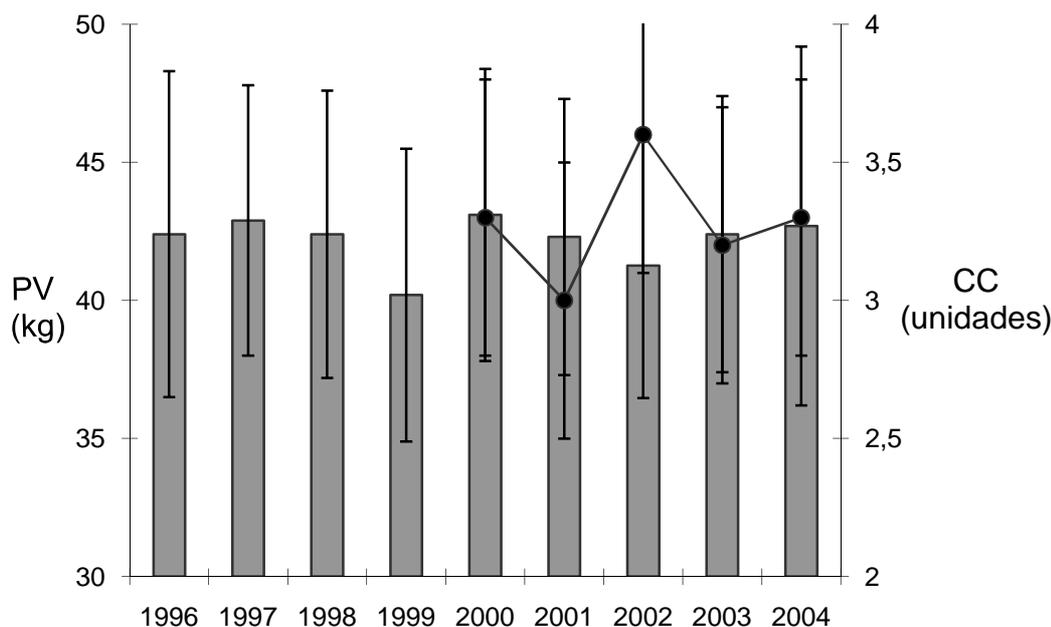


Figura 5. Peso vivo (kg) y condición corporal (unidades) de las ovejas de la majada experimental previo al inicio de los servicios durante el período 1996-2004. Las barras indican el PV y la línea continua la CC.

Sincronización y detección de celos

Trabajos previos utilizando protocolos de sincronización de celos en la majada de la EEBR con esponjas intravaginales (EIV) conteniendo 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP) durante 10 a 12 días, arrojaron valores cercanos al 90% de ovejas en celo dentro de las 72 h posteriores al retiro de las mismas, con una elevada consistencia de los resultados entre años (López-Mazz, datos no publicados). Rodríguez-Iglesias et al. (1996), utilizando EIV conteniendo 10 mg de MAP obtuvieron altas tasas de sincronización de celo y lograron menores intervalos de tiempo entre el retiro de las EIV y la presencia del estro que con EIV dosificadas con 60 mg de MAP. Sin embargo la mayor concentración de MAP provocó una disminución de la TO. Teniendo en cuenta que la principal variable de respuesta en esta tesis es la TO, en los experimentos I y II a todas las ovejas se les sincronizó el celo con EIV conteniendo 10 mg de MAP.

En el experimento I las EIV se colocaron durante 12 días. En el experimento II, el cual se realizó en estación no reproductiva, las EIV se colocaron durante 6 días con el objetivo de producir una impregnación de progesterona previa a la introducción de los machos y las ovejas en celo para inducir el estro y la ovulación (Rodríguez-Iglesias et al., 1996; Ungerfeld et al., 2003). Para producir el efecto “hembra”, que ha demostrado maximizar el impacto de la introducción de los carneros (Rodríguez-Iglesias et al., 1991), se utilizaron 24 ovejas adultas (2 a 4 años) a las cuales se les colocó una EIV con 60 mg de MAP durante 6 días (n = 11) y 7 días (n = 13) y al retiro de las mismas se les administró, una dosis única de Benzoato de estradiol (Estradiol®, 2500µ, i/m, Lab. Dispert, Uruguay), con el objetivo de estimular

el comportamiento estral de las ovejas durante el período de inducción y sincronización de estro del lote experimental. En todos los casos las EIV (10 mg de MAP) utilizadas fueron de fabricación artesanal y siempre realizadas por la misma persona. Se utilizó un polyfom extrafirme de 3 cm de diámetro por 3 cm de largo. El MAP utilizado fue del laboratorio Rasfer Internacional S.A. (Barcelona, España) con cloroformo o alcohol como diluyente.

Para la identificación de las ovejas en celo se utilizaron machos vasectomizados. Los machos fueron pintados en la región del pecho previo a su introducción con las ovejas, con una preparación de tierra de color, grasa de vaca y agua. Una vez identificadas y apartadas las ovejas marcadas en celo, los retarjos fueron pintados nuevamente y colocados en el lote de ovejas para retornar a donde se encontraban pastoreando. Se utilizaron 8% a 10% de retarjos, variando la cantidad en función del momento de retiro de las EIV y la concentración de celos esperada para cada uno de los protocolos de sincronización utilizados. A partir del momento del retiro de las EIV y durante 120 h se detectó celo cada 12 h.

Soluciones neoglucogénicas

Se utilizó una solución neoglucogénica comercial (Acetolena®, Lab. Santa Elena, Uruguay) compuesta por 700 g de 1,2,3 propanetriol, 200g de 1,2,3 propanediol y 10% agua destilada (experimento I y piloto) y una solución neoglucogénica preparada en base a glicerol (70%), propilenglicol (20%) y 10% agua destilada (Droguería Industrial Uruguaya, calidad USP), la cual fue preparada en el laboratorio una hora antes de su administración (experimento II y piloto). Los dos tipos de soluciones fueron administradas con jeringa mecánica en forma oral y siempre por el mismo operador en cada experimento.

Obtención de las muestras de sangre

Para confirmar el efecto de la administración de la solución neoglucogénica y la posible presencia de hiperglucemias indeseables, se tomaron muestras de sangre para monitorear en forma permanente la concentración de glucosa plasmática por la técnica de las tiras reactivas. Las muestras de sangre fueron tomadas por venopunción yugular, y en algunos casos de la oreja, siempre en forma previa a cualquier otra actividad, a los efectos de evitar que el estrés producido por dicha maniobra pudiera alterar o modificar, en forma transitoria o permanente la concentración de las hormonas o metabolitos que son motivo de estudio (Morris et al., 2002). Para facilitar la extracción de sangre, las ovejas fueron esquiladas en la zona del cuello, en una superficie suficiente que permitiera una clara exposición y un abordaje preciso y rápido de la vena yugular en ambos lados de cuello. Se utilizaron jeringas (10 mL) y agujas hipodérmicas descartables (Nipro Medical Ltda.) calibre 40 x 12 (18 G x 1½) y de 1,25 x 38 mm. Se tomaron muestras de 6 a 8 mL de sangre en tubos heparinizados (Riveparin, Heparina Rivero, 5000 UI/MI) y dentro de la primera hora de extraídas fueron centrifugadas durante 15 minutos a 3000 rpm (Presvac; Modelo DCS-16 RTV-A, equipada con cabezal modelo CP-16 de tipo oscilante y un rotor angular Modelo CF-6, Argentina) y el plasma almacenado a -20° C en tubos eppendorf de 1,5 mL

hasta el momento de su procesamiento. Ovinos sometidos a extracciones frecuentes de sangre pueden modificar su perfil de secreción de hormonas gonadotróficas y alterar la TO (Adams et al., 1993). Para evitar posibles efectos confundidos inducidos por el sangrado frecuente, en los experimentos I y II se seleccionó un lote de ovejas al azar teniendo en cuenta su PV, CC y edad, las cuales fueron usadas para dichos muestreos de sangre mientras que el resto no fue sometido a los protocolos de sangrado.

Determinación del estado nutricional

Se utilizó el PV y la CC para estimar el estatus nutricional de las ovejas en todos los experimentos realizados. El PV se registró siempre por el mismo técnico con una balanza electrónica y las mediciones se realizaron con los ovinos siempre sin desbarrar y con el dispositivo electrónico colocado en las instalaciones de pasaje de los animales. Para determinar la CC se utilizó una escala subjetiva de 5 puntos (Jefferies, 1961) con un rango de 1 (extremadamente flaco) a 5 (gordo) y con un mínimo en la asignación de valores de medio punto. La CC fue estimada siempre por el mismo técnico entrenado.

Determinación de glucosa, hormonas reproductivas y metabólicas

La concentración de metabolitos y hormonas se realizaron en el laboratorio Miguel C, Rubino del Ministerio de Ganadería y Pesca, Montevideo, Uruguay, en el Laboratorio de Técnicas Nucleares de la Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay y en el laboratorio de Fisiología Nutricional de Rumiantes (Departamento de Ciencias Animales, Universidad de Minnesota). La concentración de glucosa en sangre se determinó en todos los experimentos. En el experimento II, la determinación de la concentración de glucosa plasmática se realizó en el laboratorio Miguel C, Rubino del Ministerio de Ganadería y Pesca, Montevideo, Uruguay, utilizando un método enzimático, con un kit Wiener Lab. (Rosario, Argentina) y un equipo multianalizador Selectra automatizado. El coeficiente de variación intraensayo fue 1,62 %.

La concentración de progesterona en plasma se determinó en el Laboratorio de Técnicas Nucleares de la Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay, por la técnica de radioinmunoanálisis (RIA) en fase sólida, utilizando kits de DPC (Diagnostic Product Co., Los Angeles, CA). Las muestras se corrieron en un solo ensayo. El límite de detección fue de 0,1 ng/mL y los coeficientes de variación intraensayo para controles bajos (0,8 ng/ml), medios (2,2 ng/mL) y altos (8 ng/mL) fueron 8,4%, 5,8% y 10 % respectivamente.

La cuantificación de la concentración de IGF-I se realizó en muestras de plasma previamente tratadas con glicil-glicina, utilizando un RIA de doble anticuerpo validado para rumiantes (Weber et al., 2007), en el laboratorio de Fisiología Nutricional de Rumiantes (Departamento de Ciencias Animales, Universidad de Minnesota). La extracción con glicil-glicina se realizó en el laboratorio del Centro de Investigaciones Nucleares de la Facultad de

Veterinaria (Universidad de la República), incubando las muestras de plasma con 0,1 M glicil - glicina (1:1 vol/vol) a 37°C por 48 h con agitación (1000 rpm). A las muestras extraídas, así como a los estándares de IGF-I (IGF- I humana recombinante, H-5555, lot C00219, Bachem, Torrance, CA), se les adicionó el primer anticuerpo (anti- IGF- I de conejo, UB2-495, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda) y 12,000 cpm[125] IGF- I y se incubaron por 24 h a 4°C previo a la adición del segundo anticuerpo (anti-conejo de cabra, lot #35318, Pel-Freez, Rogers, AK). Las muestras fueron analizadas en triplicado. La concentración mínima detectable de IGF- I fue 0,2 ng/mL y el coeficiente de variación intra-ensayo e inter-ensayo fueron 4,6% y 8%, respectivamente.

La concentración de insulina se determinó en el Laboratorio de Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay. La concentración de insulina fue determinada por medio de un RIA en fase sólida utilizando kits de DPC (Diagnostic Product Co, Los Angeles, CA). La concentración mínima detectable del ensayo fue de 2,0 μ UI/mL y los coeficientes de variación intra-ensayo para controles bajos (2,4 μ UI/mL) y medios (13,7 μ UI/mL) fueron 18,33 % y 10,45 % respectivamente. Los coeficientes de variación inter-ensayo para los mismos controles fueron 15,8% y 12,7%, respectivamente.

Estudios de ultrasonografía folicular

Para los estudios de foliculogenesis y determinación del momento de la ovulación, se utilizó ultrasonografía transrectal. Se usó un equipo modo B (ALOKA SSD 500 Echo camera, Aloka Co., Ltd., Tokio, Japón) con un transductor rígido lineal de 7,5 Mhz diseñado para estudio prostático en humanos y validado para ovejas (Rubianes et al., 1997). La ultrasonografía se realizó en el Experimento II (n = 20) a 10 ovejas por grupo experimental, en las mismas ovejas en las cuales se determinó la concentración de IGF- I. El número de ovejas se determinó teniendo en cuenta el tiempo que lleva cada estudio ultrasonográfico, tratando de evitar encierros prolongados que pudieran afectar la concentración de las hormonas metabólicas. En forma diaria, dentro de un galpón cerrado, ambos ovarios fueron observados. Las ecografías fueron realizadas siempre a continuación de las extracciones de sangre y luego de aplicar los tratamientos, siempre por el mismo operador. Las ovejas eran alojadas en posición de estación, en un cepo de inseminación artificial de manera que quedaran inmobilizadas. En forma previa a la introducción del transductor se removía la materia fecal que hubiera en el recto y con una jeringa con sonda plástica se introducía 40 mL de un gel en base a carboximetilcelulosa. Esto permitía un mayor contacto entre la mucosa del recto y la superficie del transductor con el fin de obtener la mejor imagen posible. Una vez culminado el trabajo los animales volvían al potrero. En ambos ovarios, se registró el número y diámetro de todos los folículos iguales o mayores a 2 mm de diámetro, el diámetro mayor del folículo preovulatorio y el número de cuerpos lúteos presentes. El momento de la ovulación se determinó por el colapso del folículo de mayor tamaño y se definió como el primer día en el cual el folículo con el diámetro mayor previamente identificado desaparecía de las observaciones ultrasonograficas

sucesivas, seguido por el desarrollo de un CL en la superficie del ovario (Ravindra et al., 1994). En el experimento II los estudios ultrasonográficos comenzaron el día de inicio de la suplementación neoglucogénica y se realizaron durante 7 días, culminando el día previo a la realización de la laparoscopia.

Exámenes laparoscópicos

La identificación del número de cuerpos lúteos (CL) en la superficie de cada ovario fue realizada 8 a 10 días posteriores a la identificación del celo. Se utilizó la técnica de endoscopia laparoscópica, utilizando un equipo marca Storz de ángulo de visión de 30°, de 7 mm de diámetro, conectado a una fuente de luz Storz (Cold Light Fountain 482). Las ovejas fueron colocadas en camillas para laparoscopia en posición de Trendelenburg con un ayuno previo de 12 horas (Azzarini, 1985b).

Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el programa SAS (SAS Institute, Inc., Cary, NC, EEUU, 2001). En los experimentos de validación de la técnica de determinación de la concentración de glucosa plasmática los datos fueron analizados con PROC-GLM usando un modelo lineal que incluyó como efectos fijos, el tipo de anticoagulante, la temperatura y tiempo de almacenamiento y las respectivas interacciones. Se calculó el coeficiente de correlación de Pearson para evaluar el grado de relación entre la concentración de glucosa en sangre periférica (sangre fresca de la oreja) y sangre yugular determinada por la técnica de las tiras reactivas (glucometer comercial). Las variables PV, CC, concentraciones plasmáticas de glucosa, IGF- I e insulina y número de folículos se analizaron mediante un análisis de medidas repetidas en el tiempo usando el PROC MIXED considerando en el modelo como efectos fijos, el tratamiento, el tiempo y su interacción y los grados de libertad ajustados por el procedimiento de Kenward-Rogers. Los valores pre-tratamiento (-168 y/o 0 h) de las concentraciones de glucosa, IGF- I, e insulina se utilizaron como covariables. El intervalo retiro de las esponjas intravaginales-presentación de celo y el diámetro máximo del folículo pre-ovulatorio fueron analizados utilizando un modelo que incluyó como efecto fijo el tratamiento. El efecto del tratamiento sobre la presencia de CL fue analizado usando PROC GENMOD asumiendo una distribución binomial del termino de error, aplicando una función de vinculación logit y usando una estructura de covarianza intercambiable (EXCH). Los datos son presentados como media \pm EEM y las diferencias fueron consideradas significativas cuando $P < 0,05$.

EXPERIMENTOS PILOTOS

1. VALIDACION DE LAS TECNICAS DE DETERMINACION DE LA GLUCEMIA

Introducción

La determinación de la concentración de metabolitos energéticos en bovinos y ovinos es comúnmente utilizada para evaluar el estado nutricional y metabólico de los animales. El tipo de anticoagulante utilizado y el procesamiento y manejo posterior de las muestras de sangre puede afectar los valores de glucosa y el de otros metabolitos energéticos en plasma o suero (Morris et al., 2002). Se realizaron dos trabajos, para poner a punto y validar la técnica de determinación de la concentración de glucosa en plasma ovino.

Experimento Piloto 1.1

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de dos diferentes anticoagulantes y tres tipos de manejo de las muestras de sangre sobre la concentración plasmática de glucosa.

Materiales y Métodos

Se utilizó un arreglo factorial 2x3, donde los factores fueron el anticoagulante utilizado (heparina sódica y fluoruro de K) y tres manejos distintos de las muestras de sangre desde el momento de la extracción hasta su procesamiento (muestras refrigeradas entre 2° y 4°C y procesadas dentro de las 3 h de obtenidas, muestras refrigeradas y procesadas a las 48 h y muestras congeladas a -20°C y procesadas a las 48 h de la extracción). El trabajo se realizó en el mes de abril y se utilizaron cinco ovejas Corriedale adultas. La concentración plasmática de glucosa se determinó por la técnica enzimática (kit Wiener con un equipo multianalizador Selectra). La sangre se obtuvo en todos los casos a la misma hora (9:00) por venopunción yugular en tubos separados según el anticoagulante utilizado. Inmediatamente se procedió a la centrifugación y separación del plasma el que fue almacenado en tubos eppendorf. Se tomaron tres muestras de plasma por cada muestra de sangre, las cuales fueron sometidas a los respectivos tratamientos.

Los datos fueron analizados por análisis de varianza utilizando el procedimiento del paquete estadístico SAS, PROC-GLM. El modelo incluyó como factores, el tipo de anticoagulante, la temperatura y tiempo de almacenamiento y las respectivas interacciones.

Experimento Piloto 1.2

El objetivo de este experimento fue comparar la técnica de determinación de la glucemia en plasma ovino utilizando las tiras reactivas (glucometer) y un método enzimático (kit comercial), en muestras de sangre extraídas de la vena yugular y de la oreja (sangre periférica).

Materiales y Métodos

Se usaron 6 ovejas adultas en el mes de abril. Las muestras de sangre yugular se tomaron con agujas descartables y las de sangre periférica fueron extraídas de la oreja después de realizar una pequeña incisión en uno de los bordes con bisturí. Una gota de sangre fue tomada para realizar la determinación con la tira reactiva.

Se calculó el coeficiente de correlación de Pearson para analizar el grado de correlación entre la concentración de sangre periférica y yugular determinada por ambas técnicas.

Resultados

El anticoagulante utilizado afectó ($P < 0,05$) la concentración plasmática de glucosa. Las muestras extraídas con heparina sódica tuvieron valores mayores que las extraídas con fluoruro de K en todas las instancias (Cuadro III). Los valores obtenidos con heparina sódica ($0,72 \pm 0,005$ g/L) fueron en promedio casi un 6% superiores a los obtenidos con fluoruro de K ($0,68 \pm 0,005$ g/L). La temperatura y el tiempo de almacenamiento no afectaron la concentración de glucosa ($P > 0,1$). No se encontró interacción entre los factores estudiados ($P > 0,1$).

Cuadro III. Efecto del tipo de anticoagulante, temperatura de almacenamiento y tiempo de procesamiento sobre la concentración de glucosa en plasma (media \pm EEM; g/L) en ovejas (Experimento 1.1).

	TEMPERATURA Y TIEMPO DE ALMACENAMIENTO		
	REFRIGERADA 3 h	REFRIGERADA 48 h	CONGELADA 48 h
ANTICOAGULANTE			
Heparina sódica	$0,72 \pm 0,009$ b	$0,71 \pm 0,009$ b	$0,72 \pm 0,009$ b
Fluoruro de K	$0,68 \pm 0,009$ a	$0,68 \pm 0,009$ a	$0,69 \pm 0,009$ a

Letras diferentes en la misma columna difieren: $P < 0,05$

La concentración de glucosa no fue afectada ($P > 0,1$) por el origen de la sangre (vena yugular o sangre periférica) cuando esta fue determinada con las tiras reactivas (glucometer). En cambio, la técnica utilizada (glucometer o método enzimático) afectó de manera significativa la estimación de la concentración plasmática de glucosa ($P < 0,05$). Para la misma muestra de

sangre, los valores de glucemia determinados con el método enzimático fueron en todos los casos superiores (en promedio 21,5%) en relación a la técnica de las tiras reactivas. Estos resultados se presentan en la Cuadro IV.

Cuadro IV. Efecto de diferentes técnicas para determinar la concentración de glucosa en plasma y del origen de la muestra de sangre sobre la glucemia (media \pm EEM; g/L) en ovejas (Experimento 1.2).

TECNICA DE DETERMINACION DE LA GLUCEMIA		
	GLUCOMETER	KIT ENZIMÁTICO
SANGRE		
Yugular	0,63 \pm 0,001a	0,80 \pm 0,009b
Periférica (oreja)	0,62 \pm 0,001a	

Letras diferentes en la misma fila difieren: $P < 0,05$

Se encontró una correlación positiva ($r = 0,944$; $P < 0,05$) en la concentración de glucosa estimada por la técnica de las tiras reactivas entre la sangre yugular y periférica.

Discusión

Los valores de glucemia se ubicaron dentro del rango esperado para la especie en estudio y el estado fisiológico de los animales, coincidiendo con lo reportado por Kaneko et al. (1997). La concentración plasmática de glucosa fue diferente según la técnica empleada para su determinación. Los resultados indican una clara relación entre el anticoagulante utilizado y la concentración de glucosa plasmática. La glucemia fue superior en las muestras colectadas con heparina sódica, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Morris et al. (2002). La técnica del kit enzimático determinó de manera consistente, concentraciones de glucosa plasmática por encima de las obtenidas con el glucometer comercial en sangre entera. El perfil de las glucemias registradas en este experimento, comparando ambas técnicas, está en línea con lo reportado por Viñoles et al. (2003).

Conclusión

Los resultados demuestran que el tipo de anticoagulante utilizado afecta la estimación de la concentración plasmática de glucosa, sin embargo, la temperatura y el tiempo de almacenamiento de la muestra, no resultó, en glucemias diferentes. La técnica utilizada para determinar la concentración plasmática de glucosa (kit enzimático o glucometer), presenta diferencias en los valores de glucemia estimados.

2. DETERMINACION DE LA DOSIS DE UNA SOLUCION NEOGLUCOGENICA, SU COMPOSICION Y MANEJO DE LAS OVEJAS, PARA PRODUCIR UNA HIPERGLUCEMIA POR 24 HORAS

Introducción

Soluciones energéticas administradas oralmente han sido utilizadas en ovejas con el objetivo de incrementar la concentración de glucosa en sangre y la TO. En bovinos y ovinos, SN promotoras de la producción de glucosa, se han administrado con el fin de controlar desajustes metabólicos causados por excesivas demandas energéticas corporales en determinadas circunstancias fisiológicas productivas y reproductivas de las hembras (Emery et al., 1964). Sienra et al. (1984), administrando oralmente una solución comercial en base a glicerol y propilenglicol en dosis de 100 a 200 mL por día a ovejas con cuadros clínicos de toxemia de la preñez, logró una alta eficacia para normalizar rápidamente la homeostasis energética. Una dosis única de la misma SN, en un rango de 50 a 200 mL incrementó la concentración de glucosa plasmática pero no tuvo éxito en incrementar la TO (Williams, 2000). En cambio, Rodríguez Iglesias et al. (1996) administrando 100 mL de una SN de la misma características a ovejas Corriedale en condiciones ambientales y de manejo nutricional similares a las nuestras logró incrementar la TO. Sin embargo, no hay investigación nacional en relación a la utilización de SN en nuestras condiciones de producción pastoriles y con nuestros biotipos ovinos con el fin de incrementar la TO.

Se desarrolló un modelo experimental, que tuvo como objetivo validar una dosis de una solución neoglucogénica, su frecuencia de administración y las características composicionales, capaz de producir y mantener una hiperglucemia durante 24 h dentro de rangos clínicamente tolerables para el animal. Adicionalmente, evaluar si el lugar donde están alojados los animales al momento de recibir la solución neoglucogénica afecta la concentración plasmática de glucosa.

Materiales y Métodos

En el mes de abril, se utilizaron 30 ovejas de 4 años o más, con un PV de 49,7 kg \pm 0,8 y una CC de 3,7 \pm 0,18 unidades (media \pm EEM). Las ovejas fueron asignadas según su PV y CC a un arreglo factorial 2x3, donde los factores fueron la localización de las ovejas durante el tratamiento (galpón o potrero) y tres tipos de soluciones orales: agua destilada (GC), una solución

neoglucogénica comercial (SGC, Acetolena®) y una solución neoglucogénica preparada (SGP; 70% glicerol, 20% propilenglicol y 10% agua destilada). La mitad de las ovejas (n=15) fueron tratadas a galpón (LG) y la otra mitad (n = 15) estuvo en un potrero (LP) durante el desarrollo del experimento. Las ovejas del LG fueron encerradas y permanecieron en ayuno desde 12 h previas al inicio del experimento, hasta el comienzo del mismo (hora = 0) a las 6 AM del día siguiente. En cada lote (LG y LP) las ovejas fueron asignadas según su PV y su CC a tres grupos experimentales de cinco ovejas cada uno: un grupo control (GC) que recibió agua destilada, un grupo SGC y un grupo SGP. Las ovejas de los diferentes lotes y grupos experimentales recibieron dosis incrementales de 75, 100, 125 y 150 mL de las respectivas soluciones cada 6 h, hasta alcanzar una dosis total de 450 mL. Doce horas previas a la administración de la primera dosis (agua destilada, SGC y SGP), antes de cada administración y 6 h después de la última, se procedió a tomar muestras de sangre a todas las ovejas a efectos de determinar la concentración en sangre de glucosa por la técnica de las tiras reactivas, Eliter® glucometer (Bayer, Montevideo, Uruguay), con un rango de detección de 20 y 600 mg/dL (0,2 y 6 g/L). La representación gráfica del diseño del experimento se expone en la Figura 6.

La concentración de glucosa en sangre fue analizada con un modelo lineal que incluía los efectos de la localización de las ovejas (galpón y potrero), el tipo de solución, la dosis y las interacciones correspondientes, utilizando el procedimiento PROC MIXED del paquete estadístico SAS.

Este experimento dio lugar a una publicación (Resumen) la cual esta incluida en el Anexo I.

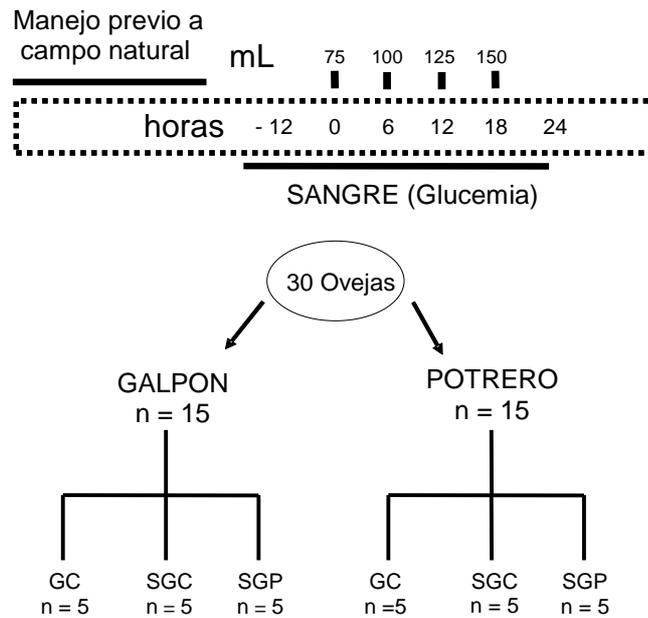


Figura 6. Representación gráfica del diseño experimental para validar el tipo de solución neoglucogénica, la dosis y la frecuencia de administración.

Resultados

El lugar donde estuvieron alojadas las ovejas (galpón o potrero) durante el tratamiento no tuvo efecto sobre la glucemia ($0,55 \pm 0,013$ vs. $0,56 \pm 0,013$; $P = 0,317$) (Cuadro V).

Cuadro V. Concentración de glucosa (media \pm EEM; g/L) según el lugar donde permanecieron alojadas las ovejas (galpón o potrero), desde 12 h previas hasta 24 h posteriores al comienzo de la administración de las soluciones.

Horas	-12	0	6	12	18	24
Dosis (mL)			75	100	125	150
Galpón (n=10)	$0,50 \pm 0,015^a$	$0,54 \pm 0,02^a$	$0,57 \pm 0,02^a$	$0,48 \pm 0,02^a$	$0,53 \pm 0,02^a$	$0,68 \pm 0,06^a$
Potrero (n=10)	$0,53 \pm 0,015^a$	$0,55 \pm 0,02^a$	$0,51 \pm 0,02^a$	$0,54 \pm 0,02^a$	$0,55 \pm 0,02^a$	$0,69 \pm 0,06^a$

Diferentes letras entre líneas indican diferencias significativas ($P < 0,05$)

La hora 0 es la hora de inicio de los tratamientos

El tipo de solución ($P = 0,001$) y la dosis ($P = 0,0001$) afectaron la concentración plasmática de glucosa, encontrándose una interacción entre solución y dosis ($P = 0,0001$). La administración de 125 mL de la SGP incrementó ($P < 0,05$) la glucemia pero la misma dosis de la SGC no logró el mismo efecto ($P > 0,1$). En cambio 150 mL logró incrementar la glucemia en el grupo SGP y el SGC (Cuadro VI).

Cuadro VI. Concentración de glucosa en plasma (media \pm EEM; g/L) en ovejas tratadas con dosis incrementales de una solución neoglucogénica preparada (SGP), una solución neoglucogénica comercial (SGC) y agua destilada (GC).

Horas	-12	0	6	12	18	24
Dosis (mL)			75	100	125	150
SGP (n = 10)	0,49 \pm 0,02 ^{Ab}	0,53 \pm 0,03 ^{Ab}	0,55 \pm 0,02 ^{aB}	0,52 \pm 0,02 ^{aB}	0,58 \pm 0,03 ^{aA}	0,78 \pm 0,05 ^{aA}
SGC (n=10)	0,53 \pm 0,02 ^{aB}	0,57 \pm 0,03 ^{aB}	0,53 \pm 0,02 ^{aB}	0,50 \pm 0,02 ^{aB}	0,51 \pm 0,03 ^{bB}	0,59 \pm 0,05 ^{bA}
GC (n=10)	0,53 \pm 0,02 ^{aA}	0,50 \pm 0,03 ^{aAB}	0,44 \pm 0,02 ^{bBC}	0,41 \pm 0,02 ^{bC}	0,45 \pm 0,03 ^{cC}	0,47 \pm 0,05 ^{cCBA}

La hora 0 es la hora de inicio de los tratamientos. Diferentes letras minúsculas entre líneas indican diferencias significativas ($P < 0,05$). Diferentes letras mayúsculas dentro de líneas difieren significativamente ($P < 0,05$). Los datos incluyen para cada tipo de solución administrada las ovejas que estaban a galpón y a pastoreo independiente de la localización.

Los valores de glucemia no fueron diferentes para el grupo SGP y el SGC cuando las ovejas permanecieron en el galpón o en el potrero. Sin embargo, la concentración de glucosa plasmática fue menor en ambos lugares en aquellas ovejas que recibieron agua destilada. La glucemia en las ovejas del grupo SGP ($0,57 \pm 0,012$, g/L) fue significativamente superior a las del grupo SGC ($0,54 \pm 0,012$, g/L) y ambas en relación al agua destilada, independiente del lugar donde estuvieron alojadas durante los tratamientos.

Discusión

Los resultados demuestran que 75 y 100 mL de la SGC y la SGP no incrementan la concentración plasmática de glucosa dentro de las 6h posteriores a su administración. Estos resultados coinciden con lo reportado por Williams (2002), pero contrastan con los hallazgos de Rodríguez-Iglesias et al. (1996). Sin embargo, 150 mL de la SGP y SGC incrementan la glucemia por un período de 6h. Esta respuesta puede estar relacionada con el volumen de la solución neoglucogénica administrado y los requerimientos energéticos de las ovejas al momento del tratamiento. La glucosa generada

en el proceso de neoglucogenesis hepática, cuando se administran dosis menores a 125 mL de la SGC o de la SGP, seguramente sea utilizada por el organismo de la oveja para cubrir demandas energéticas insatisfechas. En cambio, 150 mL de la solución neoglucogénica puede generar un excedente de glucosa en sangre que sea responsable de la hiperglucemia registrada. No podemos afirmar que exista un fenómeno aditivo de la concentración de glucosa plasmática asociado con la administración de las sucesivas dosis de la solución energética, aunque tampoco tenemos elementos para descartarlo.

Los resultados demuestran que el lugar donde se alojaron las ovejas al momento de ser tratadas (galpón o potrero) no afectó la concentración plasmática de glucosa. Rodríguez-Iglesias et al. (1996) tratando ovejas en pastoreo y Williams (2002) en confinamiento, utilizando en ambos casos una SN de similares características e igual volumen reportan resultados similares incrementando en ambos casos la concentración plasmática de glucosa, aunque contrastantes en relación al efecto sobre la TO.

Es improbable que la composición o la calidad de los productos utilizados en la preparación de la SN sea responsable de la diferente respuesta, ya que la solución utilizada por Rodríguez-Iglesias et al. (1996) y la usada por nosotros fueron similares.

El PV de las ovejas manejadas en este experimento fue 14% menor y una CC inferior a las ovejas Corriedale del experimento de Rodríguez-Iglesias et al. (1996). Las ovejas Suffolk utilizadas por Williams (2000) tenían un PV 21% superior a las utilizadas por nosotros. Si bien la bibliografía respecto a este tema es escasa, el PV (Recabarren et al., 2005) y la CC (Osgerby et al., 2003) no parecen influir en la concentración de glucosa plasmática en las ovejas.

Rodríguez-Iglesias et al. (1996) con un volumen de 100 mL y Williams (2000) con 125 o 150 mL consiguieron incrementos de la glucemia de 25% y 40% respectivamente respecto al grupo control. Nuestros resultados están en línea con los mencionados anteriormente, observándose incrementos de la glucemia de 23% y 40% con dosis de 125 y 150 mL respectivamente cuando se administró una SGP. Sin embargo con dosis de 75 y 100 mL el aumento solo alcanzó un máximo de 9% y las glucemias no fueron significativamente diferentes. Estos resultados pueden sugerir que el incremento de la concentración plasmática de glucosa en respuesta a la administración de una SGP y SGC puede estar relacionado con el genotipo de las ovejas.

El incremento en la concentración de glucosa plasmática observado posterior a las primeras 12 h de encierro y antes del comienzo de la administración de las soluciones, puede estar explicado como una respuesta de los animales al estrés provocado por la primera extracción de sangre. Sin embargo, esto no explica porque esto no ocurre en el grupo control el cual también fue sangrado.

Conclusión

Los resultados demuestran que la administración de 75, 100, 125 y 150 mL cada 6 h de una solución neoglucogénica comercial o preparada, no incrementó la concentración plasmática de glucosa por 24 h y que el lugar donde están alojados los animales al momento de recibir el tratamiento respectivo (galpón o potrero) no afectó la glucemia en los mismos.

EXPERIMENTO I

Introducción

El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto de dosis incrementales de una solución neoglucogénica comercial (SGC), sobre la concentración plasmática de glucosa y la TO en ovejas Corriedale en estación reproductiva.

Materiales y Métodos

En el mes de abril, se utilizaron 180 ovejas de 1,5; 2,5; 3,5 y 4 años o más (31, 25, 20 y 25%, respectivamente) y un peso vivo (PV) de $40,7 \pm 0,33$ kg y una condición corporal (CC) de $3,1 \pm 0,08$ unidades (media \pm EEM). Las ovejas fueron asignadas a un arreglo factorial con dos repeticiones ($n = 90$ en cada una) y los factores estudiados fueron el tipo de solución, la dosis y las interacciones correspondientes. El celo se sincronizó con EIV (10 mg de MAP) que permanecieron colocadas durante 12 días y las ovejas según su PV, CC y edad, fueron asignadas a dos tratamientos: un grupo control (GC, $n = 45$) el cual recibió cada 6h: 75, 100, 125 y 150 mL de agua destilada y un grupo que recibió una SGC ($n = 45$) en los mismos volúmenes y frecuencias que el GC a partir del retiro de las EIV (Día 0). Previo al comienzo del experimento, las ovejas permanecieron con un ayuno total de 12 h. Desde ese momento y antes del comienzo de la administración de las soluciones (6 AM), hasta completar 24 h, se realizaron extracciones de sangre para determinar la concentración de glucosa en una muestra de ovejas de cada tratamiento, en la repetición 1 (GC = 12 y SGC = 12) y en la repetición 2 (GC = 21 y SGC = 23) (Figura 7). La glucemia se determinó con un glucometer (Sure Step, Johnson & Johnson) y tiras reactivas compatibles, con un rango de detección de 0 a 500 mg/dL. Las ovejas fueron trasladadas a un galpón al comienzo del experimento donde permanecieron durante todo el experimento con acceso a agua. A los 8 días posteriores al retiro de las EIV y del comienzo de los tratamientos se realizó una laparoscopia para contar el número de cuerpos lúteos presentes en ambos ovarios.

Los datos de TO fueron analizados utilizando un modelo lineal por el procedimiento GENMOD del paquete estadístico SAS. El modelo incluyó los efectos de la edad y el tratamiento y la interacción entre ambos. Los datos de glucosa se analizaron mediante un análisis de medidas repetidas en el tiempo usando el procedimiento MIXED del mismo paquete estadístico con

el efecto de la hora de extracción como medida repetida. El modelo incluyó como efectos fijos, el tratamiento y el tiempo y su interacción y el efecto de la repetición como efecto fijo. La glucosa en tiempo 0 como covariable. Este experimento dio lugar a una publicación que se adjunta en Anexo II.

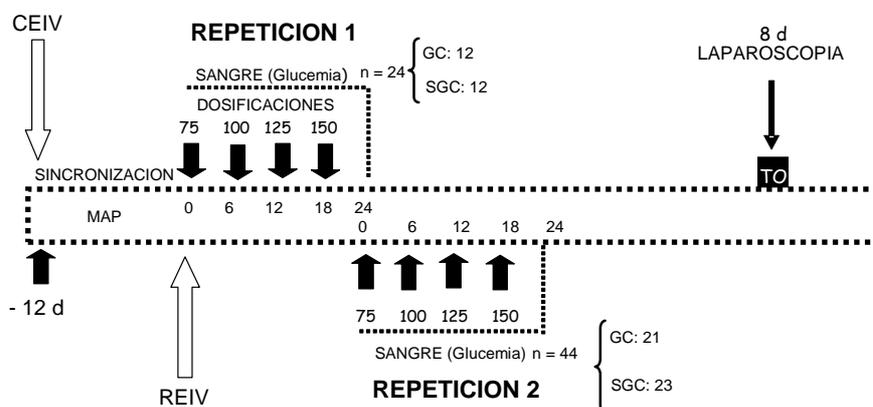


Figura 7. Representación gráfica del diseño del experimento I.

CEIV: colocación esponjas intravaginales
 REIV: retiro de las esponjas intravaginales
 MAP: Acetato de medroxiprogesterona
 GC: grupo control
 SGC: grupo solución neoglucogénica comercial

Resultados

La SGC no tuvo efecto sobre el porcentaje de ovejitas que ovularon en respuesta a la sincronización ($P > 0,1$). Un 95% (171/180) del total de las ovejitas respondieron a la sincronización con ovulación independientemente de la repetición ($P > 0,1$). El sangrado tampoco afectó ($P > 0,1$) el porcentaje de ovejitas que ovularon. El porcentaje de ovejitas que ovularon en ambos grupos pero que no fueron sangradas fue 93,8% (105/112) mientras que para el grupo de ovejitas sangradas fue 97,1% (66/68).

La media general de la concentración de glucosa presentó una tendencia entre las repeticiones ($0,52 \pm 0,013$ vs. $0,55 \pm 0,015$; $P = 0,093$) y entre los distintos tratamientos (GC: $0,52 \pm 0,015$ vs. SGC: $0,55 \pm 0,013$; $P = 0,098$). La glucemia fue afectada de manera significativa por la dosis ($P = 0,0001$) y por

la edad ($P = 0,039$). La concentración de glucosa fue mayor ($P < 0,05$) en ovejas de 1,5 años ($0,58 \pm 0,018$ g/L) que en las ovejas de 3 años ($0,51 \pm 0,02$ g/L) y aquellas igual o mayor a 4 años ($0,53 \pm 0,02$ gr/L), mientras que las glucemia de las ovejas de 2 años tuvo un valor intermedio no diferenciándose de las otras medias ($0,54 \pm 0,02$ gr/L). Se encontró una interacción ($P = 0,0001$) entre tratamiento y dosis; dosis de 75 y 100 mL de la SGC no incrementaron la glucemia comparado con el GC, mientras que las dosis de 125 y 150 mL fueron efectivas, no encontrándose diferencias ($P > 0,1$) en la concentración de glucosa entre ambas dosis (Cuadro VII).

Cuadro VII. Glucemia (media \pm EEM, g/L) en ovejas Corriedale después de la administración de dosis incrementales (75, 100, 125 y 150 mL) de agua destilada o una solución neoglucogénica comercial.

HORAS Y DOSIS (mL)					
Horas	0	6	12	18	24
mL		75	100	125	150
TRATAMIENTOS					
Agua destilada	$0,46 \pm 0,018^a$	$0,53 \pm 0,018^a$	$0,56 \pm 0,018^a$	$0,53 \pm 0,018^a$	$0,53 \pm 0,018^a$
SGC	$0,44 \pm 0,016^a$	$0,56 \pm 0,016^a$	$0,55 \pm 0,016^a$	$0,60 \pm 0,016^b$	$0,63 \pm 0,016^b$

Letras diferentes en la misma columna difieren significativamente: $P < 0,05$

La TO no se vio afectada por la condición corporal, ni por el peso vivo, ni por la edad de las ovejas ($P > 0,1$). Tampoco se encontró efecto del tratamiento sobre el número de cuerpos lúteos ($P > 0,1$). La TO fue $1,11 \pm 0,04$ y $1,11 \pm 0,03$ para el GC y SGC, respectivamente. El sangrado tampoco afectó el número de CL observados ($P > 0,1$).

Discusión

Los resultados muestran que la administración de 125 o 150 mL de una SGC incrementó en forma significativa la glucemia de las ovejas tratadas respecto a los controles, aunque dicho incremento no tuvo efecto sobre la TO.

Como era de esperar la solución neoglucogénica aumentó la glucemia. Se ha observado que la incubación de glicerol en líquido ruminal ovino reduce la producción de acetato e incrementa la producción de propionato y butirato

en el rumen, mientras que la incubación del propilenglicol reduce la producción de acetato y butirato pero incrementa la producción de propionato (Ferraro et al., 2009). El propionato es sustrato de la gluconeogénesis hepática, por lo que, el resultado final de la administración de glicerol y propilenglicol es la síntesis de glucosa (Mayes, 2000). Por otra parte, otros autores utilizando la misma solución neoglucogénica también lograron inducir hiperglucemias en ovejas (Rodríguez-Iglesias et al, 1996; Williams, 2000; Letelier et al, 2008a).

La edad afectó la concentración plasmática de glucosa; la glucemia fue superior en borregas de 1,5 años que en animales de mayor edad. Otros autores también han observado que la concentración de glucosa en sangre es mayor en animales más jóvenes (Antunović et al., 2004) y Recabarren et al. (2005) reportan valores más altos que los observados por nosotros en corderas prepúberes. Es por todos conocido que los rumiantes disminuyen la glucemia desde el nacimiento (90 a 100 mg/100 mL) a niveles que se considerarían de hipoglucemia (40 a 60 mg/100 mL) en la etapa adulta, y que posiblemente este sea un cambio constitutivo más que un fenómeno adaptativo (Wijayasinghe et al., 1984). Todos los animales utilizados en este experimento no eran lactantes ni en transición, sino que se consideraban rumiantes adultos desde el punto de vista de la utilización de la pastura. Por otra parte, el peso corporal no explicaría esta diferencia ya que no se ha encontrado correlación entre peso y concentración de glucosa (Manzano et al., 1999). Se ha planteado como causa de la disminución de la glucemia la disminución de la velocidad de síntesis de glucosa hepática (Antunović, et al, 2004). Sin embargo, es posible también plantearse que la disminución de la glucemia en rumiantes sea un fenómeno más lento y gradual.

Los resultados de nuestro trabajo muestran que la dosis mínima capaz de incrementar la glucemia fue de 125 mL lo que difiere con lo reportado por Rodríguez-Iglesias et al. (1996), quienes administrando 100 mL de la misma SN a ovejas Corriedale, incrementaron la concentración de glucosa en plasma a partir de las 3h de su administración, alcanzando un máximo a las 6 h y retornando a los valores basales a las 9 h. Por su parte, Williams (2002), utilizando ovejas Suffolk logró incrementar la glucemia con 150 mL de la misma solución durante 3 h a partir de la primera hora de iniciado el tratamiento. En nuestro caso, la frecuencia de administración de la SGC y el monitoreo de la glucemia establecido en el protocolo experimental, no permiten saber, si el incremento de la glucosa plasmática se produjo antes de las 6 h.

La administración cada 6 h de un volumen incremental de la SGC puede generar un efecto aditivo de la glucosa, determinando que a partir de dosis de 125 o 150 mL, se mantuvieran los niveles elevados hasta que cesó la administración de la solución neoglucogénica.

La administración de la SGC en dosis incrementales, ni la elevación de la glucemia consecuente, modificaron la TO. Tampoco Williams (2002) logró aumentar la TO utilizando la misma SN a pesar de incrementar rápidamente la glucemia. Sin embargo, Rodríguez-Iglesias et al. (1996), trabajando en

estación no reproductiva, indujeron una hiperglucemia durante 6 h en una fase folicular inducida y observaron un aumento de la TO.

Es conocido que las ovejas Corriedale en nuestro país presentan estacionalidad reproductiva (Cavestany et al., 1991), siendo este un factor dominante en el control de la TO. En este experimento los tratamientos fueron aplicados en el momento en que la TO expresa su máximo potencial (abril-mayo), por lo que no se puede descartar que la época del año limite la respuesta a la hiperglucemia.

Por otra parte, las ovejas presentan un potencial genético individual que determina el número máximo de oocitos liberados en cada estro, es decir, la TO está bajo control genético, aunque el nivel de nutrientes disponibles en momentos estratégicos de la estación de cría y del ciclo reproductivo puede afectar el grado en el cual ese potencial genético se expresa (Smith & Stewart, 1990). Puede ser que el potencial genético del biotipo que utilizamos en este experimento limite la respuesta al tratamiento. La TO del lote control de las ovejas Corriedale utilizadas por Rodríguez-Iglesias et al. (1996) era mayor ($1,30 \pm 0,06$, media \pm EEM) que el de la majada experimental a pesar de la época del año. Por otra parte, Viñoles (2003) utilizando el mismo tipo de suplemento y duración de la suplementación en la misma época del año y la misma raza de ovinos logró aumentar la TO en una majada de la misma zona que la EEER pero no la modificó cuando utilizó ovejas de la misma majada experimental que en este trabajo.

Por otra parte, en este trabajo, la concentración de glucosa plasmática alcanzó su máximo 18 h después de retiradas las EIV mientras que Rodríguez-Iglesias et al. (1996) reportaron el pico de concentración de glucosa 6 h después de iniciado los tratamientos y Letelier et al. (2008a) lo observaron a las 24 h. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la frecuencia de administración y de sangrados en los distintos protocolos es diferente lo que dificulta la comparación de los resultados de la evolución de la glucemia en el tiempo. A pesar de ello, se debe tener en cuenta que el patrón de incremento de la glucemia observado en este experimento es diferente al reportado por Rodríguez-Iglesias et al (1996) y a los que resultan de la suplementación con grano de lupino (Scaramuzzi et al., 2006) o glucosa intravenosa (Downing et al., 1995). Quizás la SGC en el volumen y frecuencia administrada en nuestro experimento no logre alcanzar la concentración y persistencia de glucosa en sangre necesaria para realizar un adecuado estímulo sobre el eje hipotálamo-hipofisario y/o a nivel del ovario de manera directa o a través de la acción de hormonas metabólicas. Sin embargo, Williams (2000), incrementando la glucemia a partir de la hora de la aplicación de los tratamientos tampoco logró incrementar la TO.

Es conocida la relación que existe entre el PV y la CC de las ovejas en el momento del servicio con la TO (Knight, 1980). Viñoles et al. (2002), trabajando con ovejas Ideal, obtuvo mayor TO en aquellas que presentaban mejor CC ($4,1 \pm 0,1$ vs. $1,9 \pm 0,1$). Rodríguez-Iglesias et al. (1996) con ovejas Corriedale en buena a muy buena CC también reportó un incremento en la TO. No podemos descartar que la ausencia de incremento en la TO en

este experimento este asociada con el menor PV y CC de las ovejas experimentales.

Conclusión

Los resultados de este experimento demuestran que la administración oral de una solución neoglucogénica comercial en dosis de 75, 100, 125 y 150 mL a ovejas Corriedale en estación reproductiva pastoreando campo nativo, no producen una hiperglucemia por 24 h y tampoco incrementó la tasa ovulatoria.

EXPERIMENTO II

Introducción

Los resultados de los experimentos previos confirmaron que una dosis de 125 mL de una solución neoglucogénica preparada es capaz de incrementar la glucemia por un período de 6 h.

El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto de un incremento de la glucemia por 24 h provocado por la administración de una SGP, sobre los cambios metabólicos, la actividad folicular y la TO, durante una fase folicular inducida en ovejas Corriedale en anestro estacional pastoreando campo nativo.

Materiales y Métodos

El trabajo se realizó durante la estación no reproductiva (20 de noviembre - 15 de diciembre). Se utilizaron 80 ovejas Corriedale de 2 a 5 años de edad, en anestro estacional, el cual fue confirmado previo al inicio del experimento por ausencia de cuerpo lúteo en los ovarios al examen ultrasonográfico y por niveles inferiores a 0,5 ng/mL de progesterona en dos muestras de sangre consecutivas, separadas por un intervalo de 4 días. Las ovejas pesaban $47,7 \pm 0,4$ kg, tenían una CC de $2,9 \pm 0,3$ unidades y habían parido un solo cordero en la última temporada de partos. Los corderos fueron destetados 30 días antes del inicio del experimento. Las ovejas pastorearon en potreros con pasturas nativas, con una proporción verde-seco en el forraje disponible de 70-30% (Panissa, G. datos no publicados). Durante el mes previo al experimento, las ovejas se mantuvieron separadas de los machos (distancia mayor a 2 km), de manera que no tenían contacto visual, auditivo ni olfativo, hasta el momento en que ambos grupos se juntaron. Con el objetivo de inducir y sincronizar el celo, a todas las ovejas experimentales se les colocó una EIV conteniendo 10 mg de MAP durante 6 días (Ungerfeld & Rubianes, 1999) y al momento de su retiro se introdujeron 12% de machos adultos enteros con experiencia sexual y 20% de ovejas en celo inducido farmacológicamente. Las ovejas fueron asignadas teniendo en cuenta el PV, CC y la edad, a dos grupos experimentales: Solución Glucogénica Preparada (SGP: n = 40) el cual recibió oralmente cada 6 h 125 mL de una solución neoglucogénica preparada (70% glicerol, 20% propilenglicol y 10%

agua destilada) durante 24 h comenzando inmediatamente después del retiro de las EIV, y Grupo Control (GC: n = 40) el cual recibió agua destilada en dosis y frecuencia similar al grupo SGP (total de dosis: 4; volumen total: 500 mL). Las ovejas previo al inicio del experimento, durante y entre las dosificaciones estuvieron alojados en un potrero. El día del inicio del experimento (día 0) a la hora 6:00 se retiraron las EIV, se extrajeron las muestras de sangre a las ovejas que fueron previamente seleccionadas al azar, se administraron las soluciones a los diferentes grupos experimentales y finalmente se colocaron los machos y ovejas en celo con las ovejas experimentales. A partir de ese momento cada 12 h y durante 120 h se detectó celo.

La concentración de progesterona se determinó por RIA. La técnica utilizada y los coeficientes de variación se detallan en la sección materiales y métodos generales.

La determinación de la concentración de glucosa plasmática fue realizada en 20 ovejas por grupo experimental (SGP y GC). La concentración de glucosa se determinó en las muestras tomadas 12 h antes hasta 48 h después del inicio de los tratamientos, utilizando un kit comercial (Wiener lab, Rosario, Argentina) y un multianalizador automático marca Vitalab modelo Selectra.

De las ovejas escogidas para sangrar, se seleccionaron al azar 10 por grupo experimental para realizar los estudios ultrasonográficos y determinar la concentración plasmática de IGF- I. Para el análisis de las muestras de IGF- I, así como para el número de folículos y tamaño folicular, se tuvieron en cuenta solamente las ovejas que respondieron a la inducción del celo con ovulación. En el GC, 3 ovejas no ovularon y en el SGP también 3 ovejas no ovularon y una debió ser eliminada por problemas sanitarios. La concentración de IGF- I se determinó finalmente en un grupo de 13 ovejas (GC: n = 7 y SGP: n = 6) comenzando el día de inicio de los tratamientos y cada 12 h durante el mismo (0, 12 y 24 h) y posteriormente cada 24 h hasta completar las 168 h. La concentración plasmática de IGF- I se determinó mediante un RIA (Weber et al., 2007) previamente validado para plasma ovino.

La concentración de insulina se determinó en muestras tomadas 7 días antes al día de inicio de los tratamientos (-168 h), el día de comienzo de éstos (hora 0), hasta las 24 h en muestras tomadas c/6 h y de aquí hasta las 168 h (día 7) en muestras tomadas en forma diaria. Se incorporaron al análisis 2 ovejas por grupo experimental (GC: n = 9 y SGP: n = 8) de las que no habían ovulado.

Se realizó un estudio por ultrasonografía en forma diaria en ambos ovarios a 20 ovejas (GC: n = 10 y SGP: n = 10), comenzando el día de inicio de los tratamientos y finalizando el día previo a la laparoscopia (día 7). Se contaron y midieron todos los folículos iguales o mayores a 2 mm de diámetro y el diámetro máximo del folículo preovulatorio antes de su colapso. Para el análisis se tuvieron en cuenta solamente las ovejas que respondieron a la inducción del celo con ovulación (GC: n = 7 y SGP: n = 6).

Se registró por endoscopia laparoscópica en todas las ovejas el número de cuerpos lúteos (CL) en ambos ovarios a los 8 días de iniciado el tratamiento,

previo ayuno de 12 h. La representación gráfica del protocolo del experimento II se presenta en la Figura 8.

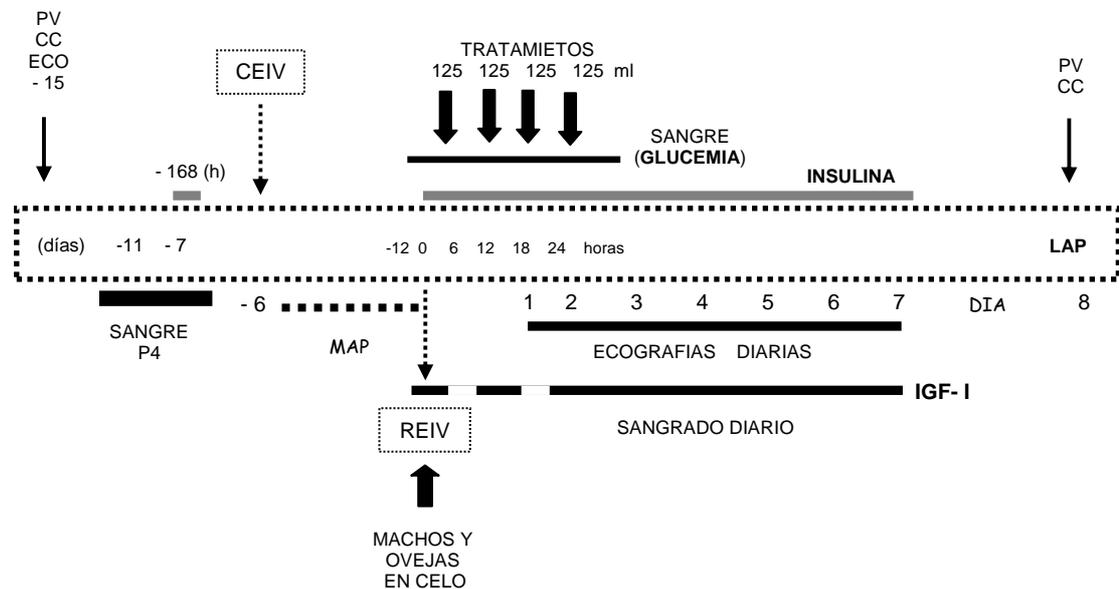


Figura 8. Representación gráfica del diseño del experimento II

CEIV: Colocación de esponjas intravaginales

REIV: Retiro de esponjas intravaginales

Dosificaciones: Administración de las soluciones neoglucogénicas

LAP: Laparoscopia

Los datos de PV, CC, concentración plasmática de glucosa, insulina, IGF- I y el número de folículos fueron analizados usando un modelo de medidas repetidas en el tiempo utilizando el PROC MIXED de SAS (2001). El modelo incluía el tratamiento, tiempo y su interacción como efectos fijos y la oveja como efecto aleatorio. Los valores pre-tratamiento (-168 y/o 0 h) de las concentraciones de glucosa, IGF- I, e insulina se utilizaron como covariables. Los valores del intervalo retiro de las EIV- presentación de celo y diámetro máximo del folículo pre- ovulatorio se analizaron con un modelo que incluía el tratamiento como efecto fijo y el animal como efecto aleatorio usando PROC MIXED (SAS, 2001). El efecto del tratamiento sobre el número de cuerpos lúteos fue analizado usando PROC GENMOD (SAS, 2001) con una distribución binomial, la transformación logit de los datos y la estructura de covarianza intercambiable (EXCH).

Los datos se presentan como medias \pm EEM.

Este experimento dio lugar a una publicación la cual es incluida en el Anexo III.

Resultados

En el estudio ultrasonográfico ovárico realizado 9 días antes (20 de noviembre) de colocar las EIV para inducir y sincronizar el celo en las ovejas experimentales, no se observaron cuerpos lúteos, ni folículos mayores a 4 mm en ninguno de los dos ovarios de las 80 ovejas del lote experimental. Las muestras de sangre tomadas después de realizada la ecografía arrojaron valores inferiores a 0,5 ng/mL de progesterona en plasma en todas las muestras analizadas, por lo que se asumió que todas las ovejas estaban en anestro. Dos ovejas del grupo SGP fueron eliminadas del experimento, una perdió la EIV y a la otra no se le pudo hacer la laparoscopia. Quedando por lo tanto 78 ovejas, de las cuales 40 integraban el GC y 38 el grupo SGP.

Un 82,1% de todas las ovejas experimentales presentaron celo y un 69,2% presentaron celo y ovularon (Cuadro VIII). Para el análisis estadístico se consideró solo aquellas ovejas que respondieron a la inducción y sincronización con presentación de celo y ovulación, quedando finalmente, 29 y 25 ovejas en el GC y SGP respectivamente.

Cuadro VIII. Efecto de la inducción y sincronización de celo utilizando durante 6 días una EIV con 10 mg de MAP, efecto macho y ovejas en celo, sobre el porcentaje de estro y ovulación en ovejas Corriedale en anestro estacional (noviembre) en el GC y SGP.

	GC		SGP		TOTAL	
	%	Nº	%	Nº	%	Nº
Ovejas celo / ovejas inducidas y sincronizadas	80	(32/40)	84,2	(32/38)	82,1	(64/78)
Ovejas en celo que ovulan / ovejas inducidas y sincronizadas	72,5	(29/40)	65,8	(25/38)	69,2	(54/78)

Un 11,5% de las ovejas respondieron a la inducción y sincronización presentando celo sin ovulación (GC: 7,5% vs. SGP: 15,8%), un 10% de las ovejas presentaron ovulaciones sin celo (GC: 12,5% vs. SGP: 8%) y 7,7% de las ovejas no respondieron, observándose ausencia de celo y ovulación.

El tratamiento con la SGP no afectó ($P = 0,37$) el intervalo retiro de EIV - presentación del celo ($52,9 \text{ h} \pm 4,4 \text{ h}$ vs. $47,1 \text{ h} \pm 4,5 \text{ h}$ para el SGP y GC, respectivamente). A las 60 h del retiro de las EIV y de la introducción de los machos y ovejas en celo, un 84,4 % (27/32) de ovejas del GC había presentado celo en relación a un 72 % (23/32) del grupo SGP ($P > 0,1$). La

frecuencia de presentación de estro durante las 120 horas en las cuales las ovejas fueron controladas se presenta en la (Figura 9).

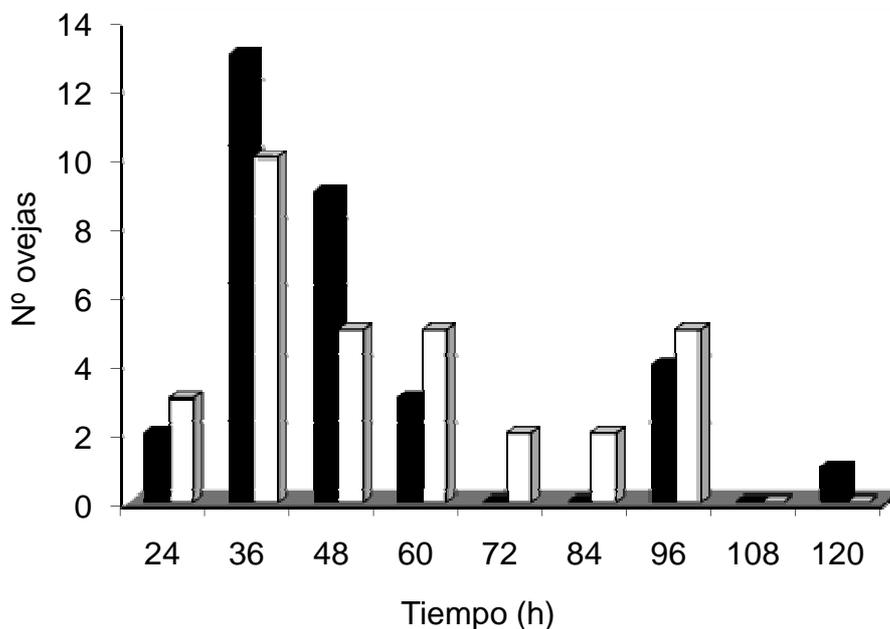


Figura 9. Distribución de ovejas en celo en el GC (■, n = 32) y SGP (□, n = 32) luego de retirar las EIV (hora 0) e introducir los machos y ovejas en celo.

De manera similar a lo observado en experimentos previos con dosis de 125 mL de la SN se incrementó significativamente ($P < 0,01$) la concentración de glucosa en plasma a partir de las 6 h de la primera administración. Esta diferencia, se mantuvo hasta 6 h después del último tratamiento ($P < 0,01$), posteriormente la glucemia regresó a los valores pre-tratamiento, no diferenciándose ($P > 0,1$) de los niveles del GC. Las ovejas del grupo SGP tuvieron glucemias más altas que las del GC durante 24 h (Figura 10).

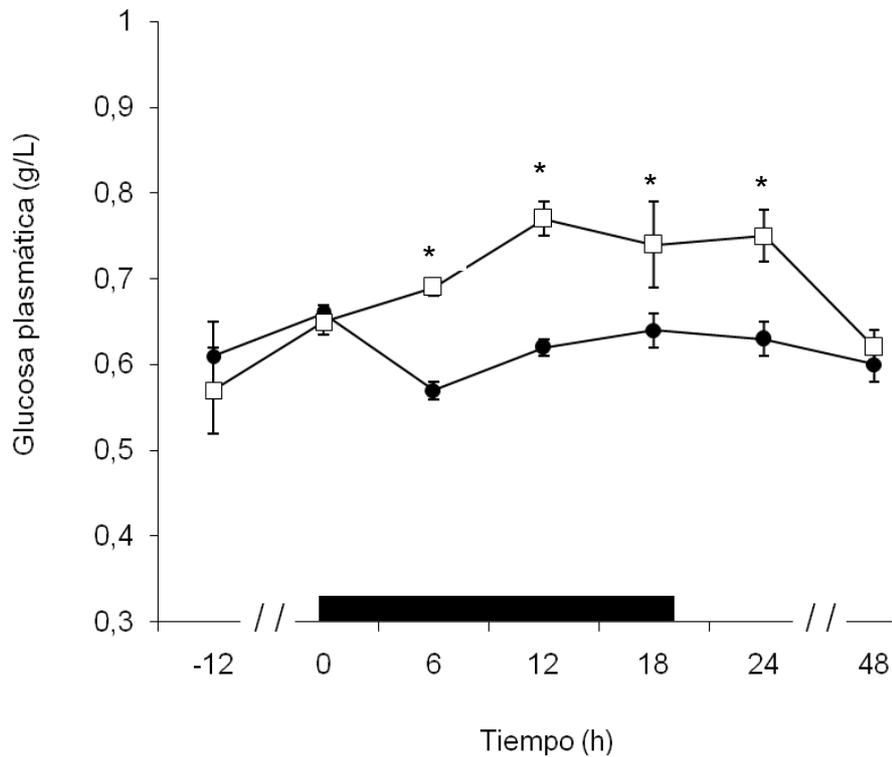


Figura 10. Concentración plasmática de glucosa (media \pm EEM; g/L) en ovejas a las que se les administró una SGP (□, n = 20) o agua destilada (●, n = 20) en relación al momento de inicio de los tratamientos (hora 0). La barra indica el periodo de aplicación de los tratamientos. Los asteriscos (*) indican diferencias estadísticamente significativas: $P < 0,05$.

La concentración de insulina se vio afectada por el tratamiento (GC: $4,41 \pm 0,51$ vs. SGP: $8,38 \pm 0,53$, $\mu\text{UI/mL}$, $P < 0,001$), y por el tiempo ($P < 0,0001$), encontrándose una interacción entre tratamiento y tiempo ($P < 0,001$). La concentración fue mayor ($P < 0,01$) en el grupo SGP que en el GC partir de las 6 h de iniciada la administración de las soluciones, diferencia que se mantuvo durante las 24 h posteriores, desapareciendo luego de finalizados los tratamientos ($P > 0,1$). Las ovejas del SGP presentaron un pico de máxima concentración a las 18 h (Figura 11) del comienzo del tratamiento ($27,6 \pm 1,3$ vs. $5,3 \pm 1,2$) para descender bruscamente a partir de este momento, hasta alcanzar valores similares en el grupo SGP y el GC a las 48 h ($4,1 \pm 1,2$ vs. $5,2 \pm 1,2$, $\mu\text{UI/mL}$, respectivamente).



Figura 11. Concentración plasmática de insulina ($\mu\text{UI/mL}$) en ovejas del GC (\bullet , $n = 9$) y grupo SGP (\square , $n = 8$).

La barra indica el período de aplicación de los tratamientos. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre tratamientos para cada una de las horas indicadas. Las letras indican diferencias significativas dentro de cada tratamiento en horas diferentes y entre tratamientos.

Las concentraciones de IGF-I para los diferentes tratamientos durante todo el período experimental no fueron estadísticamente diferentes ($163,6 \pm 7,0$ vs. $173,0 \pm 6,5$ ng/mL para SGP y GC, respectivamente, $P = 0,35$) y no se encontró interacción ($P > 0,1$) entre tratamiento y tiempo en ninguno de los dos periodos de tiempo analizados (0 a 48 h y 0 a 168 h).

Los niveles de IGF- I en el SGP tendieron a ser menores ($P = 0,067$) al final del período de hiperglucemia (SGP, $158,5 \pm 4,9$ ng/mL vs. GC, $172,2 \pm 4,3$ ng/mL; Figura 12).

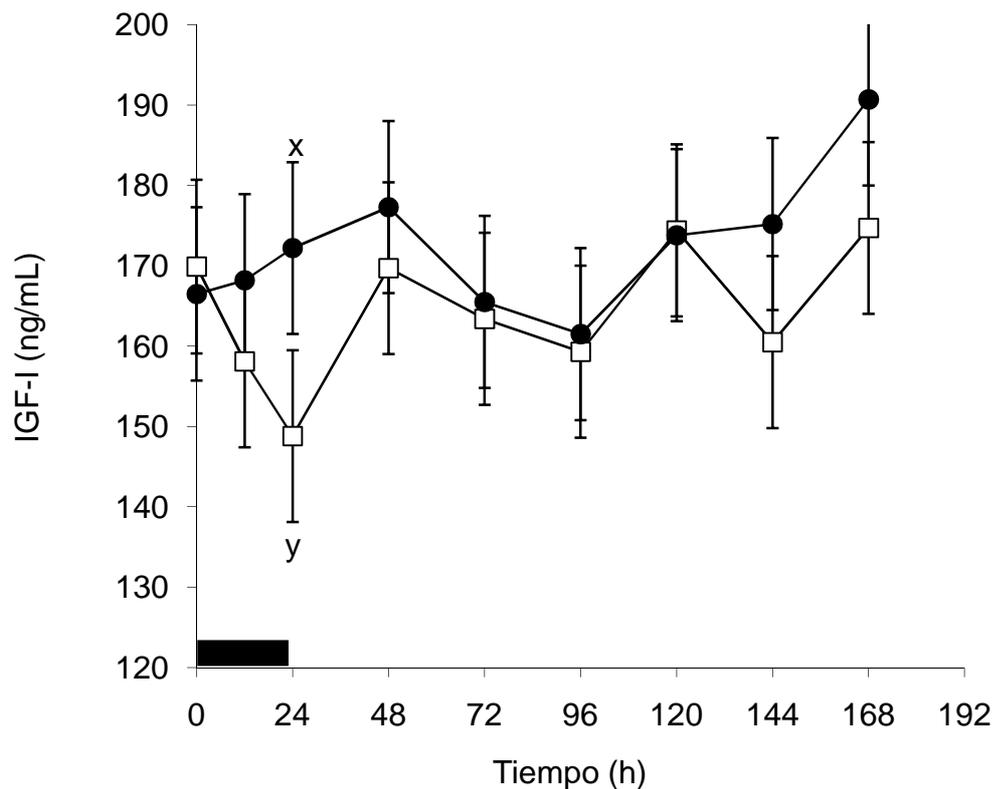


Figura 12. Concentración en plasma de IGF- I (ng/mL) en ovejas a las que se les administró una SGP (□, n = 8) y agua destilada (●, n = 9) en relación al momento de las dosificaciones. Literales x / y indican una tendencia (P = 0,067). La barra indica el período de aplicación de los tratamientos.

Se observó una interacción (P = 0,024) entre tratamiento y día cuando se comparó el número de folículos de 2 mm de diámetro (Figura 13). El número de folículos no fue diferente entre los dos grupos de ovejas (GC: $3,85 \pm 0,85$ y SGP: $2,33 \pm 0,85$) el día de inicio de los tratamientos, pero aumentó y fue significativamente diferente ($3,42 \pm 0,85$ vs. $5,33 \pm 0,85$, GC y SGP respectivamente) a las 24 h de instalada la hiperglucemia (P < 0,05). Sin embargo, esta diferencia no se mantuvo en los días posteriores (P > 0,1). No se observó efecto del tratamiento (P = 0,16) ni del día (P = 0,77) sobre el número de folículos de 3 mm de diámetro, aunque existió una tendencia (P = 0,095) a una interacción entre tratamiento y día, en el número de folículos incrementándose en el grupo GT y disminuyendo en el GC en el tercer día posterior a la aplicación del tratamiento (Figura 13).

La solución neoglucogénica (SGP) incrementó (P < 0,05) el diámetro máximo del folículo preovulatorio ($4,1 \pm 0,2$ vs. $3,4 \pm 0,3$ mm para el grupo SGP y GC, respectivamente).



Figura 13. Número total de folículos de 2 mm en el grupo SGP (\square , n = 6) y GC (\bullet , n = 7) y de 3 mm en el SGP (Δ , n = 6) y GC (\blacklozenge , n = 7) en relación al día de inicio de las dosificaciones. Literales a y b indican diferencia estadísticamente significativa ($P = 0,024$); x e y una tendencia ($P = 0,095$). La barra indica el período en el cual se realizaron los tratamientos

No se encontraron diferencias significativas en el número de cuerpos lúteos ($P = 0,26$) entre ambos grupos experimentales (1,12 vs. 1,29 para GT y GC, respectivamente). Se observaron 69% de ovulaciones simples, 28% de ovulaciones dobles y 3% (1 oveja) de ovulaciones triples en el GC mientras que en el grupo SGP 84% de las ovejas presentaron ovulación simple y 16% doble.

Discusión

Los resultados muestran que la administración cada 6 h de 125 mL de una solución neoglucogénica incrementó la concentración de glucosa plasmática por 24 h. La glucemia se incrementó a partir de las 6 h de la primera administración y regresó a los valores basales 6 h después del último tratamiento.

La concentración plasmática de glucosa e insulina reflejan indirectamente el estado nutricional y el balance energético de los animales. Incrementos de la glucemia fueron reportados administrando diversos sustratos energéticos (Downing et al., 1995b; Williams, 2000; Letelier et al., 2008b; Teleni et al., 1989a; Scaramuzzi et al., 2006; Viñoles et al., 2005). Sin embargo, el momento y la magnitud de ese incremento, en relación al inicio de la administración del sustrato energético no fueron similares en los diferentes

experimentos. Tampoco el efecto del estímulo energético sobre la TO presentó características similares. El tipo, la cantidad y la frecuencia de administración de los diferentes sustratos energéticos, quizás esté relacionado con la variación en el perfil de la concentración plasmática de glucosa y de la respuesta de la TO al estímulo energético.

Como era esperable, la concentración de insulina aumentó en las ovejas que recibieron la solución neoglucogénica, confirmando que la hiperglucemia es un poderoso estímulo para la secreción de insulina. Otros autores también reportan incrementos de insulina cuando suplementan ovejas con grano de maíz y harina de soja (Viñoles et al., 2005) o maíz laminado al vapor (Letelier et al., 2008b), sin embargo, los patrones de esta hormona son diferentes entre los trabajos. Nosotros observamos un incremento de la concentración de insulina a partir de las 6 h de administrada la SG, lo que coincide con los resultados de otros trabajos de nuestro equipo, y este aumento parece independiente de la fase en que la SG es administrada (Fase folicular: López Mazz, datos no publicados; Fase luteal: Pérez-Clariget et al., 2008). Mientras que, cuando se suplementó con grano de maíz y harina de soja durante la fase luteal, la concentración de insulina aumentó gradualmente entre las 2 y 5h posteriores a la suplementación y fue afectada por el día del ciclo estral (Viñoles et al., 2005). Por otra parte, Letelier et al. (2007) suplementando con de maíz laminado al vapor durante cuatro días, también, en fase luteal, lograron mantener niveles de glucemia y de insulina elevados durante el periodo de suplementación. Hay que tener en cuenta que la frecuencia de muestreo empleada fue diferente, sin embargo, este factor parece no explicar los resultados.

Es conocido el rol de la insulina sobre el metabolismo y el crecimiento celular. Downing et al. (1995b) identificaron a esta hormona metabólica como una de las señales que relaciona el estímulo nutricional y la TO, y Teleni et al. (1989a) reportaron que esta puede ser una de las señales que inicia los procesos anabólicos y estimula la respuesta ovulatoria. Nosotros, trabajando en una fase folicular inducida, encontramos que la máxima concentración de insulina plasmática se alcanzó en el primer tercio del tiempo transcurrido entre el retiro de las EIV y la presentación del celo. Ese temprano incremento de la insulina quizás coincida con el momento en que se produce la fase de reclutamiento folicular de la onda ovulatoria y pueda explicar la mayor cantidad de folículos antrales de 2 mm de diámetro en el grupo SGP en relación al GC. Sin embargo, contrariamente a lo esperado, esto no se reflejó en un incremento de la TO. Ha sido reportado una relación entre la concentración de insulina plasmática y el tipo de ovulación, simple o doble (Catalano & Sirhan, 1993) que nosotros no pudimos confirmar.

Los resultados indican que no se encontraron diferencias significativas en la concentración plasmática de IGF- I entre las ovejas tratadas y controles. Estos resultados coinciden con los reportados por otros autores (Viñoles et al., 2005; Scaramuzzi et al., 2006) quienes suplementaron ovejas durante cortos periodos con grano lupino o concentrados energéticos-proteicos. Sin embargo, nosotros observamos una tendencia a una menor concentración de IGF- I en las ovejas tratadas respecto a las controles durante las 24 h en que la concentración de glucosa e insulina estuvo elevada. Resultados

similares a estos fueron reportados por Pérez-Clariget et al. (2008) administrando la misma SN a ovejas Corriedale durante la estación de cría en una fase luteal tardía. Sin embargo, en ninguno de los experimentos la TO se vio incrementada. Downing et al. (1995b) utilizando grano de lupino como suplemento energético observó una tendencia a un incremento de la TO aunque tampoco encontró diferencias significativas en la concentración de IGF- I plasmática entre ambos grupos experimentales. La concentración plasmática de IGF- I está relacionada con el estado nutricional y el balance energético, aunque la misma no es un buen indicador de la cantidad de hormona disponible a nivel folicular (Fortune et al., 2004). Monget et al. (2002) sostienen que la IGF- I no sería indispensable para el reclutamiento folicular, la proliferación celular y la sobrevivencia de los folículos antrales. Quizás, esto explique por qué a pesar de la disminución en la concentración plasmática de IGF-I el número de folículos antrales de 2 mm diámetro es mayor en las ovejas tratadas respecto a las controles. Estos resultados podrían sugerir la existencia de un mecanismo alternativo que operaría a nivel del ovario relacionado con el sistema glucosa-inulina y el sistema leptina como menciona Muñoz-Gutierrez et al. (2002, 2005). Sin embargo, el mayor diámetro del folículo preovulatorio en las ovejas tratadas respecto a las controles puede estar indicando una estimulación de la IGF- I sobre las células granulosas de los folículos antrales. Estos resultados confirman que la concentración plasmática de un metabolito energético u hormona metabólica en un momento preciso no siempre explican con claridad los fenómenos fisiológicos que se encuentran en la base de las respuestas reproductivas.

El incremento de la TO en las ovejas está relacionado con un aumento del reclutamiento o una disminución de la atresia folicular (Scaramuzzi et al. 1993). En el presente estudio la hiperglucemia por 24 h no incrementó la TO en las ovejas tratadas con la SGP, aunque se registró un aumento significativo en el número de folículos de 2 mm de diámetro. Sin embargo, no podemos establecer con claridad por cuál de los dos mecanismos mencionados ocurrió dicho incremento.

La población folicular es muy sensible al estímulo nutricional y por tanto la foliculogenesis y la TO pueden ser estimuladas e incrementadas a través del manejo de la nutrición (Scaramuzzi et al. 2006). Sin embargo, resultados contradictorios son reportados por diferentes autores (Williams et al. 2001, Viñoles et al. 2005, Letelier et al. 2008a), los cuales podrían ser explicados por la diferencia en los protocolos experimentales, los estímulos nutricionales y los biotipos utilizados. En este experimento, el incremento observado en los folículos de 2 mm no persistió por más de 24 h, aunque el número de folículos de 3 mm presentó una tendencia a una interacción entre tratamiento y día. Un efecto similar sobre la población de pequeños y medianos folículos antrales reportan Muñoz-Gutiérrez et al. (2002); Viñoles et al. (2005) y Letelier et al. (2008a). Sin embargo, los resultados no fueron similares a los nuestros cuando se considera los folículos de mayor tamaño. Podemos atribuir al tiempo de suplementación o administración de la solución energética, el efecto sobre el desarrollo y el crecimiento folicular, aunque este no siempre culmine con una mayor cantidad de folículos

ovulados. Sin embargo, la inconsistencia observada en la respuesta ovárica utilizando diversos tipos de compuestos nutricionales y vías de administración, podría estar asociada con el estado de desarrollo de esa población folicular al momento de realizar el estímulo energético.

El estado nutricional y el balance energético están relacionados con la concentración plasmática de insulina e IGF- I (Monget & Monniaux, 1995). En vacas, bajos niveles de glucosa e insulina plasmática comprometen la capacidad de respuesta del ovario al estímulo de las gonadotrofinas (Lucy, 2008). Si la concentración plasmática elevada de glucosa e insulina representa un estímulo para aquellos folículos que están en estado de responder a las gonadotrofinas, la hiperglucemia e hiperinsulinemia por 24 h lograda en este experimento podría constituir una de las señales responsables del incremento del número de folículos de 2 mm en el grupo que recibió la SGP en relación al GC.

El momento y la duración del tratamiento con la SGP en relación al retiro de las EIV parece jugar un papel clave en la respuesta ovárica de las ovejas. En este experimento, el estímulo energético es realizado durante un corto período (24 horas), y esto podría determinar que no exista una coincidencia temporal entre el momento de mayor concentración de glucosa e insulina y la fase de reclutamiento folicular de la onda ovulatoria. El estímulo energético no se estaría realizando en el momento de mayor sensibilidad de la población folicular o de lo contrario quizás no sea lo suficientemente prolongado para alcanzar el objetivo.

La condición pastoril de la producción ovina nacional, determina que las ovejas previo y durante la época de servicio reciban una dieta con un porcentaje de proteína cruda (PC) entre un 8% a 10%. Smith & Stewart (1990), reportan que niveles de PC en la dieta superiores a los 125 g (PC digestible/animal/día) incrementan la TO siempre que la energía no sea limitante. Con esos valores de PC digestible en las pasturas naturales difícilmente el consumo individual de las ovejas supere los valores mínimos necesarios para incrementar la TO. Esto sugiere que si bien los niveles de glucosa e insulina se incrementan por la administración de la SN el consumo de PC podría ser una limitante para culminar en un incremento de la TO.

Finalmente, estos resultados sugieren que el incremento de la concentración plasmática de glucosa y de la TO en ovejas suplementadas con una SN podría estar relacionado con el genotipo de las mismas. Ovejas de tipos raciales diferentes o líneas genéticas distintas dentro de un mismo tipo racial muestran respuestas disímiles frente a estímulos energéticos similares. En nuestro caso las ovejas Corriedale utilizadas presentan claras restricciones para incrementar la glucemia aún presentando un peso vivo menor que las ovejas utilizadas en experimentos similares y tampoco responden de la misma manera a un incremento en la TO.

Conclusión

Los resultados demuestran que una hiperglucemia por 24 h durante una fase folicular inducida en ovejas Corriedale en anestro estacional incrementó el reclutamiento folicular, aumentó el número de folículos antrales de 2 mm de diámetro, y el diámetro máximo del folículo preovulatorio, sin embargo, esto no resultó en un incremento de la tasa ovulatoria.

La hiperglucemia provocó cambios en la concentración plasmática de insulina e IGF- I.

CONCLUSIONES GENERALES

- Se desarrolló una metodología que permite aumentar la glucosa plasmática, los resultados de estos trabajos demuestran que la administración de 125 o 150 mL de una solución neoglucogénica comercial o preparada incrementa la glucemia dentro de las 6 horas de su administración. Estos resultados también son concluyentes, en que la administración de una dosis de 125 mL cada 6 horas con una dosis total de 500 mL de una solución neoglucogénica preparada produce una hiperglucemia por 24 horas.
- La administración oral de la solución neoglucogénica en dosis incrementales de 75, 100, 125 y 150 mL cada 6 horas no resultó en un incremento de la glucemia durante 24 horas, ni modificó la tasa ovulatoria en ovejas Corriedale pastoreando campo nativo.
- Una hiperglucemia inducida durante 24 horas en ovejas Corriedale en anestro estacional y pastoreando campo nativo, incrementó el número de folículos antrales de 2 mm de diámetro y el diámetro máximo del folículo preovulatorio, pero no resultó en un aumento de la tasa ovulatoria, a pesar de modificar el estado metabólico.

IMPLICANCIAS PRÁCTICAS

Las soluciones neoglucogénicas en base a glicerol y propilenglicol pueden ser una herramienta de bajo costo, fácil aplicación y rápida respuesta que permitan mejorar la eficiencia reproductiva de las ovejas de cría a través de un incremento en la prolificidad. El glicerol que es el componente que en mayor proporción (70%) se encuentra en la formulación de estas soluciones neoglucogénicas es un subproducto de la elaboración del Biodiesel. El desarrollo en nuestro país de esta tecnología puede determinar en el futuro un incremento en la disponibilidad de este producto, a precios accesibles e independientemente de la época del año.

En situaciones de escasez de forraje, habituales en nuestro sistema de producción ovina a campo natural y en el contexto de una realidad que se manifiesta complicada para la disponibilidad de tierra y de costos elevados para la utilización de pasturas mejoradas o concentrados energéticos-proteicos, disponer de recursos tecnológicos que permitan a través de un

estimulo energético ultrarrápido, aplicado estratégicamente en determinadas épocas y momento del ciclo reproductivo de las ovejas incrementar la tasa ovulatoria puede transformarse en una herramienta de gran utilidad para los productores ovinos nacionales.

El desarrollo y validación de una propuesta tecnológica que permita incrementar la prolificidad de las ovejas, puede fortalecer y potenciar, los programas de desarrollo a mediano y largo plazo, para pequeños y medianos productores rurales, aportando herramientas que permitan darle sustentabilidad a la producción de carne ovina de calidad (corderos) a través de una mayor producción de corderos.

ABREVIATURAS

AGV: ácidos grasos volátiles

CC: condición corporal

CE: ciclo estral

CL: cuerpo lúteo

CN: campo natural

EEBR: Estación Experimental Bernardo Rosengurt

EIV: esponja intravaginal

FSH: hormona folículo estimulante

GC: grupo control

GH: hormona de crecimiento

GnRH: hormona liberadora de gonadotropina

IGF: factor de crecimiento similar a la insulina

IGF-I: factor de crecimiento similar a la insulina tipo I

LH: hormona luteinizante

NEFA: ácidos grasos no esterificados

NGH: neoglucogenesis hepática

MAP: acetato de medroxi progesterona

MS: materia seca

PC: proteína cruda

PGF₂α: prostaglandina F 2 alfa

PV: peso vivo

RIA: radio inmuno análisis

SN: solución neoglucogénica

SGC: solución neoglucogénica comercial

SGP: solución neoglucogénica preparada

TAG: triacilglicéridos

TO: tasa ovulatoria

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Adams N, Martin G. 1990. Level of nutrition affects plasma oestradiol and FSH in ovariectomised steroid supplemented ewes. Proc. Endocr. Soc. Australia 33: 20.
2. Adams N R, Atkinson S, Martin GB, Briegel JR, Boukhliq R and Sanders MR. 1993. Frequent blood sampling changes the plasma concentration of LH and FSH and the ovulation rate in Merino ewes. Journal of Reproduction and Fertility 99: 689-694.
3. Adams N, Abordi J, Briegel J, Sanders M. 1994. Effect of diet on the clearance of estradiol -17 β in the ewe. Biology of Reproduction 51: 668-674.
4. Adams PG. 2007. Application of the bovine model for the study of ovarian function in other species. Arch. Latinoam. Prod. Anim. Vol. 15 (Supl.1).
5. Alison MB, Jess T, Milligan G, Brown CM. 1993. Immunological analysis of glucose transporters expressed in different regions of the rat brain and central nervous systems. Biochemical and biophysical research communications. Vol 192 (3): 1297-1302.
6. Antunovic Z, Šperanda M, Steiner Z. 2004. The influence of age and the reproductive status to the blood indicators of the ewes. Arch. Tierz., Dummerstorf 47 (3): 265-273.
7. Ayala W, Bermudez R, Carrámbula M, Carriquiry E, Mas C. 1995. Campo natural, estrategia invernal, manejo y suplementación. Serie Actividades de difusión INIA, N° 49: 28.
8. Azzarini M. 1983. El efecto de la inmunización contra esteroides ováricos mediante "Fecundina" sobre la reproducción de ovejas Corriedale. Tasa Ovulatoria. SUL. Boletín Técnico N° 14: 17-23.
9. Azzarini M. 1985a. Vías no genéticas para modificar la prolificidad ovina. En: Il Seminario Técnico de Producción Ovina. SUL, 111-132.
10. Azzarini M. 1985b. Laparoscopia en ovejas. Descripción de la técnica y sus principales usos. SUL Boletín Técnico "Ovinos y Lanas" N° 14: 13-16.
11. Azzarini M. 1988. Desempeño reproductivo en pasturas nativas y mejoradas, de ovejas Corriedale inmunizadas contra esteroides. Producción Ovina, 2: 43-48.
12. Azzarini M. 1992. Reproducción en Ovinos en América Latina. Algunos resultados de la investigación sobre factores determinantes del desempeño reproductivo y su empleo en condiciones de pastoreo. Producción Ovina N°5: 7-56.
13. Azzarini M. 2003. El cordero pesado tipo SUL. Un ejemplo de desarrollo integrado en la producción de carne ovina del Uruguay. 12° Congreso Mundial Corriedale. Uruguay, 11-17.
14. Azzarini M. 2004. Potencial reproductivo de los ovinos En: Producción Ovina. SUL. En: (16): 5-17.
15. Azzarini M, Fernandez Abella D. 2004. Potencial reproductivo de los ovinos En: Seminario Producción Ovina: Propuestas para el negocio ovino, 14-25.
16. Austin CR, Short RV. 1988. Hormonal control of reproduction. In mammals. Volumen 3, 2° Edición. Cambridge University Press. Cambridge - Great Britain, 244.
17. Banchemo G, A I Vázquez, G Quintans. 2002. Alternativas de manejo para aumentar la tasa ovulatoria en ovejas Corriedale. In: Producción Animal,

- Unidad Experimental Palo a Pique. Actividades de Difusión N° 294, INIA Treinta y Tres, 32-36.
18. Banchemo G, Milton J, Lindsay D, La Manna A, Vazquez A, Quintans G. 2003. Como aumentar la tasa ovulatoria/mellicera en ovejas Corriedale. En: Jornada Anual de Producción Animal. Actividades de difusión 332, INIA, Treinta y Tres. Resultados experimentales, 52-56.
 19. Banchemo G, Quintans G. 2005. Alternativas nutricionales y de manejo para aumentar la señalada de la majada en sistemas extensivos: tasa ovulatoria/tasa mellicera. En: Actividades de difusión de INIA N° 429, II, 28-33.
 20. Baker TG. 1982. Células germinales primordiales. En: C.R. Austin y R.V. Short. Procesos de reproducción en los mamíferos. Células germinales y fertilización. Ed. Científicas. La prensa medica mexicana, S.A., Capítulo I, 1-14.
 21. Baker TG. 1982. Oogénesis y ovulación. En: C. R. Austin y R. V. Short Procesos de reproducción en los mamíferos. Células germinales y fertilización. Ed. Científicas, La prensa medica mexicana, S.A., Capítulo II, 15-48.
 22. Barrán JP. 1974. Apogeo y crisis del Uruguay pastoril y caudillesco 1839-1875. Historia Uruguaya / Tomo 4. Ed. De la Banda Oriental, 1ª Ed.104-108.
 23. Bartlewski PM, Beard AP, Cook SJ, Rawlings NC. 1998. Ovarian follicular dynamics during anoestrus in ewes. J Reprod. Fertil. 113 (2): 275-285. DOI: 10.1530/JRF.0.1130275.
 24. Bartlewski PM, Beard AP, Cook SJ, Chandolia RK, Honaramooz A, Rawlings NC. 1999. Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrus cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. J Reprod Fertil. 115 (1): 111-124.
 25. Bauer-Dantoin AC, Weiss J, Jameson JL. 1995. Roles of estrogen, progesterone, and gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the control of pituitary GnRH receptor gene expression at the time of the preovulatory gonadotropin surges. Endocrinology, Vol. 136 (3): 1014-1019.
 26. Bonino Morlán J. 1985. Toxemia de la Preñez. En: II Seminario técnico de producción ovina. SUL, 145-161.
 27. Cardelino R. 1970. Relevamiento básico de la producción ovina en el Uruguay. Secretariado Uruguayo de la Lana.
 28. Chase CC, Del Vecchio R, Smith S, Randel R. 1992. In vitro metabolism of glucose by bovine reproductive tissues obtained during the estrous cycle and after calving. J Anim Sci. 70(5).1496-1508.
 29. Cahill LP, Mauléon P. 1980. Influences of season, cycle and breed on follicular growth rates in sheep. J Reprod Fertil. 58 (2): 321-328.
 30. Cameron JL. 1997. Search for the signal the conveys metabolic status to the reproductive axis. Endocrinology and Diabetes, 4: 158-163.
 31. Carámbula M. 1991. Aspectos relevantes para la producción forrajera. En: Pasturas y producción animal en áreas de ganadería extensiva. Milton Carámbula, Daniel Vaz Martín, Eduardo Indarte. INIA. Serie Técnica N° 13: 5-46.
 32. Carriquiry M. 2006. Reproductive success in dairy cows: The linkage of milk yield, nutrition and reproduction. Thesis Doctor. Departament of Animal Science, University of Minnessota, St. Paul. USA.

33. Catalano R, Sirhan L. 1993. "Flushing" en ovinos: importancia de la energía y la proteína como determinantes de una mayor prolificidad. *Avances en Producción Animal* 18 (1-2): 21-30.
34. Cavestany D, Perdígón F, Sosa L, de Vicenzi J, Elhordoy D, Tagle R, Gama S. 1991. Estudios sobre estacionalidad reproductiva en ovinos. INIA. Proyecto FPTA/017.
35. Cayota S, Freiria H, Petraglia. 1981. Caracterización física, química y mineralógica de algunos suelos de las asociaciones Arroyo Blanco, Los Mimbres, Fraile Muerto y Zapallar (Departamento de Cerro Largo). Tesis de grado, Facultad de Agronomía, UDELAR, Uruguay.
36. Clarke IJ, Cummins JT. 1982. The temporal relationship between gonadotropin releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone (LH) secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinology* 111(5): 1737-1739.
37. Church CD. 1988. *El Rumiante, Fisiología digestiva y nutrición*. Edición en lengua española, 1993. Editorial Acribia, S.A.
38. Coop IE. 1966. Effect of flushing on reproductive performance of ewes, *Journal of Agricultural Science, Cambridge* 67: 305-320.
39. Davis GH. 2005. Major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genet. Sel Evol.* 37 Suppl. 1: 11-23.
40. de Castro T, Rubianes E, Menchaca A, Rivero A. 1999. Ovarian dynamics, serum estradiol and progesterone concentrations during the interovulatory interval in goats. *Teriogenology* 52: 399-411. doi:10.1016/S0093-691X(99)001138-7.
41. De los Campos G, Montossi F. 2002. La cadena de Producción-Transformación de carne ovina en Uruguay: Análisis de la evolución de la última década y perspectivas. En: *Investigación aplicada a la cadena agroindustrial cárnica: Avances obtenidos: Carne ovina de calidad (1988-2001)*. Ed: INIA. Serie Técnica N° 126: 25-38.
42. Demigné C, Yacoub C, Rèmèsy C, Fafournoux P. 1986. Propionate and butyrate metabolism in rat or sheep hepatocytes. *Biochim Biophys Acta.* 28, 875 (3): 535-542.
43. Demigné C, Yacoub C, Morand C, Rèmèsy C. 1991. Interactions between propionate and amino acid metabolism in isolated sheep hepatocytes. *Br J Nutr* 65 (2): 301-317.
44. DICOSE. División Contralor de Semovientes. 2007. Declaración Jurada. www.mgap.gub.uy/DGSG/DICOSE/ Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca.
45. DIEA. Dirección Estadísticas Agropecuarias 2007. Anuario Estadístico Agropecuario. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca.
46. DNM. Dirección Nacional de Meteorología. <http://www.meteorología.com.uy>
47. Downing JA, Scaramuzzi RJ. 1991. Nutrient effects on ovulation rate, ovarian function and the secretion of gonadotrophic and metabolic hormones in sheep. *Journal of Reproduction and Fertility Suppl.* 43: 209-227.
48. Downing J, Joss J, Scaramuzzi R. 1995b. Ovulation rate and the concentrations of gonadotrophins and metabolic hormones in ewes infused with glucose during the late luteal phase of the oestrous cycle. *J Endocrinol.* 146(3): 403-410.

49. Downing JA, Joss J, Scaramuzzi RJ. 1995c. A mixture of the branched chain amino acids leucine, isoleucine and valine increases ovulation rate in ewes when infused during the late luteal phase of the oestrous cycle: an effect that may be mediated by insulin. *J Endocrinol.* 145(2): 315-323.
50. Downing J, Joss J, Connell P, and Scaramuzzi J. 1995a. Ovulation rate and the concentración of gonadotrophic and metabolic hormones in ewes fed lupin grain. *J Reprod Fertil.* 103(1): 137-145.
51. Eckery DC, Moeller L, Nett TM, Sawyer HR. 1997. Localization and quantification of binding sites for follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, growth hormone, and insulin-like growth factor I in sheep ovarian follicles. *Biol Reprod.* 57 (3): 507-513.
52. Emery RS, Burg N, Brown LD and Blank GN. 1964. Detection, occurrence and prophylactic treatment of borderline ketosis with propylene glycol feeding. Journal Article N° 3411 Michigan Agricultural Experiment Station.
53. Evans AC, Duffy P, Hynes N, Boland MP. 2000. Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. *Theriogenology* 53, (3): 699-715 doi:10.1016/S0093 - 691X(99)00268-X.
54. Fernández Abella D, Saldaña S, Surraco L, Villegas N, Rodríguez Palma R. 1996. Evaluación de la variación estacional de la actividad sexual y crecimiento de lana en cuatro razas ovinas. *Boletín Técnico de Ciencias Biológicas de la Universidad de la República*, 4: 19-44.
55. Fernández Abella D, Formoso D, Labourcade E, Rodríguez Monza P, Monza J, Aguerre JJ, Ibáñez W. 2005. Efecto del nivel de oferta de Lotus uliginosus cv. Maku previo al servicio sobre la fecundidad ovina. *Producción Ovina* 17: 37- 46.
56. Ferraro SM, Mendoza GD, Miranda LA, Gutiérrez CG. 2009. *In vitro* gas production and ruminal fermentation of glycerol, propylene glycol and molasses. *Animal Feed Science and Technology*, 154 (1): 112-118.
57. Ferrería J, Rodríguez Iglesias R, Pedrueza J, Pevsner D. 2006. Respuesta ovárica y estral de ovejas Corriedale anovulatorias tratadas con acetato de medroxyprogesterona (MAP), dosificadas con una solución gluconeogénica, y expuestas a carneros y ovejas en celo. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 26, Supl. 1: 280-281.
58. Fletcher IC. 1981. Effects of energy and protein intake on ovulation rate associated with the feeding of lupin grain to Merino ewes. *Australian Journal of Agricultural Research* 32 (1): 79- 87.
59. Formoso D. 2006. Productividad primaria neta de los principales campos sobre suelos de basalto y cristalino. *Producción Ovina* 18: 33-40.
60. Fortune JE, Rivera GM, Yang MY. 2004. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Anim Reprod Sci.* 82-83: 109-126.
61. Francis HA and Marshall. 1905. Fertility in Scottish Shepp. *Proceedings of the Royal Society of London. Biological Character*, Vol 77, N° 514: 58-63.
62. Ganzábal A. 2005. Análisis de registros reproductivos en ovejas Corriedale. En: Seminario de actualización técnica. Reproducción ovina. pp. 69.

63. Ginther OJ, Knopf L, Kastelic JP. 1989. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *J Reprod Fertil.* 87(1): 223-230.
64. Ginther OJ, Kot K, Wiltbank MC. 1995. Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrus cycle in ewes. *Theriogenology* 43 (3): 689-703. doi:10.1016/0093-691X(94)00074-5.
65. Goldman B. 2001. Mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. *J Biol Rhythms*, 16 (4): 283-301. DOI: 10.1177/074873001129001980.
66. Gong JG. 2002. Influence of metabolic hormones and nutrition on ovarian follicle development in cattle: practical implications. *Domest Anim Endocrinol* 23 (1-2): 229-241.
67. Gordon D, Niswender J, Juengel P, Silva M, Keith R, Eric W. Mc Intush. 2000. Mechanisms Controlling the Function and Life Span of the Corpus Luteum. *Physiol. Rev.* Vol. 80 (1): 1-29.
68. Grummer R, Winkler J, Bertics S, Studer V. 1994. Effect of propylene glycol dosage during feed restriction on metabolites in blood of prepartum Holstein heifers. *J Dairy Sci.* 77(12): 3618-3623.
69. Gunn RG, Doney JM, Smith WF. 1984. The effect of the level of pre-mating nutrition on ovulation rate in Scottish Blackface ewes under different body conditions at mating. *Animal Production.* 37: 235-239.
70. Hafez E. 1952. Studies on the breeding season and reproduction of the ewe. *J Agric Sci.* 42: 13-265.
71. Hafez E. 1996. Ciclos reproductivos. En: Hafez ESE (1996) *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales.* Ed. McGraw-Hill, Interamericana. 6^{ta}. Ed. (Español) Cap. 4: 89-107.
72. Henderson KM, Savage LC, Ellen RL, Ball K, McNatty KP. 1988. Consequences of increasing or decreasing plasma FSH concentrations during the preovulatory period in Romney ewes. *J Reprod Fertil.* 84(1): 187-196.
73. Hirshfield AN. 1991. Theca cells may be present at the outset of follicular growth. *Biol Reprod.* 44 (6): 1157-1162.
74. Hunter MG, Robinson RS, Mann GE, Webb R. 2004. Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. *Anim. Reprod Sci.* 82-83: 461- 477.
75. Husted SM, Nielsen MO, Blache D, Ingvarsen KL. 2008. Glucose homeostasis and metabolic adaptation in the pregnant and lactating sheep are affected by the level of nutrition previously provided during her late fetal life. *Domest Anim Endocrinol.* 34 (4): 419-431.
76. INAC. Instituto Nacional de Carnes. 2008. <http://www.inac.gub.uy>
77. Instituto de Economía. 1999. La generación de empleo en el complejo textil lanero. Facultad de Ciencias Económicas.
78. Jefferies BC. 1961. Body condition scoring and its use in management. *Tasmanian Journal of Agriculture* 32: 19-21.
79. Kaneko J. 1997. Carbohydrate metabolism and its diseases. In: Kaneko J,

- Harvey J, Bruss H, Clinical biochemistry of domestic animals, Eds. Academic Press, California-US, chapter 3: 45-80.
80. Karsch FJ, Bowen JM, Caraty A, Evans NP, Moenter SM. 1997. Gonadotropin-releasing hormone requirements for ovulation. *Biol. Reprod.* 56 (2): 303-309.
 81. Kasa-Vubu J, Dahl GE, Evans NP, Thrun LA, Moenter SM, Padmanabhan V, Karsch FJ. 1992. Progesterone blocks the estradiol- induced gonadotropin discharge in the ewe by inhibiting the surge of gonadotropin-releasing hormone *Endocrinology.* 131(1): 208-12. 0013-7227/92/1311.
 82. Knight T W. 1980. Effects of diet and liveweight on ovulation rates in Romney ewes. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production,* 40: 38-42.
 83. Knight PG, Glister C. 2006. Focus on TGF- β Signalling TGF- β superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction* 132: 191-206. DOI: 10.1530/REP.1.01074.
 84. Kosior-Korzecka U and Bobowiec R. 2003. Change in the level of endogenous leptin, FSH, 17 β beta-oestrediol and metabolites during lupin-induced increase in ovulation rate in ewes. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 50 (7): 343-349.
 85. Landau S, Nitsan Z, Zoret Z, Madar Z. 1992. The influence of processing corn grain on glucose metabolism in ewes. *Reprod Nutr Dev.* 32(3): 231-240.
 86. Landau S, Bor A, Leibovich H, Zoref Z, Nitsan Z, Madar Z. 1995. The effect of ruminal starch degradability in the diet of Booroola crossbred ewes on induced ovulation rate and prolificacy. *Animal Reproduction Science* 38: 97-108.
 87. Laws S, Beggs M, Webster J, Miller WL. 1990. Inhibin increases and progesterone decreases receptors for gonadotropin-releasing hormone in ovine pituitary culture. *Endocrinology* 127(1): 373-80.
 88. Lehninger A. 1980. *Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y la función celular.* Segunda Edición. Barcelona, Ediciones Omega S.A. pp: 1117.
 89. Letelier C, Mallo F, Encinas T, Ros J, and Gonzales-Bulnes A. 2008a. Glucogenic supply increases ovulation rate by modifying follicle recruitment and subsequent development of preovulatory follicles without efectos on ghrelin secretion. *Reproduction* 136 (1): 65-72. DOI:10.1530/REP-08-0010.
 90. Letelier C, Gonzales-Bulnes A, Hervé A, Correa J, Pulido R. 2008b. Enhancement of Ovulatory Follicle Development in Maiden Sheep by Short-term Supplementation with Steam-flaked Corn. *Reprod Domest Anim.* 43(2): 222-227. DOI: 10.1111/j.1439-0531.
 91. Lindsay D, Knight W, Smith J and Oldham C. 1975. Studies in ovino fertility in agricultural regions of Western Australia: ovulation rate, fertility and lambing performance. *J. Agric. Res.* 26: 189- 98.
 92. Lucy MC. 2000. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. *J Dairy Sci* 83: 1635-1647.

93. Lucy MC. 2008. Functional differences in the growth hormone and insulin-like growth factor axis in cattle and pigs: implications for post-partum nutrition and reproduction. *Reprod Domest Anim.* ;43 Suppl 2: 31-9.
94. Lozano JM, Lonergan P, Boland MP, O'Callaghan D. 2003. Influence of nutrition on the effectiveness of superovulation programmes in ewes: effect on oocyte quality and post-fertilization development. *Reproduction* 125(4): 543-553.
95. Manzano C, García Miniet ER, Miranda Moya G, León Álvarez E, Fonseca Jiménez Y. 1999. Relación entre peso vivo, condición corporal e indicadores bioquímicos de la nutrición en ovejas vacías y secas de la raza pelibuey. *Arch. Zootec.* 48: 223-226.
96. McCracken JA, Custer EE, Lamsa JC, Robinson AG. 1995. The central oxytocin pulse generator: a pacemaker for luteolysis. *Adv Exp Med Biol.* 395: 133-154.
97. Martin GB, Tjondronegoro S, Blackberry MA. 1994. Effects of nutrition on testicular size and the concentración of gonadotrophins, testosterone and inhibine in plasma of mature male sheep. *J Reprod Fert.* 101(1): 121-128.
98. Martin GB, Walkden-Brown SW. 1995. Nutricional influences on reproduction in mature male sheep and goats. *J Reprod Fert Suppl.* 49: 437- 449. Review.
99. Mc Donald P, Edwards RA, Greenhalh JF, Morgan CA. 1988. *Animal Nutrition*, 6^{ta} Ed. Zaragoza, Acribia, pp: 587.
100. Mayes, PA. 1999. Gluconeogenesis and Control of blood glucose. In: *Harper's Biochemistry*. Eds. RK Murray, DK Granner, PA Mayes, VW Rodwell. McGraw-Hill, New York. 208-218.
101. Meikle A, Forsberg M. 2001. Conceptos básicos sobre progesterona y reproducción bovina. Radioinmunoanálisis. Control de calidad del Radioinmunoensayo (RIA). Swedish University of Agricultural Sciences. Report 17.
102. Miller D, W Joanne L Harrison, Ellen J. Bennett, Patricia A. Findlay and Clare L Adam. 2007. Nutritional Influences on Reproductive Neuroendocrine Output: Insulin, Leptin, and Orexigenic Neuropeptide Signaling in the Ovine Hypothalamus. *Endocrinology* 148(11): 5313- 5322.
103. Miyoshi S, Patê J, Palmquist D. 2001. Effects of propylen glycol drenching on energy balance, plasma glucose, plasma insulin, ovarian function and conception in dairy cows. *Anim Reprod Sci.* 68(1-2): 29-43.
104. Moenter SM, Brand RC, Karsch FJ. 1992. Dynamics of Gonadotropin - Releasing Hormone (GnRH) Secretion during the GnRH surge: Insights into the Mechanism of GnRH Surge linduction. *Endocrinology.* 130(5): 2978-2984.
105. Monget P, Monniaux D. 1995. Growth factors and the control of folliculogenesis. *J Reprod Fertil. Suppl.* 49: 321-333.
106. Monget P, Bondy C. 2000. Importance of the IGF system in early folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 25; 163 (1-2): 89-93.
107. Monget P, Fabre S, Mulsant P, Lecerf F, Elsen F, Mazerbourg S, Pisselet C, Monniaux D. 2002. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and

- BMP system in domestic animals. *Domest Anim Endocrinol.* 23(1-2): 139-54.
108. Montossi F, Pigurina G, Santamarina I, Berreta E. 2000. Estudios de selectividad animal en diferentes comunidades vegetales de la región de basalto y su importancia práctica en el manejo del pastoreo con ovinos y vacunos. En: *Serie Técnica* 113: 14-28.
 109. Montossi F, San Julian R, Brito G, De los Campos G, Ganzábal A, Dihiero A, De Barbieri I, Castro, Robaina R, Pigurina G, de Matto D, Nolla M. 2003. Producción de carne ovina de calidad con la raza Corriedale: recientes avances y desafíos de la innovación tecnológica en el contexto de la cadena cárnica ovina del Uruguay. 12º Congreso Mundial Corriedale. Uruguay, 74-90.
 110. Montossi F, Dihiero A, De Barbieri I, Nolla M, San Julian R, Brito G, Mederos A, Luzardo S, Castro L, Robaina R. 2004. Producción de carne ovina de calidad del Uruguay: Una alternativa rentable y una apuesta para el futuro. En: *Seminario Producción Ovina: Propuesta para el negocio ovino*, 62-84.
 111. Morris JD, Fernandez AM, Chapa LR, Gentry LR, Thorn KE, Weick TM. 2002. Effects of sample handling, processing, storage, and hemolysis on measurements of key energy metabolites in ovine blood. *Small Ruminant Research* 43: 157-166.
 112. Muñoz-Gutierrez M, Blanche D, Martin G, Scaramuzzi R. 2002. Folliculogenesis and ovarian expression of mRNA encoding aromatase in anoestrous sheep after 5 days of glucosa or glucosamine infusión or supplementary lupin feeding. *Reproduction* 124 (5): 721-731.
 113. Muñoz-Gutierrez M, Blanche D, Martin GB, and Scaramuzzi RJ. 2004. Ovarian follicular expression of mRNA encoding the type I IGF receptor and IGF-binding protein-2 in sheep following five days of nutritional supplementation with glucose, glucosamine or lupins. *Reproduction*, 128 (6): 747-756.
 114. Muñoz-Gutiérrez M, Finlay P, Adam CL, Wax G, Campbell BK, Kendall NR, Khalid M, Forsberg M, Scaramuzzi RJ. 2005. The ovarian expression of mRNAs for aromatase, IGF-I receptor, IGF-binding protein 2, 4 and 5, leptin and leptin receptor in cycling ewes after three days of leptin infusion. *Reproduction* 130: 869-881.
 115. Murphy B, Pescador N. 1996. Biología celular de la foliculogenesis bovina. En: *Il Simposio Internacional de Reproducción Animal*. IRAC. pp: 1-11.
 116. Nandi S, Kumar V, Manjunatha B, Gupta P. 2007. Biochemical composition of ovine follicular fluid in relation to follicle size. *Dev Growth Differ.* 49 (1): 61-66.
 117. Nandi S, Girish Kumar, Manjunatha B, Ramesh H, Gupta H. 2008. Follicular fluid concentrations of glucose, lactate and pyruvate in buffalo and sheep, and their effects on cultured oocytes, granulosa and cumulus cells. *Theriogenology.* 69 (2): 186-96.
 118. Ndibualnji B, Godeau J. 1993. La néoglucogenèse et les acides aminés chez les ruminants. *Ann Méd. Vét.*, 137 : 537- 554. *Revue.*

119. Nett TM, McClellan MC, Niswender GD. 1976. Effects of prostaglandins on the ovine corpus luteum: blood flow, secretion of progesterone and morphology. *Biol Reprod.* 15 (1): 66-78.
120. Noel B, Bister JL and Paquay R. 1993. Ovarian follicular dynamics in Suffolk ewes at different periods of the year. *J. Reprod. Fertil.* 99 (2): 695-700.
121. Nottle MB, Haind PI, Seamark RF, Setchell BP. 1988. Increases in ovulation rate in lupin feed ewes are initiated by increases in protein digested post-ruminally. *J Reprod Fertil.* 84(2): 563-566.
122. Nottle M.B, Samara RF, Setchell BP. 1990. Feeding lupin grain for six days prior to a cloprostenol-induced luteolysis can increase ovulation rate in sheep irrespective of when in the oestrous cycle supplementation commences. *Reprod Fertil Dev.* 2 (2): 189-192.
123. Oficialdegui R. 1990. Suplementación estratégica en lanares. En: 3º Seminario técnico de producción ovina. SUL, 167-177.
124. Orcasberro R. 1985. Nutrición de la oveja de cría. II Seminario técnico de la Producción Ovina. Secretariado Uruguayo de la Lana SUL, 89-107.
125. Osgerby JC, Gadd TS, Wathes DC. 2003. Effect of maternal body condition on placental and fetal growth and the insulin-like growth factor axis in Dorset ewes. *Reproduction.* 125 (5): 717-731.
126. Pérez-Clariget R, Bermudez J, Adersson H, Bagueño J. 1998. Influence of nutrition on testicular growth in Corriedale rams during spring. *Reprod Nutr Dev* 38 (5): 529-538.
127. Pérez-Clariget R, López-Mazz C, Regueiro M, Crooker B, Carriquiry, M. 2008. Hyperglycaemia in day 9 of the estrous cycle did not increase ovulation rate in ewes but modified plasma IGF-I concentrations. 16th Congreso Internacional de Reproducción Animal (ICAR).
128. Pevsner D, Ciccioli N, Rodríguez Iglesias R, Ferrería J, Rosas C. 2005. Actividad ovárica inducida en ovejas Corriedale acíclicas tratadas con 17 β estradiol, dosificadas con una solución gluconeogénica y expuestas a carneros y ovejas en celo. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 25 Supl. 1: 256-257.
129. Pierre A, Pisselet C, Dupont J, Bontoux M, Monget P. 2005. Bone Morphogenetic Protein 5 Expression in the Rat Ovary: Biological Effects on Granulosa Cell Proliferation and Steroidogenesis. *Biol Reprod.* 73: 1102-1108.
130. Rabiee AR, Lean IJ, Gooden JM, Miller BG. 1997. Short-term studies of ovarian metabolism in the ewe. *Anim Reprod Sci.* 47(1-2): 43-58.
131. Radostitis OM, Blood DC, Gay CC. 1994. Ketosis of ruminantes acetoneemia of cattle, pregnancy toxemia of sheep. En: *Veterinary medicine.* 8^a ed. Baillière Tindall, Londres, 1343-1354.
132. Ravindra JP, Rawlings NC, Evans ACO, Adams GP. 1994. Ultrasonographic study of ovarian follicular dynamics in ewes during the oestrous cycle. *Journal of Reproduction and Fertility* 101: 501- 509.
133. Recabarren SE, Padmanabhan V, Codner E, Lobos A, Durán C, Vidal M, Foster DL, Sir-Petermann T. 2005. Postnatal developmental consequences of altered insulin sensitivity in female sheep treated

- prenatally with testosterone. *An J Physiol Endocrinol Metab.* 289(5): 801-806.
134. Recabarren SE, Lobos A, Muñoz P, M Calvillán, Parilo J. 2005. Sensibilidad a la insulina en ovejas prepúberes con alimentación normal y con restricción alimenticia. *Arch. Med. Vet.* 37, N° 2: 111-116.
 135. Rodriguez Iglesias RM, Ciccioli N, Irazoqui H, Rodriguez BT. 1991. Importance of behavioural stimuli in ram-induced ovulation in seasonally anovular Corriedale ewes. *Applied Animal Behaviour Sci.* 30: 323-332.
 136. Rodriguez Iglesias RM, Ciccioli N, Irazoqui H, Giglioli C. 1996. Ovulation rate in ewes after single oral glucogenia dosage during a ram-induced follicular phase. *Anim Reprod Sci.* 4: 211-221.
 137. Rubianes E, Beard A, Dieschke DJ, Bartlewki P, Adams GP, Rawlings NC. 1997. Endocrine and ultrasound evaluation of the response to PGF₂α and GnRH given at different stages of the luteal phase in cyclic ewes. *Terioenology* 48 (7): 1093-1104. DOI: 10.1016/S0093-691X(97)00342-7.
 138. SAS Institute. 2001. SAS User's Guide Statistics. SAS Inst. INC. Cary. NC, USA.
 139. Salgado S. 2004. Producción Ovina: Situación actual y perspectivas. En: Seminario Producción Ovina: Propuestas para el negocio ovino. pp: 7-13.
 140. Scaramuzzi RJ, Adams NR, Baird D, Campbell BK, Dowing JA, Findlay JK, Henderson KM, Martin GG, McNatty KP, McNeilly AS and Tsonis CG. 1993. A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reprod. Fertil Dev.* 5 (5): 459-478. Review.
 141. Scaramuzzi RJ, Campbell BK, Downing JA, Kendall RK, Khalid M, Muñoz-Gutierrez M, Somchit A. 2006. A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reprod Nutr Dev.* 46(4): 339-354. Review. DOI:10.1051/rnd:2006016.
 142. Sienra R, Bonino J, Larregui V, Echeguía M. 1984. Toxemia de la Preñez II. Inducción experimental y respuesta a la terapia con Glicerol-Propilenglicol. *Veterinaria. Montevideo.* Vol 20: N° 88/89: 78-83.
 143. Smith JF. 1985. Protein and Energy in the ovulation rate. In: Land and Robinson (eds.) *Genetics of Reproduction*, London Buterworths, pp: 349-360.
 144. Smith JF, Stewart RD. 1990. Effects of nutrition on the ovulation rate of ewes. In: *Reproductive Physiology of Merino Sheep. Concepts and Consequences.* School of Agricultura (Animal Science). University of Western Australia pp: 85-102.
 145. Souza CJ, Gonzáles-Bulnes A, Campbell BK, McNeilly AS, Baird DT. 2004. Mechanisms of action of the principal prolific genes and their application to sheep production. *Reprod Fertil Dev.* 16(4): 395-401. Review.
 146. Stewart R, Oldham C. 1986. Feeding lupin to ewes for four days during the luteal phase can increase ovulation rate. *Proceedings of the Australian Society of Animal Production* 16: 367- 370.

147. SUL. Secretariado Uruguayo de la Lana. 2007. Anuario Estadístico. Web: <http://w.w.w.sul.org.uy>.
148. Teleni E, King W, Rowe J, M Dowell GH. 1989a. Lupins and energy yielding nutrients in ewes. I. Glucose and acetate biokinetics and metabolic hormones in sheep fed a supplement of lupin grain. *Australian Journal of Agricultural Research* 40: 913- 924.
149. Teleni E, Rowe J, Croker K, Murray P, King W. 1989b. Lupins and energy-yielding nutrients in ewes II Responses in ovulation rate in ewes to increased availability of glucose, acetate and amino acids. *Reprod Fertil Dev.* 1 (2): 117-125.
150. Thiéry J, Martín G. 1991. Neurophysiological control of the secretion of gonadotrophin-releasing hormone and luteinizing hormone in the sheep. *Reprod. Fertil Dev.* 3 (2): 137-73. Review.
151. Ungerfeld R, Rubianes E. 1999. Effectiveness of short-term progestogen primings for the induction of fertile estrus with eCG in ewes during late seasonal anestrus. *Animal Science* 68: 349- 353.
152. Ungerfeld R, Suárez G, Carvajal B, Silvia L, Laca M, Forsberg M, Rubianes E. 2003. Medroxyprogesterone priming and responde to the ram effect in Corriedale ewes during the nonbreeding season. *Theriogenology.* 60(1): 35-45.
153. Viglizzo E. 1981. Dinámica de los sistemas pastoriles de producción lechera. Editorial Hemisferio Sur.
154. Vincent G. 2002. Situación actual y perspectivas del mercado de carne ovina. Serie Técnica 126 INIA En: Investigación aplicada a la cadena agroindustrial cárnica, avances obtenidos: carne ovina de calidad (1998-2001).
155. Viñoles C, Forsberg M, Banchemo G, Rubianes E. 2002. Ovarian follicular dynamics and endocrine profiles in Polwarth ewes with high and low body condition. *British Society of Animal Science.* 74: 539-545.
156. Viñoles C. 2003. Effect of nutrition on follicle development and ovulation rate in the ewe. Doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Suecia.
157. Viñoles C, Forsberg M, Martin GB, Cajarville C, Repetto J, Meikle A. 2005. Short-term nutritional supplementation of ewes in low body condition affects follicle development due to an increase in glucose and metabolic hormones. *Reproduction.* 129 (3): 299-309.
158. Webb R, Nicholas B, Gong JG, Campbell BK, Gutierrez CG, Garverick HA, Armstrong DG. 2003. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle *Reprod Suppl.* 61: 71-90. Review.
159. Weber W, Wallace CR, Hansen LB, Chester-Jones H, Crooker B. 2007. Effects of selection for milk yield on somatotropin, insulin-like growth factor-I and placental lactogen in Holstein cows. *J Dairy Sci.* (Submitted).
160. Whisnant CS, Curto K, Goodman RL. 1992. Immunocytochemical localization of beta endorphin and gonadal steroid regulation of proopiomelanocortin messenger ribonucleic acid in the ewe. *neuroendocrinology.* 56 (6): 812-21.

161. Wijayasinghe MS, Smith NE and Baldwin RL. 1984. Growth, Health, and Blood Glucose Concentrations of Calves Fed High-Glucose or High-Fat Milk Replacers. *Journal of Dairy Science* Vol.67, (12): 2949 - 2956.
162. Williams S, Blanche D, Martín G, Foot R, Blackberry M, Scaramuzzi R. 2001. Effect of nutritional supplementation on quantities of glucose transporters 1 and 4 in sheep granulosa and theca cells. *Reproduction*, 122(6): 947-956.
163. Williams S. 2000. Studies into nutritional effects on ovulation rate and glucose transporter proteins in the sheep ovary. Thesis Doctor. Royal Veterinary College, University of London.
164. Wlasiuk G, Lessa E, Azzarini M, Fernandez Abella D. 2001. Diagnóstico genético de la mutación Booroola en ovinos uruguayos. *Producción Ovina* 14: 5-14.

COMPARISON OF DIFFERENT DOSES OF TWO NEOGLUCOGENIC SOLUTION IN SHEEP WITH DIFFERENT PHYSIOLOGICAL STATUS.

C López-Mazz*; R Pérez-Clariget*, A López*, J Burgueño**

*Dept Animal Production and Forage

** Dept Statistics

Faculty of Agriculture, University of Republic, Uruguay

crlopez@dinet.com.uy

INTRODUCCION

Neoglucogenic solutions are normally used to prevent signs of pregnancy toxemia. The aim of this work was to compare different doses of two neoglucogenic solutions, on starved (S) and foraging (F) ewes on the glycaemia 6 h later the solution administration.

MATERIAL AND METHODS

Thirty adult, Corriedale ewes, with Body Score (BS) 3.7 ± 0.9 and weight (W) 49.7 ± 3.9 kg were used. All animals were foraging, in a pen. Half of them, assign according the BS and W, were located inside and starved during 12 h (-12h) (*S-group*). The rest of the animals were kept in the pen (*F-group*). Each group was divided in three sub-groups, and they received water (W), or a commercial (CS) or a prepared solution (PS: 70% of glycerol, 20% propilen-glycol and 10% of distilled water), orally. The solutions were given every 6 h, beginning 12 h after starve (0h). Doses administrated were 75, 100, 125 and 150 mL. Glycaemia was measured in all animals since -12 h, and every

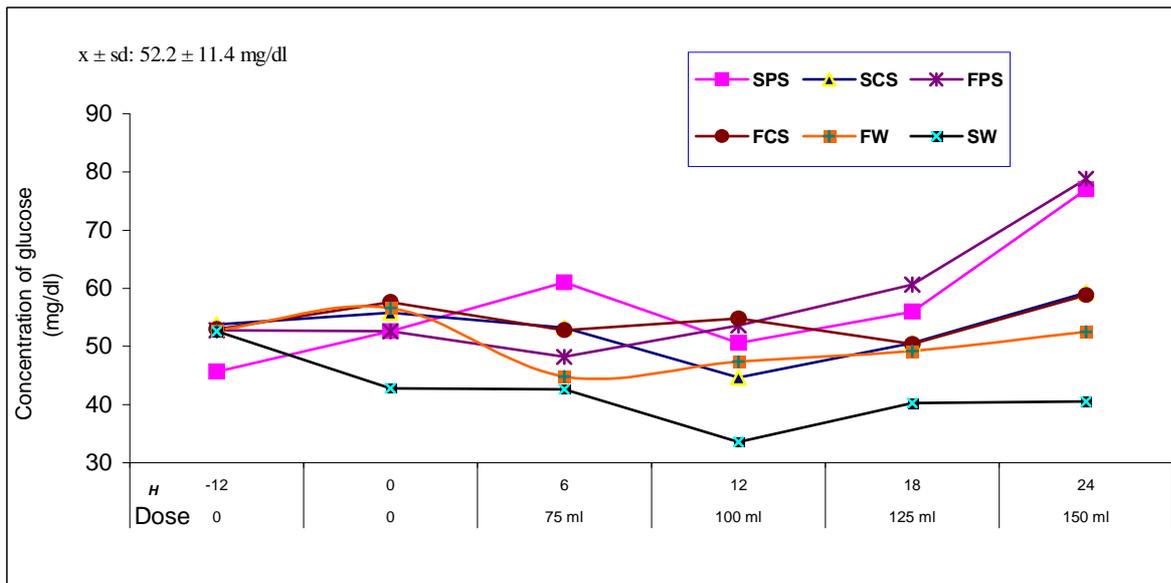
6 h. Glycaemia was measured using a commercial kit, previously validated for blood sheep (López-Mazz *et al.*, 2002, data unpublished). A lineal model including S/F, Solutions and doses effect, and the corresponding interactions was used (PROC MIXED-SAS).

RESULTS AND DISCUSION

Physiological status (S or F) had no effect on glycaemia, but an interaction between them was found ($P = 0.0235$). The kind of solution and doses used affected the glycaemia ($P < 0.002$) and an interaction solution*dose was found ($P = 0.0001$) (results in Graphic)

CONCLUSION

Glycaemia was higher after PS in S and F ewes. 100ml of CS did not prevent de decrease of glycaemia after 18 h of fasting. 125ml of PS increased glycaemia but no effect was observed with CS. Glycaemia was higher after 150 mL of PS than the same dose of CS.



Acknowledgements: Lab Santa Elena (Uruguay)

ANEXO II

Effect of administration of a gluconeogenic solution on ovulation rate and glycemia in cyclic Corriedale sheep

Carlos López-Mazz^{1}, Raquel Pérez-Clariget¹, Álvaro López¹, Mariel Regueiro¹, Juan Burgueño², Ricardo Rodríguez-Iglesias³.*

¹Dept. Producción Animal y Pasturas, ²Dept. Estadística y Cómputo, Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay; ³Dept. Agronomía, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.

[*crlopez@adinet.com.uy](mailto:crlopez@adinet.com.uy)

Solutions containing substances which stimulates gluconeogenesis increases ovulation rate in anoestrus Corriedale ewes induced to ovulate with low doses of progestagen (Rodríguez-Iglesias *et al.*, 1996). The aim of this work was to evaluate the effect on ovulation rate and blood concentration of glucose of a similar solution administrated to cyclic Corriedale ewes. Cyclic Corriedale ewes (n = 178) aged 1,5 - 5 years, weighting 40,7 ± 4,4 kg, and with a body score of 3,1 ± 0,3 (scale 1-5) were used. Distilled water was administrated to half of the ewes. The others received a solution based on glycerol and propylen-glycol (Acetolena®, Santa Elena, Uruguay) beginning immediately after the intra vaginal sponges (10 mg of medroxyprogesterone acetate), used for oestrus synchronization, were withdrawn. Both groups received increasing volumes: 75, 100, 125 and 150 mL of water or Acetolena®, with an interval of 6 hours. Glycemia was determined using commercial reactive strips (SureStep, Johnson&Johnson). Blood samples were taken from the ear, at time 0 h (no treatment) and every 6 h until 24 h. Number of Corpora Lutea (CL) were measured by laparoscopy, 8 days after oestrus were observed. Non-parametric variables were analyzed with a logit model taking into account the effects of age, treatment and the interaction between them (PROC GENMOD; SAS). Data of glycemia were analyzed using 0 h glycemia as a covariable (PROC MIXED; SAS). Age and treatment did not affect the number of CL (P > 0.1). One CL was observed in 87% of the ewes, and 13% showed two. Glycemia declined with age (P=0.0398) with 1,5 years ewes having the highest values (59,3 ± 2,7 mgr/100 mL). An interaction between treatment and doses was found (P<0.0001).

Table. Glycemia (x ± sd; mg/ml) in Corriedale ewes after increasing doses of distilled water or Acetolena®.

TREATMENT	DOSES (ml)				
	0	75	100	125	150
Water	46.1 ± 6.4 ^a	52.6 ± 0.7 ^a	56.4 ± 1.4 ^a	52.6 ± 3.5 ^a	53.0 ± 3.5 ^a
Acetolena	44.2 ± 6.4 ^a	55.9 ± 1.4 ^a	55.0 ± 2.1 ^a	60.3 ± 4.9 ^b	62.7 ± 2.1 ^b

Different letters P < 0.05

Ref: Rodriguez-Iglesias RM, Ciccioi NH, Irazoqui H, Giglioli C, 1996. Ovulation rate in ewes after single oral glucogenic dosage during a ram-induced follicular phase. *Animal Reprod. Sci.* 4:211-221

ANEXO III

La administración de una solución neoglucogénica incrementa el reclutamiento folicular en ovejas en anestro

The administration of a neoglucegenic soluion increases follicular recruitment in anoestrous ewes

López-Mazz, C^a; Regueiro, M^a; Carriquiry, M^a; Crooker, B^b; Pérez-Clariget, R^a

^aDepartamento de Producción Animal y Pasturas, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Uruguay. e-mail: tatolopezmazz@gmail.com

^bDepartment Animal Sciences, Universidad de Minnesota, USA

INTRODUCCIÓN

Es conocida la estrecha relación existente entre la nutrición y la reproducción. Elevados niveles de alimentación (energía y proteína) en relación al momento del servicio de las ovejas produce un efecto positivo en la fertilidad y prolificidad (aumento de la tasa ovulatoria).⁴ Evidencias experimentales indican que la glucosa estaría involucrada en el efecto del flushing sobre la foliculogénesis en las ovejas^{6,8}. Es más, se ha observado que un incremento de la glicemia aumenta la tasa ovulatoria en ovejas inducidas a ovular⁷. En el presente trabajo probamos la hipótesis que el incremento de la glicemia durante 24 h al momento de la introducción de los carneros influencia el desarrollo folicular y la tasa ovulatoria en ovejas Corriedale en anestro estacional inducidas a ovular usando el efecto macho.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los procedimientos experimentales se ajustaron a las normas establecidas en la ordenanza sobre uso de animales en experimentación de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal de la Universidad de la República. El trabajo se realizó en la Estación Experimental "Bernardo Rosengurt" de la Facultad de Agronomía, (Cerro Largo), Uruguay (32° 25' LS y 54° 15' L W) durante la primavera tardía (20 de noviembre - 15 de diciembre; 13h 58' - 14 h 17' horas luz, respectivamente), época de anestro estacional^{1,2}. Se utilizaron 62 ovejas Corriedale de 1,5 a 3,5 años, en anestro, confirmado por ausencia de cuerpo lúteo al examen ultrasonográfico y por niveles inferiores a 0,5 ng/ml de progesterona en tres muestras consecutivas separadas por un intervalo de 4 d, con peso vivo (PV) de $47,7 \pm 3,9$ kg ($x \pm sem$) y una condición corporal (CC; en una escala de 1 - 5)³ de $2,9 \pm 0,3$. Todas las ovejas habían parido un solo cordero en la última estación de partos, el que fue destetado 30 d antes del comienzo del trabajo. Estas ovejas fueron seleccionadas de un rebaño Corriedale (400 ovejas) con una historia de partos múltiples (análisis de 5 años de registros) no superior al 6% anual (López-Mazz, datos no publicados). Las ovejas pastoreaban en potreros con pasturas naturales, con una proporción de verde-seco en el forraje disponible de 70-30% y registros pluviométricos de 32 y 65 mm para los meses de noviembre y diciembre respectivamente (Panissa, G., datos no publicados). Durante el mes previo al experimento, las ovejas se mantuvieron separadas de los machos (distancia mayor a 2 km), de manera que no se podían ver, oír ni oler. A todas las ovejas se les colocó una esponjas intravaginal (EIV) conteniendo 10 mg de Medroxiprogesterona (MAP) durante 6 d y al momento de su retiro se introdujeron 12% machos

adultos y 20% de ovejas en celo. A partir de ese momento y durante 120 h se detectó el celo cada 12 h. Las ovejas fueron asignadas al azar considerando la edad, el PV y la CC a dos grupos experimentales: Grupo Tratamiento (GT; n = 28) el cual recibió oralmente, cada 6 h, 125 mL de una solución neoglucogénica (glicerol 70%, propilenglicol 20% y agua destilada 10%) durante 24 h, comenzando inmediatamente después del retiro de las EIV (total de dosis: 4, volumen: 500 mL) y Grupo Control (GC n=34) el cual recibió agua destilada en dosis y frecuencia similares a las del GT. Se tomaron muestras de sangre por venopunción yugular en tubos heparinizados a 20 ovejas por grupo (8 mL) 12 h previas al inicio del tratamiento (día 0), previamente a cada dosificación y diariamente hasta el día previo a la laparoscopia (7 d). Las muestras fueron centrifugadas y el plasma almacenado a -20°C hasta su procesamiento. La concentración de glucosa se determinó en las muestras tomadas 12 h antes hasta 48 h después del inicio de los tratamientos utilizando un kit comercial (Wiener lab, Rosario, Argentina) y un multianalizador automático marca Vitalab modelo Selcitra 2. La concentración de IGF-I se determinó en todas las muestras menos en las tomadas a las 6 y 18 h de iniciados los tratamientos, utilizando radioinmunoanálisis (Weber et al, 2007) previamente validado para plasma ovino. Se examinaron diariamente ambos ovarios de 13 ovejas (GC = 7 y GT = 6) por ultrasonografía transrectal, utilizando un equipo ALOKA SSD 500 con un transductor de 7.5 MHz prostático de uso humano, comenzando el día de inicio de los tratamientos y hasta el día 7. Se contaron y midieron todos los folículos iguales o mayores a 2 mm de diámetro y el diámetro máximo del folículo preovulatorio antes de su colapso. Se registró en todas las ovejas el número de cuerpos lúteos (CL) en ambos ovarios a los 8 d después del inicio del tratamiento, previo ayuno de 12 h, por endoscopia laparoscópica utilizando un equipo marca Storz de ángulo de visión de 30°, de 7 mm de diámetro, conectado a una fuente de luz Storz (Cold Light Fountain 482). Las ovejas fueron colocadas en camillas para laparoscopia en posición de Trendelenburg. Las ovejas fueron pesadas y la CC estimada por dos técnicos entrenados al iniciar y finalizar el trabajo (23 d después).

Los datos de PV, CC, glicemia e IGF-I y número de folículos fueron analizados usando un análisis de medidas repetidas en el tiempo mediante PROC MIXED de SAS (2001). El modelo incluía tratamiento, hora o día y su interacción como efectos fijos y animal como efecto aleatorio. Adicionalmente, para las variables glicemia e IGF-I, se utilizó el valor de la muestra pre-tratamiento como covariable. Los datos del intervalo retiro de las EIV- presentación de celos y diámetro máximo del folículo pre-ovulatorio se analizaron con un modelo que incluía tratamiento como efecto fijo y animal como efecto aleatorio usando PROC MIXED (SAS, 2001). El número de CL se analizó utilizando el PROC GENMOD (SAS, 2001). Los datos se presentan como $x \pm eem$.

RESULTADOS Y DISCUSION

El tratamiento no afectó ($P = 0.37$) el intervalo retiro de las EIV-presentación del celo ($52,9 \pm 4,1$ vs $47,1 \pm 4,5$ h para GT y GC, respectivamente). Durante el periodo experimental los animales perdieron ($P < 0.001$) casi 4% de su PV y 0.25 unidades de CC. El déficit de lluvias registrado en el mes de

noviembre y diciembre (registro histórico para esos meses: 103 mm y 83 mm, respectivamente) probablemente explique estas pérdidas debido al impacto negativo que tuvo en la disponibilidad y calidad del forraje ofrecida a los animales. De manera similar a lo observado en experimentos previos⁵, la administración de la solución neoglucogénica aumentó ($P < 0.01$) la glicemia en el GT a partir de las 6 h de la primera dosis, diferencia ($P < 0.01$), que se mantuvo hasta 6 h después de la última dosificación, luego de la cual, la glicemia del GT regresó a los valores pre-tratamiento, no diferenciándose ($P > 0.05$) de los niveles del GC (Figura 1). La solución neoglucogénica incrementó ($P < 0.05$) el diámetro máximo del folículo preovulatorio ($4,1 \pm 0,2$ mm vs. $3,4 \pm 0,3$ mm para GT y GC, respectivamente). Se observó una interacción ($P = 0,024$) entre tratamiento y día cuando se comparó el número de folículos de 2 mm ya que el número de folículos fue similar en los dos grupos de ovejas el día anterior a la dosificación de la solución neoglucogénica pero aumento el día posterior solamente en el GT. Sin embargo esta diferencia no se mantuvo en los días posteriores (Figura 2). No se observó efecto del tratamiento ($P = 0,16$) ni del día ($P = 0,77$) sobre el número de folículos de 3 mm de diámetro. Sin embargo existió una tendencia ($P = 0,095$) a la interacción entre tratamiento y día, con el número de folículos incrementándose en el GT y disminuyendo en el GC en los tres días posteriores a la aplicación del tratamiento (Figura 2). El número de CL fue similar ($P = 0,26$) en ambos grupos (1,12 vs 1,29 para GT y GC, respectivamente). Se observaron 74% de ovulaciones simples, 23% de ovulaciones dobles y 3% (1 oveja) de ovulaciones triples en el GC mientras que en el GT, 89% de las ovejas presentaron ovulación simple y 11% doble. Es posible que el incremento de glucosa por 24 h al momento del retiro de las esponjas e introducción de los machos (fase folicular) fuera suficiente para incrementar el reclutamiento folicular pero insuficiente para estimular el desarrollo de los folículos hasta la etapa pre-ovulatoria. El incremento de glicemia disminuyó ($P = 0,067$) los niveles de IGF-I en plasma ya que el GT (158.5 ± 4.9 ng/mL) tuvo menores concentraciones que el GC ($172,2 \pm 4,3$ ng/ml) durante las 24 h en que el primero presentó glicemias más elevadas. Sin embargo, las medias de los tratamientos para todo el experimento fueron similares ($163,6 \pm 7,0$ vs GC: $173., \pm 6,5$ ng/ml para GT y GC, respectivamente, $P = 0,35$) y no se encontró una interacción ($P > 0,1$) entre tratamiento y hora en ninguno de los dos periodos de tiempo analizados (0 a 48 h y 0 a 168 h; Figura 3). El inesperado hallazgo del efecto negativo del incremento de glicemia sobre la concentración de IGF- I podría estar asociado, más que a un efecto inhibitorio sobre su síntesis, a una mayor utilización de esta hormona o a una mayor tasa de recambio que determinarían una menor cantidad de moléculas presentes en sangre. Teniendo en cuenta la información generada concluimos que un incremento de la glicemia durante 24 h después del retiro de EIV e introducción de los machos produce un incremento del diámetro del folículo pre-ovulatorio y del reclutamiento folicular pero no de la tasa ovulatoria

L@s autores agradecen a las Dras. Georgget Banchemo y Graciela Quintans (INIA) por el equipo de ultrasonografía, al Dr. Gonzalo Uriarte (DILAVE) por el análisis de glicemia, al Dr. Pablo Mariño por la laparoscopia y a las Ing.

Agr. Ana Astessiano, Andrea Regalado y Ona Syrvis por su ayuda durante el trabajo de campo.

BIBLIOGRAFIA

1. Abella Fernández, D; Saldaña, S; Surraco, L; Villegas, N; y Rodríguez Palma, R. 1996. Evaluación de la variación estacional de la actividad sexual y crecimiento de lana en cuatro razas ovinas. Primer Congreso Uruguayo de Producción Animal.
2. Estudios sobre estacionalidad reproductiva en ovinos Corriedale, 1992. FPTA/017. Facultad de Veterinaria, INIA
3. Bianchi, G. 1994. Alternativas tecnológicas para mejorar la producción ovina: Manejo del estado corporal. *Cangüe*, 1:29-31.
4. Lindsay, D.R.; Martin, G.B. & Williams, H. 1991. Nutrition and reproduction. In *Reproduction in Domesticated Animals*; World Animal Science, Series, pp 459-491
5. López-Mazz et al., 2004. Effect of administration of a gluconeogenic solution on ovulation rate and glycemia. *Reproduction, Fertility and Development*. 16(4): 522:45
6. Muñoz Gutierrez et al., 2002. Folliculogenesis and ovarian expression of mRNA encoding aromatase in anoestrous sheep after 5 days of glucose or glucosamine infusion or supplementary lupin feeding. *Reproduction* 124:721-731.
7. Rodríguez Iglesias, R .M.; N.H. Ciccio, H. Irazoqui, C. Giglioli. 1996. Ovulation rate in ewes after single oral glucogenic dosage during a ram-induced follicular phase. *Animal Reproduction Science* 44: 211-221.
8. Viñoles et al., 2005. Short-term nutritional supplementation of ewes in low body condition affects follicle development due to an increase in glucose and metabolic hormones. *Reproduction and Fertility* 129:299-309.

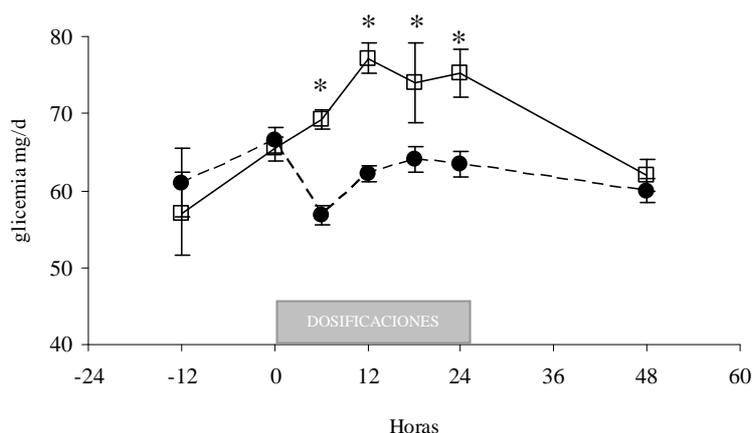


Figura 1. Glicemia en ovejas a las que se les administró una solución neoglucogénica (GT; □, n = 28) y agua destilada (GC; ●, n = 34) en relación al momento de las dosificaciones. La barra indica el periodo de administración de tratamientos. Los * indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.01$).

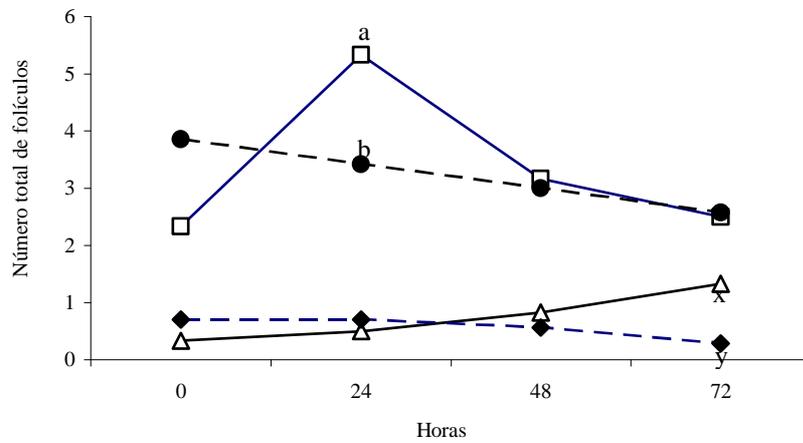


Figura 2. Número total de folículos de 2 mm en GT (□, n = 6) y GC (●, n = 7) y de 3 mm en el GT (△, n = 6) y GC (◆, n = 7) en relación al día (0) de las dosificaciones. Literales a y b indica diferencia estadísticamente significativa ($P = 0.024$); x e y una tendencia ($P = 0.095$).

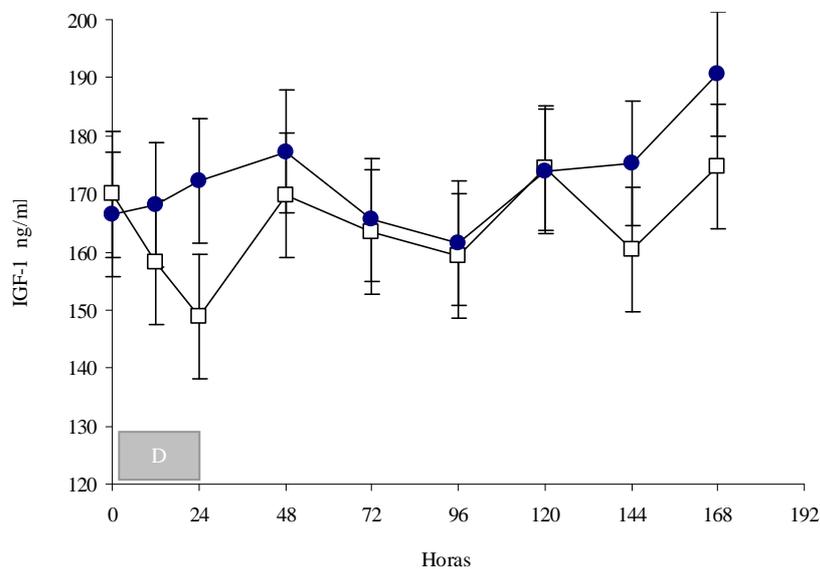


Figura 3. Concentración de IGF-1 en ovejas a las que se les administró una solución neoglucogénica (GT; □, n= 6) y agua destilada (GC; ●, n = 7) en relación al momento de las dosificaciones (D).