



**Universidad Nacional de Córdoba**  
**Facultad de Ciencias Agropecuarias**  
**Escuela para Graduados**

---



**CARACTERÍSTICAS REPRODUCTIVAS DE  
OVEJAS DE RAZA SANTA INÊS EN EL  
NORDESTE ARGENTINO**

**Romina Magali Arbues**

Tesis

Para optar al Grado Académico de  
Doctor en Ciencias Agropecuarias

**Córdoba, 2019**

# **CARACTERÍSTICAS REPRODUCTIVAS DE OVEJAS DE RAZA SANTA INÊS EN EL NORDESTE ARGENTINO**

**Romina Magali Arbues**

**Comisión Asesora de Tesis**

**Directora:** Dra. Carolina I. Flores Quintana

**Asesores:** Dr. Enrique A. Yáñez,

Dr. Humberto Tríbulo

**Tribunal Examinador de Tesis:**

Doctora María Laura Bernáldez

Doctora Paula Tríbulo

Doctor Enrique Yáñez

**Presentación Formal Académica**

11 de Diciembre de 2019

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

**Universidad Nacional de Córdoba**



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons  
Atribución – No Comercial – Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.

## **Agradecimientos**

A la Doctora Carolina Flores Quintana, mi directora, por creer en mí, por haberme enseñado tanto, por haberme motivado, inspirado y apoyado siempre. Gran parte de lo que soy como profesional y como persona, se lo debo a ella.

Al Doctor Enrique Yáñez, por su confianza, por todos los conocimientos transmitidos. Por ser tan visionario, abierto a que todo se puede hacer, todo se puede cambiar y todo se puede mejorar. Porque su fuerza característica siempre fue de mucha motivación. Por sus lecciones, a veces un poco duras, pero imposible no entenderlas, imposible olvidarlas!

Al Doctor Humberto Tribulo, miembro del Comité Asesor, por su orientación y valiosos aportes en la discusión de resultados y en el desarrollo de los Seminarios de avance.

A la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNNE. Y a través de ella, a cada uno de los docentes que participaron en mi formación de grado y posgrado. Por ser mi cálido lugar de trabajo y mi segundo hogar.

A la Secretaría General de Ciencia y Técnica de la UNNE y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), por el apoyo financiero a través del otorgamiento de becas doctorales.

A Doña Mabel de Yáñez, propietaria del establecimiento Don Donato. Por su valioso apoyo y colaboración en el desarrollo de los trabajos.

A GESGAN, por haber puesto a disposición los animales y los insumos necesarios para el desarrollo de los trabajos de campo.

Al Ingeniero Agrónomo, Magíster Juan Alfredo Fernández, por sus valiosos aportes que favorecieron a mi formación y a enriquecer los resultados y la discusión de esta tesis. Y también por su importante colaboración en el desarrollo de los trabajos de campo. Y por los lindos momentos compartidos.

A mi gran amiga, colega y hermana, Gabriela Abson, mi compañera! Por su gran ayuda en la etapa más difícil de la carrera doctoral. Y por los inolvidables momentos compartidos!

A mí querida amiga y colega, Valeria Martínez. Por su valiosa colaboración, aportes y compañía en los ensayos de campo. Y por los hermosos momentos compartidos.

A mi compañero y colega, Martín Kornuta, por su gran colaboración en el desarrollo de los trabajos de campo y sus aportes, siempre muy valiosos que enriquecieron la interpretación y discusión de los resultados. Y por los lindos momentos compartidos.

A los Médicos Veterinarios, José Casuso y Cristian Sager, por su gran colaboración en el periodo experimental en el establecimiento Don Donato y por los lindos momentos compartidos.

Al personal del establecimiento Don Donato, por su valiosa colaboración en el trabajo con los animales.

Al Servicio Meteorológico Nacional por poner a disposición los datos de temperaturas, precipitaciones y humedad.

Al Centro de Aplicaciones Bionucleares, CABIN y al Laboratorio de Reproducción Animal de la Universidad Nacional de La Plata. Por su colaboración en la realización de los análisis Quimiluminiscencia y RIA.

Al Doctor Juan Argüello, Facultad de Ciencias Agrarias, UNC, por esa maravillosa forma de transmitir sus conocimiento en el curso de Metodología de la Investigación, motivando e inspirando a sus alumnos en el estudio de la investigación científica. Con seguridad, que no fui la misma luego de tomar dicho curso de posgrado.

A mis padres, **Mónica y Julio**

Por que hicieron lo más importante, brindarme un hogar lleno de amor y contención, nunca me faltaron, hicieron de mí una mujer segura. Motivaron mi formación cada día de mi vida, confiaron en mí, me acompañaron, me apoyaron de todas las formas en que se puede apoyar a un hijo, me abrazaron, me guiaron...a ellos, quienes fueron, son y serán los pilares de mi vida.

A mi amado esposo, **Gustavo**

Por su amor incondicional y apoyo constante, su paciencia y mansedumbre al esperarme días y noches durante mis viajes al campo, conteniendo a nuestros hijos. Por haber formado conmigo el equipo perfecto, por ser ese **roble** a mi lado, sin el cual nada hubiera sido posible.

A mis hijos, **Aldana y Nazareno**

Mi princesa, que sin entenderlo mucho, hizo tanto! Estuvo a mi lado en los corrales, en la manga, días y noches en el campo. Otras veces tuvo que esperarme, paciente, en casa. Mi príncipe Nazareno, llego en la recta final, pero también me acompañó y me esperó. Ambos, mis motores, mi mayor responsabilidad y compromiso, esas dos personitas que están mirando cada uno de mis pasos, y a quienes más anhelo dejar este legado...

"Recibid mi enseñanza, y no plata, dice Jehová;

Y ciencia antes que el oro escogido.

Porque mejor es la sabiduría que las piedras preciosas; y todo cuanto se puede desear, no es de compararse con ella"

Proverbios 8:10 y 11

A mi amado **Jesucristo**, porque dio su vida por mí, estuvo desde el principio y lo hará hasta el final y porque sencillamente, fuera de Él nada podemos hacer.

## RESUMEN

La producción ovina nacional está concentrada en tres grandes zonas: Patagonia, Pampa Húmeda y Mesopotamia. En el resto del país, que comprende las provincias del norte, noroeste y centro oeste, la explotación ovina es más bien complementaria a la caprina con predominio de razas productoras de carne como criollas y caras negras que producen lana de baja calidad por lo que la esquila no se justifica. La lana representa una complicación debido a las características del medio ambiente donde abunda el monte bajo y sucio, existe mayor prevalencia de miasis y es necesario realizar el desoje dos o tres veces al año. Los ovinos de razas tropicales deslanadas se introducen al país hace aproximadamente 10 años, sobre todo en la provincia de Chaco, norte de Corrientes, norte de Santa Fe, Misiones y algunas provincias del noroeste argentino. Las ovejas de éstas razas tienen la ventaja reproductiva de presentar un anestro poco definido, de menor duración o ausente. Esta característica reproductiva sumada a la ausencia de lana hace interesante su introducción a la región subtropical argentina. El objetivo de la presente tesis fue evaluar características reproductivas relacionadas con poliestrismo anual, respuesta a protocolos de sincronización y caracterización del perfil citológico vaginal de ovejas de raza Santa Inês en el nordeste argentino, comparándolas con la raza Ideal. Los porcentajes de ovejas ciclando fueron 70, 70 y 60 %, en la raza Santa Inês y 80, 10 y 20 % en la raza Ideal, durante otoño, invierno y primavera, respectivamente. La presentación de ciclos estrales fue diferente entre razas. El análisis estadístico de  $\text{Chi}^2$  tuvo un p valor  $<0,0001$ , indicando la asociación significativa entre las variables raza y estado reproductivo. Los protocolos de sincronización con esponja intravaginal durante 5 días, más 200 o 300 UI de eCG consiguieron porcentajes de celo superiores al 67 %. Con la utilización de 300 UI de eCG el intervalo al celo se acortó significativamente. Los porcentajes de preñez fueron altos y no hubo diferencia significativa entre dosis. Las preñeces dobles no superaron el 18%. En la citología vaginal se reconocieron células parabasales, intermedias profundas y superficiales y superficiales. Las modificaciones en las frecuencias de cada tipo celular no permitieron determinar la fase del ciclo estral.

**Palabras clave:** ciclicidad estral, anestro, sincronización de celos, citología vaginal, subtropical.

## **ABSTRACT**

National sheep production is concentrated in three main areas: Patagonia, Pampa Húmeda and Mesopotamia. In the rest of the country, which includes the northern, northwestern and central western provinces, sheep exploitation is rather complementary to the goat with a predominance of meat-producing breeds such as Creoles and black faces that produce low quality wool, so Shearing is not justified. Wool represents a complication due to the characteristics of the environment where the low and dirty mountain abounds, there is a higher prevalence of myiasis and it is necessary to perform the desolation two or three times a year. Sheep of deslanadas tropical races are introduced to the country about 10 years ago, especially in the province of Chaco, north of Corrientes, north of Santa Fe, Misiones and some provinces of northwestern Argentina. The sheep of these breeds have the reproductive advantage of presenting a poorly defined, short-lived or absent anestrus. This reproductive characteristic added to the absence of wool makes its introduction to the Argentine subtropical region interesting. The objective of this thesis was to evaluate reproductive characteristics related to annual polyestrism, response to synchronization protocols and characterization of the vaginal cytological profile of sheep of the Santa Inês breed in northeastern Argentina, comparing them with the Ideal breed. The percentages of cycling sheep were 70, 70 and 60%, in the Santa Inês breed and 80, 10 and 20% in the Ideal breed, during autumn, winter and spring, respectively. The presentation of estrous cycles was different between races. The statistical analysis of Chi<sup>2</sup> had a p value <0.0001, indicating the significant association between the variables race and reproductive status. Intravaginal sponge synchronization protocols for 5 days, plus 200 or 300 IU of eCG achieved heat percentages greater than 67%. With the use of 300 IU of eCG the interval to heat was significantly shortened. Pregnancy rates were high and there was no significant difference between doses. Double pregnancies did not exceed 18%. In vaginal cytology, parabasal, deep intermediate and superficial and superficial cells were recognized. The modifications in the frequencies of each cell type did not allow to determine the phase of the estrous cycle

**Keywords:** estrous cyclicity, anestrus, heat synchronization, vaginal cytology, subtropic.

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>CAPITULO 1.</b>	1
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	6
Características fisiológicas de la reproducción estacional	6
Ritmos Biológicos	7
Fotoperíodo	7
El Hipotálamo, sitio donde se encuentra el reloj biológico	9
Neuronas productoras del péptido liberador de gonadotrofinas (Neuronas GnRH)	11
Neuronas productoras del péptido inhibidor de GnRH (neuronas GnIH)	12
Neuronas productoras del péptido Kisspeptina	12
Glándula Pineal y Melatonina	12
Incremento en la respuesta del hipotálamo al feedback negativo del estradiol, durante el anestro	15
Participación de Neuronas Dopaminérgicas, Ácido Gamma aminobutírico y Glutamato	16
Participación del neuropéptido Kisspeptina	17
Melatonina y Eje Hipotalámico-hipófisis-gonadal	19
Influencia de las hormonas tiroestimulante, tetrayodotironina y triyodotironina en la reproducción	20
Participación de TSH y hormonas tiroideas en el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal	20
Rol de la Pars Tuberalis de la hipófisis anterior	22
Tanicitos, células gliales con un rol clave en la regulación de la reproducción	23
Kisspeptina, un neuropéptido clave en el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal	25
Péptidos relacionados con RF amidas (RFRP)	30
Fotorrefractoriedad	31
Estacionalidad en la reproducción y época de partos	32
Nutrición y Estacionalidad Reproductiva	35
Importancia de la Progesterona en el seguimiento de la actividad reproductiva	38
Anestro Posparto	40
Eventos neuroendócrinos que ocurren en el anestro posparto de la oveja	41
Niveles hormonales durante la gestación y el inicio del puerperio	42
Participación de los péptidos endógenos y la prolactina en el período posparto	43
Otros Factores que intervienen en el reinicio de la actividad reproductiva posparto	47
Involución Uterina	47
Raza y estacionalidad	48
Nutrición y anestro posparto	49



Los integradores hipotalámicos del metabolismo y la reproducción:	51
Leptina, Insulina y NPY	
Neuronas de “primer orden”	51
La leptina	51
El neuropéptido Y (NPY)	52
La insulina	53
Efecto de la presencia del carnero en la reanudación de la actividad ovárica	55
Citología Vaginal	56
Estructura histológica y receptores hormonales de la vagina	56
Implicancias del estudio de la citología vaginal	57
Células del epitelio vaginal	59
Toma de muestra, fijación y coloración	60
Sincronización de Celos	61
Fármacos hormonales más empleados en pequeños rumiantes	62
Progesterona y progestágenos	62
Gonadotrofina Coriónica equina	64
Prostaglandinas	65
Foliculogénesis y ondas de desarrollo	66
Progesterona y su relación con el desarrollo folicular	68
Efectos de la progesterona y progestágenos sobre el desarrollo folicular	68
Manejo hormonal del ciclo estral ovino	69
<b>HIPÓTESIS</b>	75
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	75
<b>Objetivos Particulares</b>	75
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	76
<b>CAPÍTULO 2</b> Determinación de la ciclicidad estral durante el año ovejas	95
Santa Inês e Ideal en el subtrópico argentino	
<b>INTRODUCCIÓN</b>	95
<b>OBJETIVO</b>	96
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	96
Lugar de Trabajo	96
Animales y Manejo de la majada	96
Diseño experimental y análisis estadístico	97
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	99
<b>CONCLUSIÓN</b>	107
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	108
<b>CAPÍTULO 3</b> Evaluación del uso de diferentes días de permanencia de esponja intravaginal y diferentes dosis de eCG en el protocolo de Sincronización de celo en Ovejas Santa Inês e Ideal	111
<b>INTRODUCCIÓN</b>	111
<b>OBJETIVOS</b>	117
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	117
Lugar de Trabajo	117
Animales	117
Primer ensayo	118
Diseño experimental y análisis estadístico	119

Segundo ensayo	119
Observación del servicio para detección de ovejas en celo	120
Diseño Experimental y Análisis Estadístico	121
<b>RESULTADOS</b>	122
<b>DISCUSIÓN</b>	126
<b>CONCLUSIÓN</b>	129
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	130
<b>CAPÍTULO 4.</b> Caracterización del perfil citológico de la mucosa vaginal durante el ciclo estral en ovejas Santa Inés.	134
<b>INTRODUCCIÓN</b>	134
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	137
Lugar de trabajo	137
Animales y Manejo de la majada	137
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	139
<b>CONCLUSIONES</b>	146
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	147
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b>	149
<b>CONSIDERACIONES A FUTURO</b>	150
<b>ANEXO 1</b> Cálculos Estadísticos	151

## Lista de Tablas

**Tabla 2.1.** Resultados estadísticos de  $\text{CHI}^2$ , Intervalo de coeficiente de chance, corrección por efecto del estrato y  $\text{CHI}^2$  para cada estación estudiada en ovejas Santa Inês e Ideal en el subtrópico argentino.

**Tabla 2.2.** Porcentajes de ciclicidad y peso vivo (PV) promedio en ovejas Santa Inês (SI) e Ideal (ID) en el subtrópico argentino.

**Tabla 2.3.** Promedios mensuales temperaturas mínimas (TM), precipitaciones (P) y humedad relativa (HR) en Monte Caseros, Corrientes, año 2012.

**Tabla 3.1.** Resultados estadísticos de  $\text{CHI}^2$  y corrección por efecto del estrato, para la variable preñez, en ovejas Santa Inês e Ideal, con diferentes días de permanencia de la esponja intravaginal en el protocolo de sincronización, en el subtrópico argentino.

**Tabla 3.2.** Porcentaje de ovejas en celo y prueba de  $\text{Chi}^2$  en tratamientos de sincronización con 200 y 300 UI de eCG en ovejas Santa Inês en el subtrópico argentino.

**Tabla 3.3.** Promedio y DS del intervalo al celo (h) en tratamientos de sincronización con 200 y 300 UI de eCG en ovejas Santa Inês en el subtrópico argentino.

**Tabla 3.4.** Frecuencias de ovejas con uno y dos cuerpos lúteos (CL) y solo con folículos.

**Tabla 3.5.** Porcentajes de gestación total, simple, doble y hembras vacías con dos dosis diferentes de gonadotrofina coriónica equina (eCG), en ovejas Santa Inês en el subtrópico argentino.

**Tabla 4.1.** Diámetro promedio y desvío estándar (DE) en  $\mu\text{m}$  de los diferentes tipos de células epiteliales de la vagina de borregas Santa Inês.

**Tabla 4.2.** Frecuencias promedio y desvío estándar (DS) de los diferentes tipos celulares del epitelio vaginal a lo largo del ciclo estral de borrega Santa Inês.

## **Lista de Figuras**

**Figura 1.1.** Circuito de estímulos que desencadenan el inicio o cese de la actividad reproductiva en hembras poliestricas estacionales.

**Figura 1.2.** Vía de señalización del estradiol (E2) por la que incrementa el Feedback negativo a las neuronas GnRH. ARQ: área retroquiasmática; APO: área preóptica; NARC: núcleo arcuato; HMB: hipotálamo mediobasal; Re $\alpha$ : receptor  $\alpha$  de estradiol; RD2: receptor 2 de dopamina

**Figura 1.3.** Posible efecto de la enzima DIO2 y hormona triyodotironina (T3) en el eje hipotalámico-hipófisis-gonadal en especies estacionales. DL: día largo.

**Figura 1.4.** Posible señalización del neuropéptido kisspeptina en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal. Re, Rp y Rt: receptores de estrógeno, progesterona y testosterona; E, P y T: estrógeno, progesterona, testosterona.

**Figura 2.1.** Porcentajes de ovejas Santa Inês e Ideal cíclicas durante el otoño, invierno y primavera en el subtrópico argentino.

**Figura 2.2.** Modificaciones del PV promedio de hembras Santa Inês e Ideal durante otoño, invierno y primavera en el subtrópico argentino.

**Figura 3.1.** Porcentajes de preñez en ovejas Santa Inês e Ideal, sincronizadas con 5 o 7 días de permanencia de esponja intravaginal en el subtrópico argentino.

**Figura 3.2.** Frecuencias de ovejas Santa Inês en celo agrupadas en intervalos de 12 horas desde la finalización del tratamiento de sincronización.

**Figura 4.1.** Frecuencias promedio de cada tipo celular del epitelio de la vagina a lo largo del ciclo estral en borregas Santa Inês.

**Figura 4.2.** Citología vaginal de borregas Santa Inês

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ADN. Ácido desoxirribonucleico.
- AMP. Acetato de medroxiprogesterona.
- ANOVA. Análisis de la varianza.
- APO. Área preóptica.
- ARN. Ácido Ribonucleico.
- ARN m. ARN mensajero.
- ARQ. Área retroquiasmática.
- CC. Condición Corporal.
- CIDR. Dispositivo de liberación interna controlada.
- CL. Cuerpo lúteo.
- CLIA. Inmunoensayo de quimioluminiscencia.
- CRH. Péptido liberador de corticotrofina.
- DICO. Dispositivo Intravaginal Caprino y Ovino. Syntex.
- Dio2. Deiodinasa 2.
- Dio 3. Deiodinasa 3.
- D2R. Receptor de Dopamina.
- eCG. Gonadotrofina coriónica equina.
- ELIZA. Ensayo de inmunoabsorción ligado a una enzima.
- Er $\alpha$ . Receptor  $\alpha$  de estradiol.
- Er $\beta$ . Receptor  $\beta$  de estradiol.
- Eya3. Eyes absent 3.
- E2. Estradiol 17 beta.
- FGA. Acetato de fluorogestona.
- FPI. Inmunoensayo de polarización fluorescente.
- FSH. Hormona folículo estimulante

GABA. Ácido gamma aminobutírico.

GDP. Ganancia diaria de peso.

GH. Hormona del Crecimiento.

GnIH. Péptido inhibidor de la hormona liberadora de gonadotrofinas.

GnRH. Hormona liberadora de gonadotrofinas.

HMB. Hipotálamo mediobasal.

HR. Humedad relativa.

IA. Inseminación Artificial.

IATF. Inseminación artificial a tiempo fijo.

IGF. Factor semejante a la insulina.

IGFBPs. Proteínas de unión a IGF.

INTA. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

ITH. Índice de Estrés Calórico.

Kiss 1. Kisseptina.

LH. Hormona luteinizante.

LN. Latitud Norte.

LS. Latitud Sur.

Mcg. Microgramos.

MT. Receptor de melatonina.

N. Norte

NARC. Núcleo arcuato.

NEA. Noreste argentino.

Ng/ml. Nanogramos por mililitros.

NOA. Noroeste argentino.

NPY. Neuropeptido Y.

O. Oeste.

P. Precipitaciones.

PB. Proteína bruta.

PGF2 $\alpha$ . Prostaglandina F 2 alfa.

POEs. Péptidos opioides endógenos.

PR. Receptor de Progesterona.

PV. Peso vivo.

P4. Progesterona.

RD2. Receptor 2 de Dopamina

RFRP. Péptidos relacionados con RF amidas.

RIA. Radio-Immunoensayo.

RNA. Ácido Ribonucleico.

Rpm. Revoluciones por minuto.

rT3. Triyodotironina Inversa.

SNC. Sistema nervioso central.

S. Sur.

T°. Temperatura

TM. Temperaturas mínimas.

TRFI. Inmunoensayo de fluorescencia.

TSH. Hormona Tiroestimulante.

T1. Tratamiento 1.

T2. Tratamiento 2.

T3. Hormona triyodotironina.

T4. Tiroxina.

UI. Unidades Internacionales.

$\mu$ m. Micras.

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

La extensión del territorio argentino determina una gran variedad climática. El clima cálido se presenta al norte y noreste del país. En estas regiones se distinguen dos variedades, con estación seca y sin estación seca. El clima subtropical sin estación seca se presenta en la zona norte de Entre Ríos, en el área más oriental de la región chaqueña, Corrientes y Misiones. Se caracteriza por temperaturas ( $T^{\circ}$ ) promedio de  $33^{\circ}\text{C}$  en verano  $13^{\circ}\text{C}$  en invierno y abundantes precipitaciones, con un promedio anual de 1.300 mm.

Si se considera la producción ovina nacional por regiones, se observa que está concentrada principalmente en tres grandes zonas que tienen características definidas: Patagonia, Pampa Húmeda y Mesopotamia. En el resto del país, que comprende las provincias del norte, noroeste (NOA) y centro oeste, la explotación ovina es más bien complementaria a la caprina (De Gea, 2007). En esta última región, predominan las razas productoras de carne que producen lana de baja calidad por lo que la esquila no se justifica. La lana representa una complicación debido a las características del medio ambiente donde abunda el monte bajo y sucio, debiéndose realizar el desoje dos o tres veces al año. La presencia de lana facilita también la mayor prevalencia de miasis (Yáñez y Fernández, 2014). Las razas productoras de carne presentes en esta región corresponden a las criollas y caras negras.

Hace aproximadamente 10 años que se están introduciendo ovinos deslanados en la Argentina, sobre todo en la provincia del Chaco, norte de Corrientes, norte de Santa Fe, Misiones y algunas provincias del NOA. En establecimientos chaqueños cercanos a la localidad de Makallé, Presidencia de la Plaza y en otras localidades se introdujeron las razas Dorper y Santa Inês. En Corrientes en localidades como Itatí, Empedrado, San Cosme y Capital también existen majadas de Santa Inês y Dorper. El Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de la localidad correntina de El Sombrero, desarrolla estudios evaluando la raza Dorper. Hay ensayos de terminación de corderos pesados y de cría de hembras cuyos resultados de conversión de carne por Kg de alimento son interesantes. La ganancia diaria de peso (GDP) de corderos Dorper fue 150 g y la de las



cruzas Merino x Romney fue 90 g/día, significativamente diferente ( $p < 0,05$ ). También la eficiencia alimenticia fue significativamente superior en la raza deslanada ( $p < 0,05$ ), siendo de 5,5 y 10,5 kg de ración por kg de carne respectivamente. Cuando se calculó el Índice de Estrés Calórico (ITH), se detectó que los corderos deslanados estuvieron bajo estrés calórico de severo a extremo, sin embargo el consumo no se vio afectado, demostrando una buena capacidad de adaptación (Verdoljak *et al.*, 2014).

Casuso *et al.* (2013) evaluaron GDP desde el nacimiento hasta el destete, comparando corderos Santa Inês, Ideal y la cruce de ambas razas (F1; Santa Inês x Ideal), en el subtropico argentino. La misma fue significativamente mayor en corderos F1, los corderos Santa Inês tuvieron un valor intermedio, en tanto que los lanados presentaron la menor GDP.

El crecimiento y desarrollo corporal y de algunos órganos también está siendo evaluado. Martínez *et al.* (2019) estudiaron el desarrollo ruminal en corderos de raza Ideal y cruces Ideal por Santa Inês, a diferentes Kg de peso vivo (PV). Observaron un mayor desarrollo en determinadas estructuras ruminales en corderos del biotipo Ideal por Santa Inês a partir de 17 kg de PV. Existió diferencia principalmente en el espesor de la túnica muscular y en largo y ancho de las papilas ruminales, lo que está relacionado con el consumo de alimento sólido a más temprana edad.

Ya hay trabajos de análisis de comportamiento materno de ovejas Santa Inês comparándolas con las de hembras Ideal en la región subtropical argentina. Utilizando la observación focal, directa y continua de las ovejas desde minutos antes de la expulsión del feto hasta el final de la primer mamada. Las variables analizadas fueron: tiempo que dedicaba la madre a limpiar y oler a su cordero, intervalo parto-primer mamada y duración de la primer mamada (Abson *et al.*, 2013). También se estudió el comportamiento de corderos neonatos Santa Inês, Ideal y cruces F1 de ambas razas, a través de los intervalos nacimiento-incorporación, incorporación-primer mamada y parto-primer mamada (Abson *et al.*, 2014), no encontrándose diferencias.

Las características de la actividad reproductiva de las ovejas de razas tropicales, son atractivas. Algunos estudios realizados se basan en colocar a estas hembras en fotoperiodos naturales o artificiales que simulan a los de regiones subtropicales a templadas.

Cheminuau *et al.* (2004) evaluaron la raza tropical Black Belly en fotoperiodo simulado de región templada y fotoperiodo de región tropical. Observaron que ambos grupos respondieron con marcada estacionalidad en sus ciclos reproductivos.

Coelho *et al.* (2006) evaluaron la actividad ovárica de borregas Santa Inês, Romney March y Suffolk ubicadas a 21° de latitud sur (LS), mediante perfiles de progesterona. No se detectó variación estacional en la concentración plasmática de progesterona en ovejas Santa Inês, contrario a lo que ocurrió con ovejas Romney March y Suffolk. El trabajo de Moraes *et al.* (2013) sobre la frecuencia de manifestación estral y concentración sérica de progesterona en ovejas Santa Inês, Texel e Ile de France en el sur de Brasil (23° de LS), muestra que Santa Inês tuvo un periodo de anestro breve. Sin embargo, ovejas tropicales Pelibuey a 21° de latitud norte (LN) presentaron variación estacional en la actividad reproductiva, independientemente de su condición corporal, disminuyendo la presentación de estros entre invierno y primavera (Isla Herrera *et al.*, 2010).

Sasa *et al.* (2011) trabajaron sobre la concentración de progesterona en ovejas Santa Inês, Romney March y Suffolk, en época de anestro estacional (septiembre a noviembre) y a 21° LS. El perfil de esta hormona demostró que las hembras Santa Inês presentaban actividad ovárica en esa estación y que la introducción del macho a la majada provocó mayor incremento de la hormona en la raza tropical, mientras que en las razas lanadas este nivel continuó estando por debajo de 1ng/ml, lo que indica ausencia de actividad ovárica.

La ovina raza Santa Inês, originaria de Brasil, es una raza sintética, que surgió a partir de cruzamientos entre las razas Somalís, Bergamácia, Morada Nova y Rabo Largo (Pereira, 2008). Los ovinos de esta raza están desprovistos de lana y presentan un pelaje corto de coloración variada. Se pueden encontrar animales con pelajes rojizos, marrones, negros y también existen los overos. Los machos alcanzan una estatura promedio de 90 cm y pueden llegar a pesar 100 kg, en tanto que las hembras miden 70 cm y pesan 60 kg. En rebaños de animales con adecuado nivel nutricional, los corderos nacen con 3,5 a 4 kg y llegan al destete a los 45 a 60 días de vida con 13 a 16 kg. La ganancia diaria de peso vivo está alrededor de 200 a 220 gramos (Bueno *et al.*, 2006).

No obstante, al ser comparada con otras razas carniceras mejoradas, Santa Inês tiene un desempeño inferior que se refleja en las características de la carcasa (Bueno *et al.*,

2006). Por este motivo resulta ideal para cruzamientos con razas como Texel o Ideal entre otras.

Según Quesada *et al.* (2001) esta raza tiene buena capacidad para adaptarse a climas adversos y muestra mayor tolerancia al calor que Morada Nova. Este es un rasgo importante ya que el estrés calórico limita la expresión del potencial genético de los animales (Magalhaes Melo, 2014). La rusticidad es otra característica propia de la raza, mostrando mayor resistencia a las enfermedades parasitarias e infecciosas (Da Silva, 2010)

Durante el pastoreo, el comportamiento de los ovinos Santa Inês es muy activo, caminan y exploran muy bien los potreros, lo que les confiere un mayor aprovechamiento de los distintos ambientes. Las razas deslanadas tienen mayor aceptación de plantas de hojas largas, consumiendo así una mayor diversidad de especies (Bueno *et al.*, 2006).

Dentro de los parámetros reproductivos se encuentra la prolificidad, definida como el número de crías nacidas por parto. La misma está relacionada con la tasa de ovulación, concepción, mortalidad embrionaria, tasa de abortos y nacimientos normales (Facó *et al.*, 2008). Las hembras de esta raza presentan una alta tasa de ovulación lo que permite la ocurrencia de gestaciones y partos dobles, impactando positivamente al sistema productivo (Silva *et al.*, 2010). Por ser una raza de origen tropical, presenta ausencia de estacionalidad reproductiva, o en caso de presentarse estación de anestro, ésta es de menor duración que la de razas originarias de regiones templadas (Bueno *et al.*, 2006, Pereira, 2008). Finalmente se destaca la acentuada habilidad materna lo que favorece la supervivencia perinatal de los corderos (Bueno *et al.*, 2006).

La raza Ideal también es sintética, originada a partir de cruzamientos entre Merino y Lincoln. Es una raza de doble propósito, principalmente utilizada para la producción de lana. Produce una lana de tipo Prima, de calidad semejante a aquella de la raza Merino pero con un mayor largo de mecha y con diámetro de fibra entre 22 y 25 micras. El vellón es cerrado y de aspecto voluminoso (De Gea, 2007).

En cuanto a la producción de carne, los corderos de un año de vida alcanzan un peso de carcasa caliente de 13,8 kg y un rinde de 40,5 %. El grado de engrasamiento, en una

escala de 1 a 5, es de 2 puntos. Además sus pérdidas por enfriamiento no son considerables (Mendoza *et al.*, 2003).

Entre sus características reproductivas se describe como una raza poliéstrica estacional con un anestro breve. La estación de cría puede extenderse desde octubre a julio (De Gea, 2007).

La introducción de ovinos de origen tropical deslanados en la región del noreste argentino (NEA) resulta beneficiosa, al menos, por dos motivos. Por un lado, al emplearse razas deslanadas se eliminan los inconvenientes que pueden darse por la presencia de lana (costo de la esquila, bajo valor de comercialización de la lana obtenida, problemas de almacenamiento de la lana esquilada).

Por otro lado, las razas carniceras de origen europeo son poliéstricas estacionales. La obtención de un único parto en el año es el reflejo de una estación reproductiva estrecha que implica ofertas estacionales de carne, leche, cuero y derivados. Esto favorece a que el consumo de carne ovina se restrinja solo a determinadas épocas del año. Además de desaprovecharse el potencial reproductivo que presentan los ovinos por tener un periodo corto de gestación y cría. A nivel económico se encarece el costo de mantenimiento de las madres y el precio de comercialización de los corderos (Yáñez y Fernández, 2014).

Si la ciclicidad anual de las hembras Santa Inês se mantiene en esta región, se podrían programar sistemas de producción para lograr 3 partos en 2 años, aumentando la productividad individual y por hectárea. Económicamente se traduce en sistemas de producción más eficientes y rentables y menor costo de producción de corderos (Yáñez y Fernández, 2014).

Por ello, resulta de sumo interés la evaluación de la actividad reproductiva de hembras ovinas de origen tropical que verifique la ausencia de estacionalidad en otros puntos geográficos, para justificar su introducción en áreas productivas con mayor amplitud en los cambios de la longitud del día.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### Características fisiológicas de la reproducción estacional

Los fenómenos de la reproducción ofrecen diferencias considerables según las especies, en los animales inferiores se realiza por simple división, mientras que los organismos superiores elaboran gametos capaces de desarrollarse (Kolb, 1987).

La frecuencia en la presentación del celo también es una característica que difiere según las especies. Las hembras pueden clasificarse en monoéstricas y poliestricas.

Las hembras monoéstricas (perra) son aquellas en las cuales el ciclo estral aparece tan solo una o dos veces a lo largo del año, presentando una fase de anestro o inactividad ovárica muy prolongada.

Las especies poliestricas presentan ciclos consecutivos y éstas a su vez se clasifican en poliestricas continuas y poliestricas estacionales. En las poliestricas continuas aparecen ciclos estrales durante todo el año, interrumpiéndose sólo cuando quedan preñadas. Son ejemplo de esto la vaca y la cerda. Las poliestricas estacionales son aquellas especies (yegua, oveja y cabra) con ciclos estrales sólo durante una estación determinada del año, bien durante la primavera y verano (yegua) o durante el otoño e invierno (oveja y cabra). Coincidiendo con la estación reproductiva específica para la especie, aparecen ciclos estrales consecutivos y cuando dicha estación finaliza, las hembras entran en fase de anestro hasta la nueva estación reproductiva (García Sacristán *et al.*, 1995).

Entonces, la estacionalidad de la actividad reproductiva, se caracteriza por la existencia de un periodo de actividad reproductiva y otro de inactividad ovárica o anestro (Porras Almeraya *et al.*, 2003).

Para comprender como se desencadena la estacionalidad, se deben conocer los factores que la determinan.

## **Ritmos Biológicos**

Debido a que la Tierra rota sobre su eje, ella presenta dos ambientes bien definidos: la luz y la oscuridad. Como el eje de rotación de la Tierra está inclinado, la duración relativa de los períodos de luz y oscuridad cambia durante el año. En respuesta a esto, los seres vivos respondieron evolutivamente a estas dos situaciones geofísicas desarrollando mecanismos específicos de predicción con el fin de adaptarse exitosamente. Este es el origen de los ritmos biológicos que se repiten cada 24 horas (ritmo circadiano) y de los ritmos anuales (ritmo circanual), que oscilan con las estaciones del año (Cardinali y Scacchi Bernasconi, 2009). Estos ritmos hacen que los individuos acomoden o ajusten muchas funciones vitales, por ejemplo el ciclo sueño vigilia, la migración en las aves, la hibernación y así también son los que conducen a que algunas especies animales presenten estacionalidad reproductiva.

## **Fotoperiodo**

El fotoperiodo corresponde al tiempo de exposición de los organismos a la luz en el transcurso de un día. Este varía con la latitud y constituye el mecanismo por el cual los animales y las plantas miden el paso de las estaciones. Estos cambios en el fotoperiodo no sólo regulan la actividad reproductiva, como se comentó antes, en otras especies también determinan el momento de migración, hibernación, etc.

Los factores ambientales que regulan el comienzo y mantenimiento de la actividad cíclica del ovario son fundamentalmente el fotoperiodo, la temperatura y las condiciones climáticas en general. Además, influyen otros factores como la lactación, nutrición y la presencia de otros animales.

La respuesta al fotoperiodo varía dependiendo de la especie. Las gatas y yeguas responden positivamente al aumento del fotoperiodo, mientras que ovejas y cabras lo hacen cuando éste disminuye. La respuesta positiva al fotoperiodo, es decir, el desarrollo de ciclos estrales, se produce uno o dos meses después del solsticio de invierno (cuando los días se vuelven cada vez más largos) en la yegua. Y generalmente uno o dos meses después del solsticio de verano (momento a partir del cual los días comienzan a acortarse),

en el caso de ovejas y cabras. Sin embargo, el periodo de tiempo necesario para que se instaure la respuesta negativa (anestro) es de 2 a 4 meses.

El fotoperiodo requiere de 3 componentes esenciales para realizar su trabajo. Primero, debe haber un fotorreceptor que detecte la luz y un reloj que distinga días largos de días cortos. Segundo, debe haber una ruta neural que enlace dicho reloj al aparato neuroendócrino. Finalmente, se encuentra el propio sistema endócrino, que involucra a la secreción de gonadotrofinas hipofisarias, el desarrollo gonadal y la retroalimentación gonadal producida por los esteroides sexuales (Bustos y Torres, 2012)

Los mamíferos usan sus ojos como fotorreceptores para medir el largo del día, pero la ruta por la que lo hacen es diferente a la de la captación y formación de imágenes. La información fluye a lo largo del nervio óptico en neuronas diferentes a las del sistema visual, las que son precisamente células ganglionares que contienen un único fotorpigmento denominado melanoxina (Panda *et al.*, 2005). Estas terminan en los núcleos supraquiasmáticos, dos estructuras localizadas en el hipotálamo justo por encima del quiasma óptico (Hattar *et al.*, 2002) las que en conjunto constituyen el tracto retino-hipotalámico.

El dispositivo que mide el tiempo parece estar basado en un reloj circadiano, de aproximadamente 24 horas, localizado en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo. Cada una de estas pequeñas áreas contiene miles de neuronas, que regulan todos los ritmos circadianos del cuerpo, por lo que su destrucción desprograma los ritmos alternantes entre sueño y vigilia, la función adrenal y el control de la temperatura corporal (Bustos y Torres, 2012).

Aunque el funcionamiento de este reloj es de 24 horas, muestra una plasticidad notable y se adapta a una variedad de fotoperíodos, ajustando las funciones fisiológicas que controla en consecuencia. Los cambios estacionales del fotoperiodo afectan de manera duradera al reloj circadiano, tanto a nivel molecular como eléctrico, que luego muestra la capacidad de retener la información fotoperiódica (Revel *et al.*, 2009).

## **El Hipotálamo, sitio donde se encuentra el reloj biológico**

El hipotálamo está ubicado en la base del cerebro rodeando la porción ventral del tercer ventrículo. Esta estructura coordina la mayor parte de las funciones endócrinas del organismo y sirve como uno de los principales centros de control del sistema nervioso autónomo (Ross y Pawlina, 2012). Es una región del sistema nervioso central (SNC) que presenta características especiales frente al resto de las regiones. Se acepta cada vez más la idea de que en el hipotálamo existen “formas especiales” de funcionamiento, donde cada tipo de célula neuronal, neuroglial y vascular tienen características propias cada vez mejor definidas (Toledano-Díaz *et al.*, 2017).

El tercer ventrículo es una cavidad endimaria del encéfalo, se presenta como una gran bolsa que se inclina sobre el acueducto que ella misma prolonga. Alrededor de la cavidad del tercer ventrículo existen masas de células vegetativas que constituyen el hipotálamo, quien se organiza en 3 capas o zonas: zona periventricular, zona medial y zona lateral.

La zona medial, constituye el hipotálamo vegetativo propiamente dicho. Presenta núcleos que se reparten en 3 regiones, región hipotalámica anterior, posterior y masa del cuerpo mamilar.

La región anterior comprende 3 núcleos: el núcleo preóptico; el núcleo supraóptico y el núcleo paraventricular. La región posterior comprende los núcleos dorsal, ventral y posterior. El cuerpo mamilar presenta el núcleo mamilar medial y el lateral (Rouvière y Delmas, 2005).

El hipotálamo comprende grupos de neuronas con sus axones y terminales, axones y terminales de otras neuronas cuyos cuerpos están fuera del hipotálamo, y axones que solamente pasan por este órgano. También posee células gliales.

La mayoría de las neuronas descargan sus neurotransmisores en una sinapsis modulando así la actividad de neuronas postsinápticas. Muchas neuronas hipotalámicas son diferentes, ya que no liberan neurotransmisores, sino que liberan hormonas al torrente circulatorio, y se denominan neuronas endócrinas. De manera que estas hormonas modulan las funciones de células a distancia.



Con técnicas de impregnación metálica, se demostró que existen en el hipotálamo 2 tipos de neuronas endócrinas, que de acuerdo a su tamaño pueden clasificarse en neuronas magnocelulares y las parvocelulares.

Las neuronas magnocelulares sintetizan y secretan hormonas de la neurohipófisis (oxitocina y vasopresina). Sus cuerpos se ubican en los núcleos supraóptico y paraventricular y sus axones viajan por el hipotálamo a la eminencia media y luego al tronco infundibular para terminar en la neurohipófisis.

Las parvocelulares tienen sus cuerpos en diversos núcleos hipotalámicos y sus axones terminan en la eminencia media. Ellas sintetizan hormonas que se liberan en los terminales nerviosos en la eminencia media y difunden a los capilares del sistema porta hipotalámico-hipofisiario para alcanzar finalmente la adenohipófisis, donde estimulan o inhiben la liberación de otras hormonas (Bustos y Torres, 2012).

Las neuronas hipotalámicas varían según el número y tipo de dendritas, y existencia o no de espinas en ellas, y también según la longitud de sus axones (Toledano-Díaz *et al.*, 2017).

La definición anatómica para los núcleos hipotalámicos no sería la correcta porque estos núcleos presentan tipos celulares muy diferentes. La organización morfofuncional básica hipotalámica se especializa en cada especie, haciendo difícil extrapolar los avances en el estudio de una especie a otras.

El recorrido descrito para las neuronas secretoras de factores liberadores, como la Hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) además de su terminal axónico principal que finaliza en la eminencia media, también presenta colaterales axónicos que se dirigen hacia otras estructuras del SNC para inervarlas

Las neuronas que segregan un determinado péptido, ocupan el mismo núcleo o área, aunque investigaciones posteriores demuestran que pueden existir las mismas agrupaciones o neuronas solitarias en otros núcleos. Actualmente se sabe que en la mayoría de los núcleos hipotalámicos coexisten diversos tipos de neuronas secretoras en íntima relación, algunas con capacidad de expresar más de un péptido hipotalámico. Junto a ellas, se evidencia la existencia de neuronas aminérgicas, glutamatérgicas y GABAérgicas.

También existen muchas neuronas que no se pueden clasificar porque todavía se desconoce que péptidos secretan. Los recuentos de las neuronas que sintetizan GnRH, en diferentes especies de mamíferos muestran cifras de entre 300 y 1300 células, con diferencias dentro de una misma especie en distintos núcleos y presencia de neuronas solitarias. Además, algunas de estas células cambian de morfología y secreción en diferentes fases reproductivas o inducidas por situaciones medioambientales (Toledano-Díaz *et al.*, 2017).

Un dato interesante, es que además de que existen neuronas específicas para la secreción de un neuropéptido, en determinadas situaciones, otras neuronas, secretoras o no, pueden producir ese péptido. Por ejemplo, en diferentes circunstancias, aumenta la producción del péptido liberador de corticotropina (CRH) no solo a partir de neuronas CRH clásicas, sino que se pueden detectar mensajeros RNA de este péptido en otras neuronas. Esto puede indicar la existencia de muchos subtipos de neuronas que sintetizan CRH, que son heterogéneas en sus características y comportamiento, con regulaciones diversas extra e intrahipotalámicas (Toledano-Díaz *et al.*, 2017).

### **Neuronas productoras del péptido liberador de gonadotrofinas (Neuronas GnRH)**

Las células que producen el factor liberador de gonadotrofinas se localizan en varios núcleos hipotalámicos, como el núcleo arcuato, paraventricular, periventricular, área preóptica (APO), y también en áreas reticulares extrahipotalámicas, como el septum y Banda diagonal de Broca, entre otros. Además de su proyección hacia la eminencia media, donde libera el péptido al sistema porta, se evidenciaron también hacia otros núcleos hipotalámicos, y a regiones extrahipotalámicas como la amígdala y el hipocampo. Esto sugiere que no solo estarían involucradas en la reproducción, sino también en otras funciones de control del SNC (Toledano Díaz *et al.*, 2017).

Los receptores para GnRH se encuentran principalmente en la adenohipófisis, en el caso de roedores y primates, también existen receptores en gónadas, placenta y glándula adrenal.

El patrón de secreción pulsátil es muy característico y se adapta al estado de desarrollo y al estado reproductivo del individuo, por ejemplo, en la mujer prepúber los picos de secreción se producen cada 3 o 4 horas, mientras que en la mujer fértil lo hacen

cada 1 o 2 minutos. La regulación es muy compleja, si bien existen células dedicadas a este fin, también son influenciadas por el estrés, la ingesta, el control emocional, etc. Además, las interneuronas como las dopaminérgicas o células gliales y tanicitos tienen la capacidad de realizar un control importante. La regulación puede ser a nivel celular, controlando la síntesis peptídica, o a nivel de su liberación en la eminencia media (Toledano Díaz *et al.*, 2017).

### **Neuronas productoras del péptido inhibidor de GnRH (neuronas GnIH)**

El péptido GnIH, término más empleado en la especie aviar, fue descubierto en el año 2000, y presenta varios ortólogos en diferentes especies (Tsutsui *et al.*, 2000; Tsutsui, 2009). Es sintetizado y liberado por neuronas hipotalámicas especialmente en el núcleo paraventricular en las aves y en el área dorsomedial en mamíferos, sus axones se proyectan a la eminencia media y/o a otros núcleos hipotalámicos. Los receptores de GnIH se encuentran en las neuronas GnRH, en células de la adenohipófisis y en gónadas (Toledano Díaz *et al.*, 2017).

La regulación de estas neuronas también es compleja y se demostró que en especies de reproducción estacional su expresión es dependiente de los niveles de melatonina (Tsutsui *et al.*, 2013).

### **Neuronas productoras del péptido Kisspeptina**

El péptido kisspeptina (kiss1), descubierto hace no muchos años es producido y secretado por neuronas hipotalámicas ubicadas principalmente en el núcleo arcuato y en menor medida en el área preóptica. Presenta proyecciones muy extensas que alcanzan varios núcleos hipotalámicos (Oakley *et al.*, 2009).

Kiss 1 tiene la capacidad de regular la actividad de las neuronas GnRH actuando a nivel del soma y de las dendritas (Toledano Díaz *et al.*, 2017).

### **Glándula Pineal y Melatonina**

En reproductores no estacionales, la información que fluye desde los somas de las neuronas secretoras de GnRH en el hipotálamo anterior regula la secreción de

gonadotropinas por la hipófisis anterior sin la intervención de otros elementos. Una ruta diferente existe en los mamíferos de reproducción estacional, donde la glándula pineal actúa como el principal transductor neuroendócrino.

La glándula pineal es impar, esférica y está situada en el centro del cerebro, sobre el techo del tercer ventrículo. La melatonina, hormona producida por esta glándula se identificó en 1958. Luego, a partir de estudios filogénicos se constató que la síntesis de melatonina en mamíferos estaba controlada por la luz ambiental a través de una vía neural cuya estación final eran las neuronas simpáticas del ganglio cervical superior. En 1965, se consolida el concepto de la glándula pineal como órgano neuroendócrino en mamíferos, al demostrarse que la oscuridad (fotoperíodos cortos) inducía cambios gonadales en el hámster y que estos podían ser suprimidos por la pinealectomía. Se atribuye a la glándula la capacidad de “transductor neuroendócrino”, por ser un órgano que convierte un estímulo neural proveniente de la retina y originado por la luz ambiental, en una respuesta endócrina, la producción de melatonina (Guerrero *et al.*, 2007).

La síntesis de esta hormona está controlada por el núcleo supraquiasmático, que está sincronizado con el ciclo luz/oscuridad a través del tracto retinohipotalámico. Durante la noche, el núcleo supraquiasmático envía señales neurales a través de una vía multisináptica simpática, la vía retino-hipotalámica-pineal. Esta vía consta de los núcleos paraventriculares hipotalámicos, las células intermediolaterales y el ganglio cervical superior, que se proyecta sobre la glándula pineal e induce en ella la liberación nocturna de noradrenalina. La unión de ésta última a sus receptores específicos situados en las membranas de los pinealocitos promueve la activación de la síntesis de melatonina (Guerrero *et al.*, 2007).

Después de ser sintetizada, la melatonina es liberada rápidamente a la circulación general. En mamíferos, la señalización de melatonina ocurre a través de la activación de dos receptores de alta afinidad, acoplados a proteína G: **MT1** y **MT2**. Ambos receptores pertenecen a grupos distintos dentro de la superfamilia de receptores acoplados a proteína G. Más recientemente se purificó otro sitio de unión de menor afinidad, **MT3**, quien no se acopla a proteína G, sino a quinona reductasa 2 (Revel *et al.*, 2009). La identidad completa de los sitios de unión de membrana de MT3 con quinona reductasa II, así como la relevancia fisiológica de estos sitios, todavía debe determinarse por completo aunque se

conoce que MT3 participa en la protección contra el estrés oxidativo (Dubocovich y Markowska, 2005).

Los tejidos en los que se identificaron y caracterizaron completamente los receptores funcionales de melatonina, MT1 y MT2, en mamíferos son retina, núcleo supraquiasmático, pars tuberalis, arterias cerebrales y periféricas, riñón, páncreas, corteza suprarrenal, testículos y células inmunitarias (Dubocovich y Markowska, 2005). Los sitios de unión se identificaron utilizando 125 I-melatonina como radioligando. En muchas especies de mamíferos estudiadas el número total de estructuras marcadas es notablemente alto, más de 100 estructuras neurales y 30 periféricas se unen específicamente a 125I-melatonina. Las estructuras que se unen al radioligando difieren considerablemente entre especies, excepto aquellas de la pars tuberalis y el núcleo supraquiasmático, quienes siempre aparecen marcadas (Revel *et al.*, 2009).

Aunque actualmente está bien establecido que la melatonina coordina la reproducción estacional con la época del año, los mecanismos por los cuales controla la actividad reproductiva todavía no se comprenden completamente (Revel *et al.*, 2009).

De forma general, se sabe que la información fotoperiódica que llega al animal hace que la glándula pineal también presente un “ritmo circadiano de secreción de melatonina” quien establece la frecuencia de pulsos de secreción de hormonas GnRH y luteinizante (LH) pero además, la melatonina determinaría la capacidad del hipotálamo y la hipófisis de responder al feedback negativo que ejerce el estradiol sobre éstas estructuras (Malpaux *et al.*, 1996). La Figura 1.1 esquematiza los pasos mencionados.

La regulación de la estacionalidad reproductiva por parte de la hormona melatonina se establece a nivel del eje hipotalámico-hipófisis gonadal. Esta regulación ocurre por la activación de los receptores de alta afinidad que están ubicados en el núcleo supraquiasmático y en la pars tuberalis (Morgan y Hazlerigg, 2008).

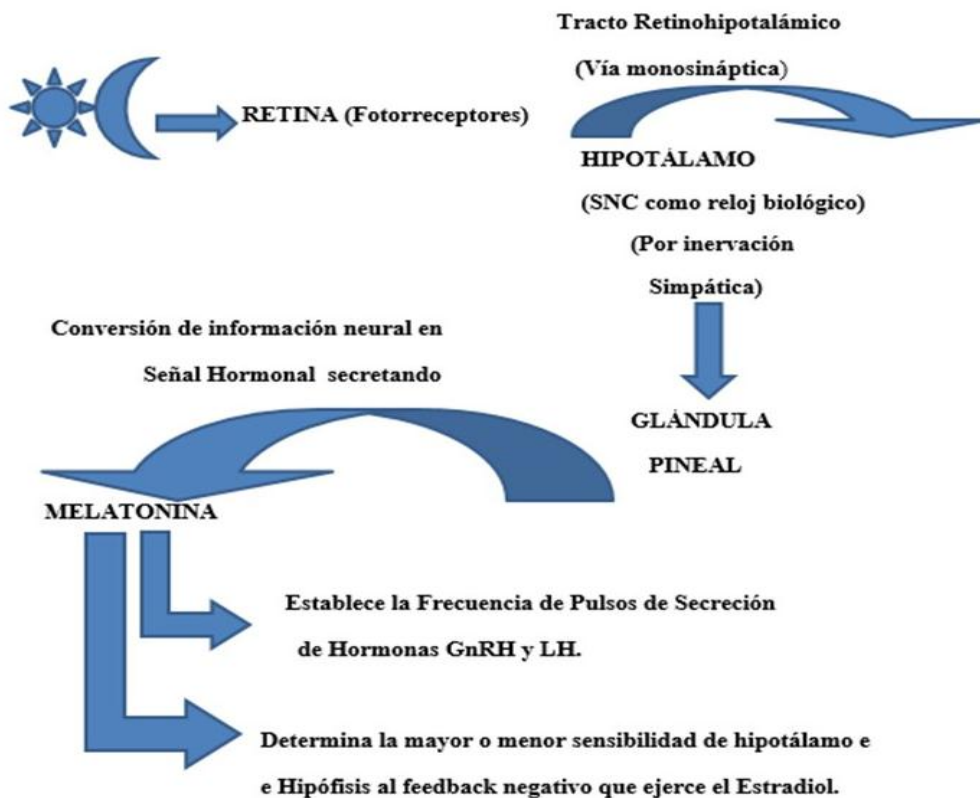


Figura 1.1. Circuito de estímulos que desencadenan el inicio o cese de la actividad reproductiva en hembras poliestricas estacionales.

Este esquema sintetiza de manera general los eventos que ocurren a través del circuito retino-hipotalámico-pineal, sin embargo, en los últimos años se realizaron numerosos estudios para esclarecer los mecanismos moleculares por los cuales la melatonina regula la síntesis y/o liberación de GnRH/LH para controlar la reproducción en especies estacionales.

### **Incremento en la respuesta del hipotálamo al feedback negativo del estradiol, durante el anestro**

Durante el anestro estacional, el estradiol (E2) adquiere la capacidad de suprimir la frecuencia de secreción de GnRH y LH. De tal manera que aún los niveles bajos de E2 durante el anestro inhiben fuertemente la actividad de GnRH (Goodman *et al.*, 2010). Por lo tanto, la retroalimentación negativa de E2 al hipotálamo está bajo control estacional, los

estudios de los últimos años se dirigen a comprender como se transmite esta influencia negativa a las neuronas GnRH (Weems *et al.*, 2015).

### **Participación de Neuronas Dopaminérgicas, Ácido Gamma aminobutírico y Glutamato**

En el hipotálamo existe un grupo de neuronas dopaminérgicas, denominadas A15, ubicadas específicamente en el área retroquiasmática (ARQ). Estas neuronas se descubrieron al investigar las vías aferentes por las que E2 ejerce su acción negativa sobre los pulsos de GnRH. Actualmente se cree que ellas desempeñan un papel fundamental en la regulación estacional de secreción de GnRH (Adams *et al.*, 2006, Smith *et al.*, 2008).

Al igual que las neuronas GnRH, las A15 no presentan el receptor  $\alpha$  de E2, de manera que su acción sobre ellas sería indirecta. Se identificaron 2 áreas principales que contienen células sensibles al estrógeno, que son activadas durante el feedback negativo del estradiol en el anestro estacional, el área preóptica ventromedial y el área retroquiasmática (Lehman *et al.*, 2010). Las células que presentan el receptor alfa de estrógenos, presentes en ambas regiones, proporcionan información a la región A15. Las fibras del área preóptica ventromedial y retroquiasmática contactan directamente con dendritas tirosin hidroxilasa positivas y con cuerpos neuronales de la región A15 (Goodman *et al.*, 2010).

Esta información desde el área preóptica y retroquiasmática hacia A15, sería una señalización glutamatérgica y/o ácido gamma aminobutíricoérgica, el estradiol estimula a glutamato e inhibe la liberación del ácido gamma aminobutírico (GABA) en la región A15 (Singh *et al.*, 2009). Sumado a esto, se comprobó que durante el anestro estacional el número de sinapsis glutamatérgicas hacia los cuerpos y dendritas neuronales en la región A15 están incrementadas, así como también existe un incremento en la longitud y en las bifurcaciones de las dendritas de las neuronas A15 (Adams *et al.*, 2006).

Una explicación simple sería que E2 (cuyos receptores  $\alpha$  se expresan en neuronas glutamatérgicas) estimula la liberación de glutamato desde las aferentes en la región A15, esto a su vez estimula la actividad de las neuronas A15, quienes inhiben la frecuencia de los pulsos de liberación de GnRH (Singh *et al.*, 2009). La señalización GABAérgica que

también tiene una entrada al área A15, tiene implicancia en el feedback negativo del estradiol, pero en este caso, E2 parece inhibir el tono GABAérgico. Así, la secreción de E2 desde el ovario durante el anestro resultaría en una liberación máxima de glutamato y mínima de GABA en las neuronas A15. También es importante la entrada de aferentes GABAérgicos hacia la región A15, ya que su importancia podría radicar en suprimir la actividad de las neuronas A15 en temporada reproductiva, cuando el tono de glutamato está reducido, además tal vez el  $Re\alpha$  (presente en neuronas GABA) podría disminuir en esta temporada, y así E2 ya no sería capaz de inhibir el tono GABAérgico. Por lo tanto, se propuso que durante el anestro, cuando las neuronas A15 están activas, su entrada aferente es predominantemente glutamatérgica, mientras que durante la temporada de reproducción, cuando están inactivas, predomina la entrada GABAérgica inhibitoria (Singh *et al.*, 2009).

El cambio de configuración que ocurre entre los contactos neuronales se denomina plasticidad neuronal, y es lo que permite que durante el anestro las sinapsis glutamatérgicas hacia las neuronas A15 estén incrementadas un 30 % más que en temporada reproductiva y ocurra el efecto supresor de E2 en la secreción de GnRH en época de anestro (Singh *et al.*, 2009).

La mayor población de cuerpos celulares de las neuronas GnRH se localiza en el área preóptica y menor cantidad en el hipotálamo medio basal e hipotálamo anterior. Sin embargo, las proyecciones de las neuronas A15 ocurren caudalmente, hacia el hipotálamo mediobasal, y no rostralmente hacia el área preóptica o hipotalámica anterior (Goodman *et al.*, 2010). Además, se demostró que los terminales dopaminérgicos están en contacto axo-axónico directo con los terminales de GnRH en la eminencia media de la oveja. Por lo tanto, la dopamina liberada por las neurona A15 pueden inhibir los pulsos de GnRH actuando a nivel de los axones GnRH (Goodman *et al.*, 2012).

### **Participación del neuropéptido Kisspeptina**

Por otra parte, el control que ejercen las neuronas A15 sobre la secreción de GnRH podría ser principalmente de forma indirecta, a través de células que se ubican en el núcleo arcuato (NARC) (Weems, *et al.*, 2015). En el núcleo arcuato existe un grupo de células que sintetizan kisspeptina, un neuropéptido capaz de estimular la secreción de GnRH. Kisspeptina ocupa un rol protagónico en la vía multisináptica que regula la secreción de



GnRH a través de dopamina. Las neuronas que sintetizan Kisspeptina son únicas porque producen otros dos péptidos también implicados en el control de la reproducción, neuroquinina B y dinorfina (Goodman *et al.*, 2007). Se comprobó que el neuropéptido kisspeptina así como la cantidad de ARNm de sus células disminuyen durante el anestro, probablemente por una fuerte inhibición del estradiol. Además, disminuye la cantidad de contactos de estas células hacia las neuronas GnRH en el hipotálamo mediobasal en ovejas en anestro, comparado con ovejas en estación reproductiva (Smith *et al.*, 2018). Esta disminución en el número de contactos hacia las neuronas GnRH, podría permitir una mayor inhibición de los pulsos por parte de otras “entradas”.

A través de un estudio reciente en el que se utilizó dinorfina como marcador, se observó que las neuronas kisspeptina coexpresan el receptor de dopamina D2 (D2R), el subtipo responsable de la inhibición de pulsos de GnRH y que esta coexpresión se incrementa durante el anestro, llegando a un 80%, mientras que en estación reproductiva es de 40% (Goodman *et al.*, 2012). Por lo tanto, las neuronas A15 podrían proyectarse al núcleo arcuato para inhibir a las neuronas de kisspeptina y así bloquear la secreción de GnRH durante el anestro (Weems *et al.*, 2015).

La revisión realizada por Weems *et al.* (2015) presenta un modelo que explica el mecanismo de acción del estradiol durante el anestro, inhibiendo los pulsos de secreción de GnRH y en consecuencia, de LH. Estos pasos se resumen en la figura 1.2. Sin embargo, el mecanismo por el que la melatonina induce los cambios conformacionales en este circuito neural, sigue sin dilucidarse por completo. Se conoce que la hormona triyodotironina (T3) juega un rol clave en la plasticidad neuronal, que podría constituir la clave de este mecanismo (Lehman *et al.*, 2010).

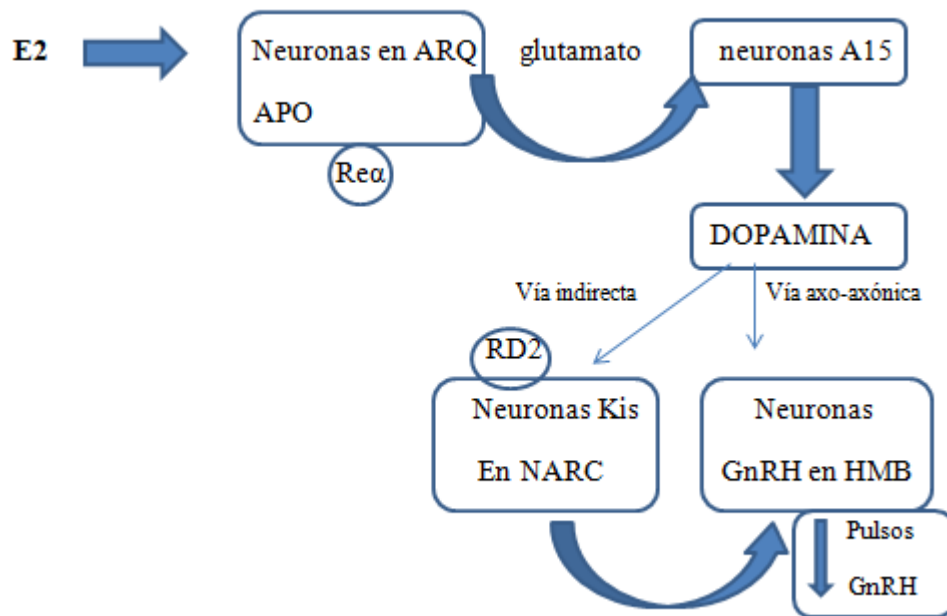


Figura 1.2. Vía de señalización del estradiol (E2) por la que incrementa el Feedback negativo a las neuronas GnRH. ARQ: área retroquiasmática; APO: área preóptica; NARC: núcleo arcuato; HMB: hipotálamo mediobasal; Re $\alpha$ : receptor  $\alpha$  de estradiol; RD2: receptor 2 de dopamina

## **Melatonina y Eje Hipotalámico-hipófisis-gonadal**

Las neuronas hipotalámicas, así como muchas otras neuronas ubicadas en diferentes partes del SNC presentan plasticidad morfológica. Esto significa que sufren cambios en su tamaño y forma y en sus entradas y salidas, lo que afecta la capacidad de respuesta a las señales endógenas, demostrando plasticidad funcional. Particularmente, en el caso de la actividad reproductiva estacional, esto se traduce en el cese o activación de la misma, según la época del año (Lehman *et al.*, 2010).

La plasticidad funcional que presenta el circuito neural que media la reproducción estacional está siendo fuertemente investigada. Es probable que los cambios funcionales en este circuito están relacionados con la expresión de neurotransmisores, receptores y otras moléculas de señalización, que contribuyen al cambio estacional en la reproducción (Goodman *et al.*, 2010).

## **Influencia de las hormonas tiroestimulante, tetrayodotironina y triyodotironina en la reproducción**

La hormona tiroestimulante (TSH) se sintetiza en la pars distalis de la hipófisis anterior y estimula a las células foliculares de la glándula tiroides quienes producen hormonas tiroideas (Ross y Pawlina, 2012).

Las principales hormonas secretadas por la glándula tiroides son la 3',5',3,5-L-tetrayodotiroxina (T4, tiroxina), la más abundante, la 3',5,3-L-triyodotironina (T3) y la más potente y activa 3',5',3-L-triyodotironina, llamada triyodotironina Inversa (rT3), la cual tiende a incrementarse cuando ocurren enfermedades e insuficiente ingestión de alimento (Yen, 2001; Moraes y Rodriguez, 2005).

La tiroidectomía previene el aumento estacional de la respuesta a la retroalimentación negativa que ejerce el estradiol sobre la secreción de GnRH, lo que interfiere con el proceso neuroendócrino clave necesario para el desarrollo del anestro (Osorio *et al.*, 2014). En ausencia de hormonas tiroideas la estación reproductiva no finaliza, así también en animales hipotiroideos la finalización de la estación reproductiva se retrasa en comparación con ovejas eutiroideas (Hernández *et al.*, 2003). Luego de una tiroidectomía, realizada al final de la estación de anestro, las ovejas entraron en actividad reproductiva normalmente pero continuaron exhibiendo ciclos estrales regulares aún durante la siguiente estación de anestro y se mantuvieron en esta condición por más de un año (Osorio *et al.*, 2014). Por lo tanto, en ausencia de estas hormonas el ritmo estacional reproductivo no se expresó.

### **Participación de TSH y hormonas tiroideas en el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal**

Existen en el cerebro dos enzimas que regulan localmente las concentraciones de hormonas tiroideas, las deiodinasas, Dio2 y Dio 3. La primera cataliza la conversión de la hormona T4 a su forma activa T3, elevando la concentración local de esta última. La segunda produce formas inactivas de ambas hormonas (Revel *et al.*, 2009).

Estudios en aves demostraron que al llevar codornices desde días cortos a días largos (lo que estimula la reproducción en estas especies) ocurrió un rápido incremento en la

expresión de Dio 2 en el hipotálamo medio basal, en consecuencia, durante la época reproductiva, T3 se encuentra aumentada en las aves (Revel *et al.*, 2009).

La regulación fotoperiódica de Dio 2 y Dio 3 se observó también en mamíferos. En el hámster sirio, una especie que se reproduce durante fotoperiodo creciente, se observó que Dio 2 estaba aumentada en época de días largos y disminuida durante días cortos. Llamativamente, cuando los animales permanecieron por períodos prolongados en días largos, el ARN m-Dio 2 disminuyó (Revel *et al.*, 2009). Un hallazgo muy interesante es que la influencia fotoperiódica de Dio 2 y Dio 3 podría ocurrir únicamente en especies estacionales. Esto se observó al analizar la expresión de ambas enzimas en ratas Wistar, una cepa en la que la reproducción no es estacional, donde Dio 2 no se vio afectada por el fotoperiodo (Revel *et al.*, 2009). Sin embargo, en otra cepa, la Fischer F344, donde sí se observa que la actividad testicular disminuye durante los días cortos, la expresión de Dio 2 también estuvo disminuida. Un dato más sorprendente aún es que las inyecciones diarias de melatonina exógena desencadenaron una disminución de Dio 2 en ratas Fischer así como también en ratas Wistar, de manera que aparentemente melatonina es capaz de regular la expresión de Dio 2 y probablemente la concentración local de T3 en ambas cepas, pero quizás los eventos posteriores gobernados por T3 sean diferentes (Revel *et al.*, 2009).

Otra explicación podría radicar en la amplitud del pico nocturno de melatonina, que podría ser diferente entre ambas cepas y podría explicar porque las inyecciones de melatonina modificaron la expresión de Dio 2 pero esto no ocurre en condiciones naturales de día corto (Revel *et al.*, 2009).

En especies que se reproducen durante días cortos (cabra y oveja) la regulación de Dio 2 sería opuesta. En cabras Saanen, durante la estación de celo, Dio2 se expresa en la parte caudal del núcleo arcuato del hipotálamo, al llevar las cabras a fotoperiodo artificial de día largo, el nivel de ARNm de Dio2 se redujo (Revel *et al.*, 2009). El sitio de acción de la melatonina sería el mismo para reproductores de día largo y de día corto, el hipotálamo mediobasal. En la oveja, los microimplantes de melatonina colocados a este nivel simulan un efecto de día corto en la secreción de LH, pero no se observa ningún efecto en otras áreas hipotalámicas (Yasuo *et al.*, 2006).

En resumen, los cambios fotoperiódicos en la secreción de melatonina regularían la expresión de Dio 2 y Dio 3 en el cerebro, y esto se traduciría en cambios en la concentración local de T3 activa, regulando la actividad reproductiva. Sin embargo, el mecanismo de acción por el cual ella ejerce este control no se conoce con exactitud. Dado que las hormonas tiroideas están involucradas en el desarrollo y la plasticidad del cerebro, estos cambios locales de T3 desencadenarían cambios morfológicos, los que ocurrirían a nivel de las paredes basolaterales del tercer ventrículo, más específicamente en los tanicitos de la capa endimaria (Revel *et al.*, 2009).

En cabras Saanen se comprobó que el ARNm de Dio 2 se expresó en la eminencia media, a nivel de las células endimarias y esta expresión estuvo disminuida cuando las cabras se encontraban en condiciones de día largo. Además, aunque las concentraciones de T4 no se modificaron entre días cortos y largos, los cambios en la concentración de T3 se suprimieron durante días largos. La expresión de Dio 2 estuvo aumentada también en el núcleo arcuato, el que es un sitio blanco tanto para tiroxina como para melatonina. Yasuo *et al.* (2006) comprobaron además que la acción de la hormona tiroidea en el desarrollo del anestro tiene una ventana estacional específica, ya que en el anestro medio a tardío no hay respuesta a la tiroxina.

### **Rol de la Pars Tuberalis de la hipófisis anterior**

A nivel de la pars distalis de la hipófisis anterior no se identificaron receptores para la hormona melatonina, como sí se identificaron en la pars tuberalis. Por este motivo, se postuló que esta última región de la adenohipófisis forma parte de un nuevo eje de regulación pineal-pars tuberalis-pars distalis (Morgan, 2000).

Por ejemplo, el estímulo de melatonina en sus receptores de la pars tuberalis inducen la síntesis de una hormona denominada tuberalina que ejerce una acción parácrina estimulando a las células de la adenohipófisis a secretar prolactina, de esta manera se regula el patrón estacional en la secreción de prolactina, que es contrario al de gonadotrofinas (Aguilar, 2009).

Hanon *et al.* (2008) proponen un camino alternativo para la regulación que ejerce la melatonina en la expresión del ARNm de Dio 2. Presentan un modelo en el cual

melatonina actuaría a nivel de la pars tuberalis, desde donde, por mecanismos parácrinos, se estimula la secreción de TSH a nivel de la pars distalis.

De acuerdo con esta hipótesis, durante los días largos el patrón de secreción de melatonina incrementa la expresión de un factor de transcripción denominado *Eya3* (eyes absent 3; “ojos ausentes 3”) en la pars tuberalis (Dardene *et al.*, 2010, Weems *et al.*, 2015). *Eya 3* es un gen controlado por el ritmo circadiano, que presenta un pico de expresión que ocurre aproximadamente 12 horas después del incremento en la secreción de melatonina durante la noche. La amplitud de este pico se incrementa cuando los niveles de melatonina son bajos. Esto estimula la expresión de TSH quien difunde hacia los tejidos neurales que tienen su receptor, estimulando la expresión de *Dio2* (Hanon *et al.*, 2008). Esto lleva a un aumento de T3 que finalmente induce el cambio morfológico neural que culmina controlando la secreción de GnRH (Weems *et al.*, 2015).

### **Tanicitos, células gliales con un rol clave en la regulación de la reproducción**

Los tanicitos son células gliales radiales cuyo cuerpo celular se encuentra incrustado en el epitelio endimario que reviste al tercer ventrículo. Éstos poseen proyecciones que se comunican con diferentes núcleos hipotalámicos (Lewis y Ebling, 2017).

Existen varios subtipos celulares clasificados según su ubicación y su proximidad a los núcleos hipotalámicos. Los tanicitos  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ , se unen a los núcleos dorsomedial y ventromedial, y los tanicitos  $\beta 1$  y  $\beta 2$ , bordean el núcleo arcuato y la eminencia media.

Estas células parecen actuar como integradores de los sistemas reproductivos y de la homeostasis energética. Ellos controlan dinámicamente la secreción de neuropéptidos hipotalámicos en la vasculatura portal y también regulan los intercambios entre la sangre y el cerebro y entre sangre/líquido cefalorraquídeo. Ambos procesos dependen de la capacidad de estas células de adaptar su morfología al estado fisiológico del individuo (Lewis y Ebling, 2017).

Su localización en el epitelio de la eminencia media merece particular atención ya que es el sitio donde estas células actúan para regular el eje hipotálamo hipofisiario gonadal. Esta región contiene axones que viajan a la neurohipófisis para secretar allí las neurohormonas producidas, además otros axones terminan allí, liberando sus productos

(factores liberadores, GnRH) al espacio pericapilar del sistema porta hipotálamo hipofisiario, quien recoge las neurohormonas para entregarlas a la adenohipófisis. El endotelio fenestrado presente no solo permite el paso de las sustancias neurosecretadas, sino que también permite el acceso de nutrientes y señales metabólicas al cerebro. En determinadas circunstancias, el paso de sustancias a nivel del epitelio fenestrado capilar en la eminencia media se restringe, además se establece una barrera física constituida por los cuerpos celulares de los tanicitos que “secuestran” estas moléculas dentro de la eminencia media evitando así su difusión al resto del cerebro (Prevot, *et al.*, 2018).

Se observó que en aves, roedores y primates, en la eminencia media, los axones de las neuronas GnRH se adhieren y envuelven estrechamente por membranas tancíticas. El acceso directo de las terminales nerviosas de GnRH a la vasculatura portal está controlado por cambios reversibles a nivel de la eminencia media que ocurren durante el ciclo estral y también dependería de los cambios conformacionales de los tanicitos que ocurrirían por acción de la T3.

Durante el ciclo estral, el cruce de los péptidos hipotalámicos hacia el torrente circulatorio puede depender del nivel circulante de esteroides gonadales. Durante el diestro, momento en el cual la secreción de gonadotropinas es baja, las terminales axónicas de las neuronas GnRH están completamente envueltas por tanicitos que crean una barrera que impide la difusión de GnRH hacia los vasos del sistema porta. Durante el proestro, antes que ocurra la oleada preovulatoria de GnRH/LH se produce una remodelación estructural de los tanicitos, que resulta en el desenvainado de los axones y el establecimiento de contacto neuro-hemático directo, es decir, entre la membrana axónica de las neuronas GnRH y la membrana basal de los capilares del sistema porta (Prevot *et al.*, 2018). Los posibles efectos de las modificaciones de T3 se resumen en la Figura 1.3.

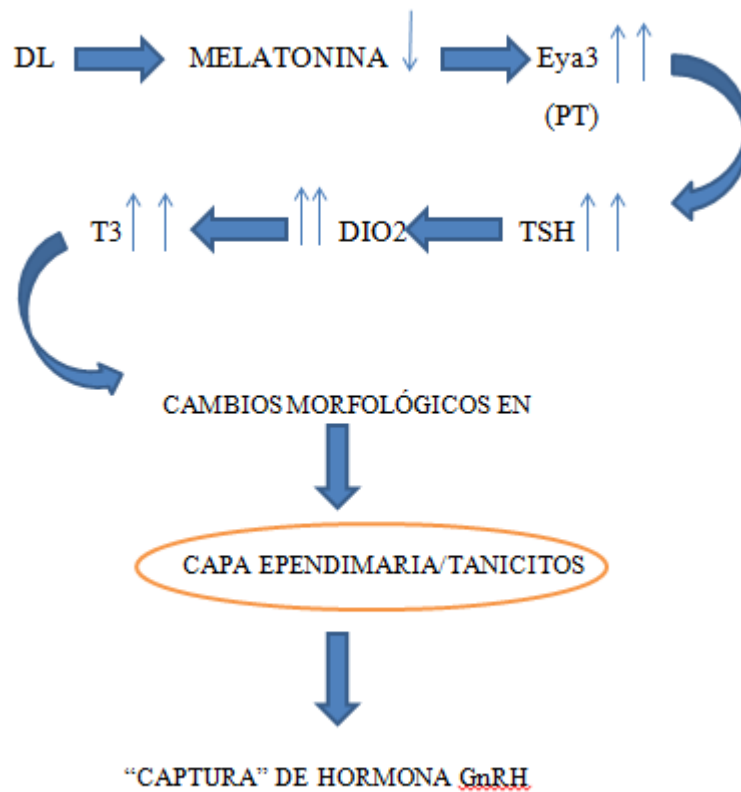


Figura 1.3. Posible efecto de la enzima DIO2 y hormona triyodotironina (T3) en el eje hipotalámico-hipófisis-gonadal en especies estacionales. DL: día largo.

### **Kisspeptina, un neuropéptido clave en el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal**

El gen *Kiss1* fue descubierto en 1996, en principio como un gen supresor de la metástasis (Lee *et al.*, 1996). Este gen codifica una familia de neuropéptidos llamada Kisspeptinas, cuya expresión es alta en regiones cerebrales claves en la regulación de la secreción de GnRH. Su receptor, *kiss1r*, ligado a proteína G, se expresa en cerebro, placenta, hipófisis, testículo además de páncreas y riñón (Kotani *et al.*, 2001, Calé *et al.*, 2011).

El complejo *kiss1/kiss1r* tomó importancia en el campo de la fisiología reproductiva cuando, en el año 2003, se informó que las mutaciones en *kiss1r* producían hipogonadismo hipotalámico idiopático y maduración puberal alterada (Oakley *et al.*, 2009). Además,



ratones knockout para *kiss1* presentaron disfuncionalidad en el eje reproductivo, no hubo secreción de hormonas LH y foliculoestimulante (FSH) aunque neuronas GnRH funcionaron con normalidad y las células gonadotropas de la pituitaria respondieron a GnRH exógena (Revel *et al.*, 2009).

Las neuronas que expresan Kiss/*kiss1r* están ubicadas en regiones del SNC que son importantes en la regulación de GnRH, como núcleo arcuato, núcleo paraventricular y área preóptica del hipotálamo y en otras regiones del cerebro de vertebrados. Su distribución, regulación y función varían mucho entre especies (Oakley *et al.*, 2009). Estas neuronas inervan y estimulan directamente a las neuronas GnRH y a su vez expresan receptores para estrógenos y andrógenos y son células blanco para la acción de esteroides gonadales, tanto en machos como en hembras. La señalización de kisspeptina en el cerebro se relaciona con la retroalimentación positiva y negativa de los esteroides sexuales en la secreción de gonadotropinas, la llegada de la pubertad y el control de la reproducción estacional (Oakley *et al.*, 2009).

En el caso particular de la oveja, *kiss1/kiss1r* se expresa predominantemente en el núcleo arcuato del hipotálamo y en menor medida en área preóptica. Este no es un detalle menor, ya que es sabido que este sitio contiene también abundantes neuronas GnRH. Otros sitios en los que se detectó el neuropéptido, aunque en muy pequeña cantidad, son sangre porta/hipofisiaria y fracciones de células gonadotropas. Estos datos sugieren que *kiss1/kiss1r* podría ser un factor neurosecretor en el eje hipotálamo/hipófisis o bien poseer un mecanismo parácrino dentro de la hipófisis misma (Smith *et al.*, 2008; Oakley *et al.*, 2009).

Está comprobado que kisspeptina provoca la liberación de GnRH al estimular directamente a las neuronas GnRH, ya que la mayoría de éstas células expresan *kiss1r* (Oakley *et al.*, 2009).

Si bien la acción de kisspeptina sobre las neuronas GnRH hace incrementar los niveles de GnRH y esto a su vez, los de LH, se cree también que kisspeptina puede actuar directamente sobre las células gonadotrópicas. Como se dijo anteriormente, *kiss1r* se expresa en células gonadotrópicas y niveles de *kiss1* se detectaron en sangre porta-hipofisiaria. Esto posibilita que kisspeptina actúe tanto a nivel hipotalámico como

hipofisiario (Oakley, 2009). Sin embargo, otros estudios sugieren lo contrario ya que en ovejas con una desconexión experimental entre hipotálamo e hipófisis, se observó que el tratamiento con kisspeptina no tuvo efecto en la secreción de LH, lo que hace presumir que kisspeptina actúe únicamente a nivel del hipotálamo (Smith *et al.*, 2008; Oakley *et al.*, 2009).

Kisspeptina también intervendría en los efectos de hormonas gonadales sobre la secreción de GnRH por parte del hipotálamo. Las neuronas GnRH presentan el receptor de estrógenos  $\beta$  (Er $\beta$ ), pero no el receptor  $\alpha$  (Er $\alpha$ ), ni los receptores de progesterona (PR) ni testosterona en ambos sexos, en consecuencia podría existir un sistema que actúe de intermediario. En virtud de que las neuronas kiss1 sí presentan receptores para las hormonas gonadales, ellas podrían representar un componente importante en la retroalimentación que ejercen estas hormonas en la liberación de GnRH (Smith *et al.*, 2007; Oakley *et al.*, 2009). La presencia de receptores de estrógenos y progesterona en las neuronas kiss 1 del núcleo arcuato demuestran que éstas células son diana de los esteroides gonadales (Franceschini *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2007).

En ovejas ovariectomizadas se observó un importante incremento en el número de células que expresan ARN-m kiss 1 así como también en el nivel de expresión en cada célula. Estos efectos fueron anulados tras el tratamiento con estrógeno. Si bien el tratamiento con progesterona también redujo el número de células que expresaban ARN-m kiss 1, no lo hizo con la misma intensidad que el estrógeno (Smith *et al.*, 2007). Estas observaciones permiten suponer el papel de kisspeptina en el feedback negativo de los esteroides gonadales en la secreción de GnRH.

Respecto al mecanismo de feedback positivo, las neuronas kiss 1 también tendrían una participación importante. Se demostró que en el núcleo arcuato de la oveja, kisspeptina está incrementada inmediatamente antes y durante la oleada periovulatoria de GnRH/LH. Más interesante aún, se observó que solo un grupo de neuronas kiss 1, ubicado en la región caudal del núcleo arcuato se activa justo antes del incremento de GnRH/LH (Estrada *et al.*, 2006). De esta forma, como se presenta en la figura 2.3, las neuronas kiss 1 participarían tanto en el feedback negativo como positivo de esteroides gonadales sobre la secreción de GnRH/LH, pero las regiones del núcleo arcuato involucradas serían diferentes para cada tipo de regulación (Estrada *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2007).

La expresión del ARNm de kiss 1 en el área preóptica no estaría regulada por estrógeno y progesterona, aunque el receptor de estrógenos se expresó en el 50 % de las neuronas kiss 1 en el área preóptica (Franceschini *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2007).

Queda aún por determinar si las neuronas kiss 1 del núcleo arcuato se proyectan directamente sobre las neuronas GnRH en el cerebro ovino (Smith *et al.*, 2007).

La secreción reducida de GnRH durante la época de anestro de la oveja se debe a efectos del fotoperiodo que pueden ser dependientes e independientes de los esteroides (Smith *et al.*, 2007).

El tratamiento endovenoso de kisspeptina exógena a ovejas que se encontraban en anestro estacional, hizo ovular al 80% de las hembras tratadas (Oakley *et al.*, 2009).

En las ovejas, la expresión de kisspeptina varía con la estación. Por ejemplo, la expresión de Kiss1 es más baja y hay menos contactos terminales de kisspeptina en las neuronas de GnRH durante el período de anestro en comparación con el período reproductivo (Oakley *et al.*, 2009). Por lo tanto, parece haber una contribución fundamental hecha por la señalización de kisspeptina para regular la reproducción estacional en una variedad de especies.

Las células que expresan ARN-m de kiss1 se identificaron fácilmente en el núcleo arcuato del hipotálamo de ovejas, además de una pequeña cantidad en el área preóptica. Sin embargo, éstas células no se identificaron en ninguna otra área vecina al hipotálamo (Smith *et al.*, 2007). A su vez, más del 80 % de las neuronas kisspeptina presentan receptores para progesterona en el núcleo arcuato (Smith *et al.*, 2007).

Se demostró que la expresión de ARNm de kiss 1 es influenciada por la época del año independientemente de los esteroides gonadales. En ovejas ovariectomizadas, el número de células que expresaban ARN-m kiss 1 en el núcleo arcuato fue 2 veces mayor en febrero (plena época reproductiva) que en diciembre (anestro tardío). También se observó efecto de la estación sobre las neuronas kiss 1, quienes estuvieron disminuidas en un 44 % en octubre (pleno anestro) con respecto a febrero (Smith *et al.*, 2007). Estos cambios en la expresión de kiss-1 podrían actuar como interruptor neuroendócrino que permita el inicio de la temporada de cría. En primates y ratones se demostró que esta

expresión se incrementa antes de la pubertad, en este sentido, el mecanismo podría ser semejante (Smith, *et al.*, 2007).

Por otra parte, dado que las neuronas GnRH no presentan diferencias morfológicas entre la estación de anestro y reproductiva en la oveja, parece más bien que el cambio en la secreción estaría dado por la regulación aferente que reciben estas neuronas, siendo posible que exista alguna alteración estacional en el grado en que la kisspeptina regula a las células GnRH (Smith *et al.*, 2007).

Lo que resta por determinar es cuál es la señal para que la expresión de kisspeptina se modifique entre las estaciones de anestro y reproductiva. Podría ser la melatonina, ya que sus receptores se localizan en el hipotálamo basal (Smith *et al.*, 2007).

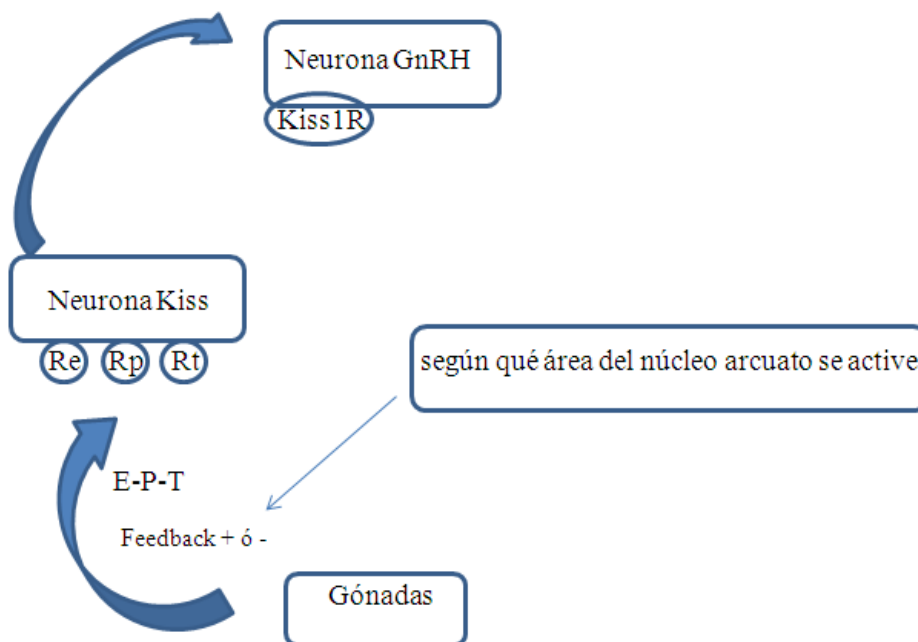


Figura 1.4. Posible señalización del neuropéptido kisspeptina en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal. Re, Rp y Rt: receptores de estrógeno, progesterona y testosterona; E, P y T: estrógeno, progesterona, testosterona.

## **Péptidos relacionados con RFamidas (RFRP)**

Las RFamidas son un grupo de péptidos identificados hace no muchos años que se caracterizan por presentar un grupo carboxiterminal arginina y una fenilalanina amidada (Arg-Phe-NH<sub>2</sub>). Como todos comparten la misma estructura de los denomina “péptidos relacionados con RFamidas”. En los mamíferos existen cinco genes que codifican a los miembros de esta familia y cinco receptores acoplados a proteína G a través de los cuales ellos actúan (Romeu *et al.*, 2016).

La familia de los péptidos RFamidas, dentro de la cual también se encuentra kisspeptina, comprende además otros dos péptidos biológicamente activos, codificados por el gen RFamida (Rfrp), ellos son RFRP-1 y RFRP-3, quienes cumplen varias funciones neuroendócrinas (Revel *et al.*, 2009). En reproducción, ellos se consideran como reguladores esenciales de las neuronas GnRH, y del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal. Además, se observó que varias funcionalidades de los RFRP están afectadas por factores como interacciones sociales, fotoperiodo, temperatura, nutrición y algunas enfermedades ováricas (Wang *et al.*, 2018).

En los últimos años, comenzó a evidenciarse que los RFRP tienen una influencia represiva significativa en la regulación de la reproducción en varias especies de mamíferos, incluyendo rata, ratón, hámster, cerdo, oveja, cabra, vaca, mono y humano. Además, la localización y las proyecciones de los péptidos RFRP varían entre las especies de mamíferos. En el caso de la oveja, las neuronas RFRP se localizan a nivel del hipotálamo anterior y se proyectan hacia el hipotálamo mediobasal y dorsomedial, el núcleo paraventricular y la eminencia media, y sus efectos se observan sobre la hormona LH (Wang *et al.*, 2018).

Entre la funciones de estos péptidos se conoce que RFRP-3, al inyectarse intracerebralmente en ratas adultas incrementó la ingesta de alimentos, el nivel de hormona del crecimiento, suprimió el comportamiento sexual y redujo los niveles plasmáticos de LH (Revel *et al.*, 2009).

Respecto a la influencia del fotoperiodo sobre la funcionalidad de RFRP-1 y 3, en el hámster sirio se observó que el gen Rfrp muestra expresión dependiente del fotoperiodo,

con una disminución durante los días cortos (época de anestro para esta especie), lo que no se observó en ratas Wistar. Además, se demostró que ésta regulación fotoperiódica no depende de los niveles de esteroides sexuales sino de la melatonina (Revel *et al.*, 2008).

La GnIH, el ortólogo de RFRP en aves, un neuropéptido que tiene la capacidad de inhibir la síntesis y liberación de GnRH, presenta variaciones estacionales. En codornices se observó que la expresión de GnIH así como sus neuronas se incrementaron bajo condición de día corto. También se observó que estas modificaciones fotoperiódicas dependen de la melatonina, ya que las neuronas GnIH en el hipotálamo paraventricular coexpresan el receptor para melatonina (MT2), de esta manera melatonina, sería capaz de inducir la expresión de GnIH en los días cortos (Ubuka *et al.*, 2005).

Estudios posteriores en ovejas demostraron que en temporada de anestro existió mayor inmunorreactividad a GnIH en el hipotálamo dorsomedial, además de un mayor número de contactos terminales a las neuronas GnRH (Revel *et al.*, 2009). Dardene *et al.* (2008) estableció que la expresión de *Rfrp* es altamente fotoperiódica en un área hipotalámica restringida, la capa ependimaria ventral del tercer ventrículo, donde el ARN-m de *Rfrp* es indetectable en animales sexualmente activos, mientras que es máxima en ovejas en anestro.

Estos resultados en aves y ovejas demuestran que GnIH/RFRP tienen efectos inhibitorios sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (la expresión de *Rfrp* está incrementada en hembras en anestro), sin embargo, en hámster (especie que se reproduce en días largos) se observó que RFRP se encuentra reducida en animales sexualmente inactivos. Quizá estos resultados opuestos se deban a diferente funcionalidad de RFRP-1 y RFRP-3 (Revel *et al.*, 2009).

## **Fotorrefractoriedad**

En ausencia de información fotoperiódica, por ejemplo bajo regímenes constantes de luz o luego de una pinealectomía, la estacionalidad reproductiva persiste, aunque no está sincronizada entre animales ni acorde al ciclo reproductivo natural. Esto demuestra que la oveja presenta un ritmo circanual endógeno y que el fotoperiodo no es quien crea este ritmo sino quien lo sincroniza (Malpaux *et al.*, 1989; Barrell *et al.*, 2000).

Además, la oveja es capaz de volverse “fotorrefractaria”. Esto quiere decir que, al estar expuesta a un fotoperiodo fijo por un tiempo prolongado (30-32 semanas en condiciones naturales y 16 a 18 semanas en condiciones controladas artificialmente) ella pierde la respuesta reproductiva a ese fotoperiodo. De hecho, muchas razas inician el anestro a mediados o fines de invierno, cuando las noches siguen siendo largas, y comienzan a demostrar actividad reproductiva a principios del verano cuando los días son largos, esto se debe a que la señal no consiste puntualmente en la cantidad total de horas luz sino que está relacionada con la “historia” fotoperiodica a la que el animal estuvo y está expuesto. Esta fotorrefractoriedad puede presentarse en días cortos como en días largos, en ambos casos llega un momento en el cual la oveja deja de ser sensible al efecto estimulador o inhibidor del fotoperiodo. Esto no se debe a un cambio en la secreción de melatonina, sino a un cambio en la respuesta del sistema endocrino a la señal de esta hormona. A partir de estos datos, algunos autores sugieren que en condiciones naturales, el rol de los días largos es sincronizar el inicio de la estación reproductiva mientras que el rol de los días cortos es mantenerla (Malpaux *et al.*, 1989).

### **Estacionalidad en la reproducción y época de partos**

La expresión de la estacionalidad reproductiva representa una adaptación natural de algunas especies para que las épocas de parto coincidan con las épocas de mejor clima y mayor disponibilidad de forrajes para una mejor tasa de supervivencia de la descendencia. La época de apareamiento depende de la duración de la gestación de cada especie. Así, en la yegua, la estación reproductiva se localiza en primavera-verano produciéndose el parto en la próxima primavera. En la oveja, el nacimiento de los corderos en primavera requiere que la estación reproductiva sea en otoño (García Sacristán *et al.*, 1995; Horta y Gonçalves, 2006).

En la especie ovina, esta estrategia se presenta mayormente en razas que viven en latitudes iguales o mayores a los 35°, donde los cambios ambientales son contrastantes en las diferentes estaciones del año y los animales desarrollaron “fotosensibilidad”. Las razas ovinas originarias de latitudes cercanas a los trópicos carecen de anestro estacional o los mismos son de menor duración, en estas hembras la fotosensibilidad estaría pobremente desarrollada (Lindsay, 1991; Porras Almeraya *et al.*, 2003).

Si bien es el fotoperiodo la principal señal ambiental utilizada porque es constante de un año a otro, siendo el indicador más confiable de la época del año, existen otras señales externas que son capaces de modular su efecto (temperatura, nutrición y relaciones sociales).

Mientras que en regiones templadas el fotoperiodo es el factor decisivo y los demás factores solo influyen en el inicio y la duración del anestro, en regiones tropicales el nivel nutricional es probablemente responsable de que exista algún periodo de anestro (Rosa y Bryant, 2003).

En cuanto a la temperatura, Wodzicka-Tomaszewska *et al.* (1967) demostraron que al exponer a ovejas bajo un fotoperiodo constante de 12 horas de luz y 12 de oscuridad por día y cambios bruscos de temperatura, el ritmo anual de reproducción persistió. Otros autores señalaron que la temperatura puede modificar el inicio de la estación reproductiva, ya que ovejas mantenidas con bajas temperaturas durante el verano comenzaron su actividad **más** temprano que las que estuvieron bajo las temperaturas típicas de dicha estación (Dutt y Bush, 1955, citado por Wodzicka-Tomaszewska *et al.*, 1967). Inviernos muy fríos con temperaturas entre 0 y 8°C adelantan la estación reproductiva en alrededor de 3 semanas. Asimismo, los veranos tórridos con temperaturas mayores a los 35°C y elevados porcentajes de humedad se expresan en la majada en forma de anestros superficiales (infertilidad de verano) y muertes embrionarias (De Gea, 2007).

A partir de lo revisado anteriormente, se puede decir que la oveja presenta 3 periodos definidos durante el año:

Estación reproductiva, caracterizada por la ocurrencia, a intervalos regulares (aproximadamente cada 17 días) de manifestación de síntomas de estro y ovulación, si la preñez no ocurre.

Estación de Anestro, caracterizada por el cese de la actividad sexual. Sin embargo, el crecimiento y regresión folicular siguen ocurriendo, y pueden observarse folículos tan grandes como aquellos que se presentan durante un ciclo estral normal. Estos producen esteroides y los efectos de feedback positivo y negativo sobre la secreción de LH continúan como en la temporada de cría. La hormona LH sigue siendo liberada, pero la diferencia



radica en que su frecuencia es mucho menor, lo que no permite que la ovulación ocurra (Gordon, 1997). La progesterona por su parte, permanece a niveles prácticamente indetectables durante este periodo (Karsch, 1984, citado por Gordon, 1997). Los niveles de hormona folículoestimulante no parecen ser significativamente diferentes de los encontrados en la época reproductiva (Roche *et al.*, 1970). En conclusión, durante este periodo, las frecuencias de GnRH y LH son extremadamente bajas (Karsch, 1984, citado por Gordon, 1997).

Periodo de transición, en el cual se presentan ciclos cortos, regresión prematura del cuerpo lúteo (CL) 5 o 6 días luego de su formación y ausencia de síntomas del celo. El inicio y el final de la estación reproductiva muchas veces son confusos justamente debido a la ocurrencia de ovulaciones silentes. Esto se debe a que durante el primer ciclo de la temporada el celo no es evidente debido a que para que esto ocurra, se requiere la presencia previa de progesterona, lo cual es posible recién luego de que ésta fue secretada por el CL.

Los eventos endócrinos que ocurren durante la transición son diferentes según ésta sea hacia el anestro o hacia la estación reproductiva. En el primer caso, ocurre una falla en el incremento progresivo de hormona LH previo a la ovulación. Mientras que en la época reproductiva los niveles basales de esta hormona se elevan en forma sostenida durante 48 horas, en la transición comienza a aumentar durante las primeras 24 horas pero cae progresivamente en las siguientes 24 horas. En consecuencia, no hay pico de estradiol ni oleada de LH (Karsch *et al.*, 1980). Sin embargo, cuando la transición es desde el anestro a la temporada reproductiva, los pulsos de LH se hacen cada vez más frecuentes y en menos de una semana se detectan niveles altos de la hormona. Es decir que la actividad reproductiva comienza con un aumento en la secreción tónica de LH. Una semana luego de detectar este incremento, se detectan pequeños aumentos transitorios de progesterona, que pueden deberse a fases luteales cortas que resultan de la ovulación de folículos inmaduros. Este periodo se prolonga por aproximadamente 4 semanas, durante las cuales se pueden detectar uno o más incrementos en la frecuencia de pulsos de LH y progesterona hasta que finalmente ocurre el primer ciclo estral (I' Anson and Legan, 1988).

## **Nutrición y Estacionalidad Reproductiva**

En la especie ovina, los efectos de la nutrición y del fotoperiodo, requieren especial atención. En la región subtropical la producción del pastizal es mínima en invierno y máxima en primavera y verano

Los efectos del fotoperiodo y la nutrición sobre la actividad reproductiva de las ovejas son interesantes. En primavera y verano la temperatura y humedad influyen positivamente sobre el crecimiento del forraje, ocasionando una mejora en la condición corporal de las hembras y mejores condiciones para criar a sus corderos, en tanto que cesan temporalmente su actividad cíclica. Esta es retomada en otoño para que coincidan las pariciones con la época de mejor oferta alimenticia.

En la relación entre el estado nutricional de la hembra y su función reproductiva participan varios mediadores que tienen como objetivo informar al sistema reproductor sobre las reservas nutricionales que presenta el animal.

Dentro de estos mediadores se encuentra la leptina, una hormona sintetizada por los adipocitos que regula poderosamente el consumo de alimentos y el gasto de energía (Pelleymounter *et al.*, 1995). Se conoce también que ésta hormona participa en la regulación de la fisiología reproductiva (Barash *et al.*, 1996). Las concentraciones circulantes de leptina pueden constituir una señal por la cual el organismo regula la reproducción. Se han identificado receptores de leptina en el hipotálamo, en hipófisis, gónadas y tejido adiposo, lo que demuestra que sus efectos pueden ocurrir a varios niveles. (Velasco y Gutierrez, 2008).

Se ha propuesto que la secreción de leptina podría estar influenciada por cambios en la duración del día (Bocquier *et al.*, 1998). Existen estudios que evaluaron los efectos de días cortos y días largos sobre los niveles séricos de leptina, insulina y prolactina, además de metabolitos como glucosa, urea, etc. en ovejas que recibieron una nutrición deficiente y ovejas que recibieron nutrición adecuada. Los niveles de leptina disminuyeron significativamente en ovejas ubicadas en fotoperiodo de día corto en ambos grupos de alimentación, pero el descenso fue más marcado en aquellas ovejas que habían recibido una mala nutrición. Insulina y prolactina por su parte, disminuyeron en ovejas en el primer

grupo pero sólo los niveles de prolactina se modificaron además según el fotoperiodo, con un descenso en ovejas que estuvieron sujetas a días cortos. Los demás metabolitos siempre disminuyeron en hembras con nutrición deficiente, excepto el glicerol libre que aumentó en las ovejas de este grupo. Ninguno de los metabolitos se vio afectado por la duración del fotoperiodo excepto los ácidos grasos no esterificados quienes se incrementaron significativamente en días cortos en ovejas subnutridas, lo que podría reflejar una mayor movilización de grasa corporal cuando se produce una alimentación insuficiente, lo que ocurre normalmente en invierno (Boquier *et al.*, 1998). Esto lleva a la conclusión de que, los niveles séricos de leptina se ven influenciados tanto por el nivel nutricional como por el fotoperiodo, ya que en ovejas que recibieron una nutrición adecuada, el nivel sanguíneo de leptina, se redujo durante los días cortos. Esta hormona actuaría como una señal metabólica crónica para el sistema reproductivo al indicar el nivel de reservas de grasa disponibles para satisfacer las demandas calóricas de la reproducción. En ratones, una nutrición deficiente por un tiempo transitorio sería transmitido de forma aguda a los sistemas neuroendócrino y reproductivo disminuyendo los niveles de leptina plasmática. En ovejas, la modulación de los niveles de leptina por el fotoperiodo podría desempeñar un papel en la adaptación fisiológica a una posible limitación ambiental (Bocquier *et al.*, 1998).

Tanto en machos como en hembras, una nutrición inadecuada se refleja en muchos aspectos importantes que impactan el rendimiento reproductivo. La edad a la pubertad, fertilidad, tasa de ovulación, crecimiento testicular y producción de espermatozoides, supervivencia embrionaria, intervalo parto-primer celo son fuertemente influenciados por la nutrición (Rosa y Bryant, 2003). La tasa ovulatoria es quien se relaciona más evidentemente con el peso vivo y la condición corporal. Rojas y Rodríguez (1997) evaluaron la tasa ovulatoria según la condición corporal (CC) de ovejas BlackBelly en el trópico. Las hembras que tenían CC de 4 (en la escala de 1 a 5) tuvieron mayor tasa de ovulación que las de CC 1, 2 y 3. En ovejas Pelibuey también se relacionó tasa ovulatoria con la CC, de igual forma, las que tenían mayor CC fueron quienes presentaron mayor tasa ovulatoria (De la Isla Herrera *et al.*, 2010). Una rápida mejora de la condición corporal a través de la suplementación con concentrados energéticos o proteicos en el periodo inmediatamente anterior a la cubrición se asocia con incremento en la tasa de ovulación (O'Callaghan y Boland 1999). La mejora del nivel nutricional por un aumento del

consumo o de la calidad de los suplementos alimenticios suministrados está relacionada con un mayor ingreso de nutrientes a nivel celular que estimulan la secreción de hormonas gonadotróficas o bien actúan directamente sobre el ovario aumentando la producción de progesterona (Cox *et al.*, 1987).

Los efectos del nivel nutricional pueden evidenciarse a largo, mediano y corto plazo (Rosa y Briant, 2003). Dentro de los primeros se incluyen aquellos que van desde el estadio fetal hasta que la oveja alcanza su madurez sexual. Podrían explicarse por su influencia sobre el pool de folículos primordiales, que constituye la fuente del total de folículos producidos a lo largo de la vida del animal y que queda determinado en el momento del nacimiento (Abecia y Forcada, 2017).

Los efectos a mediano plazo se centran sobre la duración de la estación reproductiva (Abecia y Forcada, 2017). Una subnutrición extrema puede alargar el periodo de anestro estacional (Knight *et al.*, 1983, citado por Abecia y Forcada, 2017). Por otra parte, estudios comprobaron que ovejas Rasa Aragonesa mantenidas con CC alta (mayor a 2,75) tuvieron un anestro estacional más corto que aquellas de baja CC (menor a 2,5) (Forcada *et al.*, 1992).

Finalmente, los efectos a corto plazo corresponden a aquellos que ocurren en el periodo previo a la cubrición, en el que a menudo se aplica una herramienta denominada flushing, que consiste en la suplementación alimentaria. Esto tiene un efecto beneficioso sobre la fertilidad y sobre la tasa de ovulación (Abecia y Forcada, 2017).

En animales con una buena CC, luego de una abrupta pérdida de peso corporal no se observa detrimento de la performance reproductiva inmediatamente, pero las pérdidas acumuladas durante varios ciclos reproductivos aumentan la incidencia de infertilidad. El nivel nutricional que recibe la oveja durante el invierno y primavera puede influir en el porcentaje de ovejas en estro en el siguiente otoño. Por otra parte, una dieta de submantenimiento introducida antes del inicio de la estación reproductiva no retrasó la presentación de la misma, excepto en ovejas muy jóvenes o muy viejas, siempre y cuando los animales hayan iniciado el submantenimiento con una CC buena (Rosa y Briant, 2003).

## **Importancia de la Progesterona en el seguimiento de la actividad reproductiva**

El seguimiento de la actividad reproductiva, precisamente de la actividad ovárica, puede realizarse por observación del estro, es decir detectando la manifestación de los síntomas del celo, esta opción requiere la utilización de machos vasectomizados, sobre todo en borregas púberes, ya que algunas veces éstas presentan celos silentes, es decir que no manifiestan el comportamiento del estro o se presentan síntomas con baja intensidad. Otra posibilidad para el seguimiento de la actividad reproductiva es a través de perfiles hormonales. En virtud de esto, en principio se caracterizó a los ciclos estrales de ovejas jóvenes como irregulares. (Hafez, 1952, citado por Rosa y Briant, 2003) clasificó los ciclos estrales de acuerdo a su duración, en simples (hasta 26 días) y múltiples (27 a 57 días). Los ciclos estrales simples se dividieron en cortos (menos de 14 días), normales (14 a 19 días) y largos (20 a 26 días), en tanto que los múltiples, en dobles (27 a 37 días) y triples (37 a 57 días). Posteriormente se asumió que en aquellos ciclos estrales mayores a 26 días, ocurrían ovulaciones silenciosas entre dos periodos de estros clínicos. Más tarde, estas ovulaciones silenciosas se confirmaron gracias a la determinación de las concentraciones plasmáticas de progesterona (Hare y Bryant, 1982). En borregas púberes de raza Santa Inês, Romney March y Suffolk se realizó la detección de celos con machos vasectomizados y el seguimiento de la actividad del ovario con perfiles de progesterona. En aquellos casos en que los ciclos estrales eran aparentemente múltiples ya que duraban entre 27 a 57 días, hubieron ovulaciones silenciosas, lo que se confirmó por análisis de progesterona sérica (Sasa *et al.*, 2002). Los celos silenciosos ocurren también en el primer ciclo estral luego de la pubertad y en el primer ciclo de la estación reproductiva. Esto se debe a que, si bien el estímulo hormonal para que ocurra la manifestación clínica del estro es el estradiol, es esencial que ocurra un periodo previo de exposición a la progesterona para que la hembra sea sensible al estradiol (Lamming y Mann, 1995).

La progesterona es frecuentemente utilizada para estudiar la actividad ovárica en hembras por ser una de las hormonas propias del ciclo estral y la que persiste por un lapso más prolongado (11-14 días). Sus niveles fluctúan inversamente con los de estrógeno incrementándose a partir de la ovulación.

Existen diferentes técnicas para determinar las concentraciones séricas de progesterona. Entre ellas podemos mencionar radioinmunoensayo (RIA), inmunoensayo de quimioluminiscencia (CLIA), inmunoensayo de fluorescencia (TRFI), inmunoensayo de polarización fluorescente (FPI), y el ensayo de inmunoabsorción ligado a una enzima (ELIZA) (Basu *et al.*, 2006). Estas técnicas emplean un aglutinante y un ligando, donde la cuantificación de una sustancia depende tanto de la saturación progresiva de un aglutinante específico para ella, como de la determinación de la distribución de sus fases unidas y libres (Karir, *et al.*, 2009). Esto se realiza empleando un sistema indicador de la unión, ya sea por fluorescencia (inmuno fluorescencia), RIA o ELIZA (Gómez *et al.*, 2011).

El RIA es una técnica muy sensible, que se utiliza mucho en medicina veterinaria, aunque actualmente está siendo dejada de lado, debido, entre otras cosas a la necesidad de utilizar material radiactivo (Chacón *et al.*, 2010).

Las determinaciones de progesterona sérica son de utilidad para monitorear el estado reproductivo de la oveja, valorar si la hembra está ciclando o en anestro y conocer el momento de ovulación en casos en que el celo sea poco manifiesto (Chacón *et al.*, 2010). Con el radioinmunoanálisis se estableció un nivel de corte de 0,5 ng/ml, por debajo del cual la hembra es considerada en fase folicular o en anestro (Delpino y Gonzales Stagnaro, 1993).

El inmunoensayo de quimioluminiscencia, por su parte, es una técnica que actualmente está siendo muy empleada, sobre todo en animales de compañía (Capwanya *et al.*, 2008). Algunos autores citan que, si bien existen trabajos publicados, es necesario realizar más estudios que permitan una mejor interpretación de los resultados (Rotta López, 2017).

Los trabajos que valoraron progesterona sérica por CLIA en ovejas establecen, hasta el momento, un nivel de corte de 2 ng/ml, por debajo del cual se consideran niveles basales (Lima, 2012) o bien que para considerar presencia de CL el valor de progesterona debe ser igual o mayor a 3 ng/ml (Chacón *et al.*, 2010).

Existe evidencia de que los niveles séricos de progesterona podrían ser afectados por el consumo de materia seca o por los niveles de determinados nutrientes en la dieta.

Argiello Rueda (2010) evaluó el efecto de una dieta convencional con pasto Maralfá (*Pennisetum purpureum*) y otra compuesta por pasto Maralfá mas fruto de palma como agregado lipídico, sobre la concentración de progesterona sérica en ovejas Pelibuey. Se observó que en las hembras alimentadas con la dieta que contenía mayor concentración de lípidos los niveles séricos de progesterona fueron mayores que en las ovejas que recibieron la dieta convencional. Sin embargo, otros autores observaron que la inclusión de 1,2 a 1,5 % de grasa bovina y jabones de calcio de ácidos grasos en la dieta no afectó las concentraciones séricas de progesterona en ovejas Pelibuey (Espinoza *et al.*, 2008). De manera que, si bien el hecho de que las concentraciones séricas de progesterona pueden modificarse según la composición de la dieta, todavía es un tanto controversial.

## **Anestro Posparto**

El anestro posparto puede definirse como el periodo de tiempo que transcurre entre el parto y el total restablecimiento de la actividad ovulatoria cíclica. La supresión de la actividad reproductiva en las hembras durante este periodo es, en realidad, una estrategia adaptativa para asegurar el bienestar del recién nacido (Nowak *et al.*, 2000).

Entre los factores que determinan la duración del anestro posparto se incluye la involución uterina, el estado endócrino, la nutrición, el ambiente y el amamantamiento (Arroyo *et al.*, 2009). Este último es de especial atención ya que no solo incluye el estímulo táctil de la glándula mamaria, sino que también implica una compleja interacción entre la madre y su cría (Nowak *et al.*, 2000; Tilbrook *et al.*, 2006).

Existe un claro efecto del amamantamiento en los parámetros productivos de ovejas de pelo (Camacho-Ronquillo *et al.*, 2008). Si bien las bases neuroendocrinas del anestro posparto inducido por la lactancia no se han establecido claramente en ovejas de estas razas, se sugiere que pueden participar neurotransmisores específicos en la modulación de la secreción pulsátil de GnRH y LH (Wise, 1990).

Una de las ventajas de la raza Santa Inês y otras razas de pelo de origen tropical, es que en ambientes tropicales o subtropicales pueden ser completamente no estacionales, o bien presentar una débil estacionalidad, sobre todo relacionada con la disponibilidad de alimento (Rosa y Bryant, 2003). Debido a esto, esta raza puede ser usada en programas

diseñados para intensificar el proceso reproductivo, de tal forma de conseguir 3 partos en 2 años. Para cumplir con este objetivo, se recomienda un intervalo entre partos de 8 meses (Araujo *et al.*, 2009). En este sentido, el tiempo que se prolongue el anestro posparto juega un rol crucial para alcanzar los objetivos. La posibilidad que una estación de anestro marcada esté ausente, permite emplear técnicas para reducir el periodo de anestro posparto, manejando los factores que favorecen su presentación, como por ejemplo, la lactación.

### **Eventos neuroendócrinos que ocurren en el anestro posparto de la oveja**

Durante el anestro estacional como en el de posparto, hay un aumento de la sensibilidad del hipotálamo al efecto negativo de la concentración basal de estradiol, que disminuye la frecuencia de secreción pulsátil de GnRH, lo que lleva a una disminución en la secreción de LH, bloqueando los eventos de maduración folicular y ovulación (Arroyo *et al.*, 2009). Este mecanismo es aceptado para vacas, cerdas y ovejas, sin embargo, éstas últimas, tienen un ciclo anual de reproducción diferente al de las otras especies, por lo tanto el anestro posparto puede confundirse con el anestro estacional (Lewis *et al.*, 1974, citado por Arroyo *et al.*, 2009).

En ovejas lactantes se comprobó que el anestro posparto está directamente relacionado con el consumo de energía y con los niveles de cortisol en sangre (Torreão *et al.*, 2008). Los péptidos opioides endógenos (POEs), ácido amino butírico (GABA) o dopamina posiblemente también participen como neurotransmisores inhibitorios intermediarios a nivel central entre la hormona esteroide y las neuronas productoras de GnRH, y el amamantamiento, a su vez, potencialice su acción (Arroyo *et al.*, 2009)

La falla en la maduración folicular y posterior ovulación durante este período en la oveja se debe a una inadecuada secreción de LH, producida por la extrema disminución de pulsos de secreción de GnRH. No obstante, en este momento, la glándula pituitaria tiene la capacidad de responder a GnRH exógena liberando LH, y ésta última es capaz de inducir en el ovario la liberación de estradiol. Sin embargo, pocas ovejas manifiestan celo luego de una primera aplicación de GnRH exógena, probablemente por la falta de sensibilización previa por parte de la progesterona (Wright *et al.*, 1983).



La lactancia se relaciona con el bloqueo en la secreción de GnRH, ya que ovejas cuyas crías se destetaron al parto presentaron estro a los 22 días posparto, 13 días antes que ovejas que se encontraban amamantando, y esto fue independiente del número de crías (Schirar *et al.*, 1989).

### **Niveles hormonales durante la gestación y el inicio del puerperio**

Las ovejas, durante la gestación, presentan elevadas concentraciones séricas de progesterona, secretada por el cuerpo lúteo y la placenta. La secreción continua de progesterona resulta en una inhibición prolongada del eje hipotalámico-hipófisis-gonadal. Como la síntesis de LH es inhibida por un largo período, sus reservas hipofisiarias y su liberación basal son bajas (Hafez y Hafez, 2002).

Finalizada la gestación, la concentración de progesterona cae a niveles indetectables y el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal comienza a restablecerse lentamente. En la oveja, vaca y cabra, es posible que ocurran ovulaciones silenciosas a las 3 semanas posparto, no obstante, los ciclos estrales fértiles se restablecen más tarde (Hafez y Hafez, 2002).

Cuando comienzan a ocurrir pequeñas descargas de GnRH, de baja frecuencia, se estimula la biosíntesis de LH por las células gonadotróficas, pero su liberación es escasa. Esto permite que las reservas de LH en la hipófisis anterior se restauren, sin embargo, durante esta primera fase, la cantidad de LH almacenada es todavía escasa, por lo que la amplitud de los pulsos de liberación es insuficiente, y no es posible que ocurra maduración folicular (Nett, 1987).

Una vez que los niveles de LH llegan a su concentración normal, los pulsos de liberación alcanzan la amplitud y frecuencia suficiente para estimular la maduración folicular final y la secreción de estradiol. Este último, estimula la expresión de sus propios receptores en el hipotálamo y la hipófisis anterior, aumentando así la sensibilidad de estos tejidos al feedback positivo (Nett, 1987).

Después de la reposición de las reservas de LH la ausencia de pulsos de LH es una consecuencia del amamantamiento, en especial de la succión por parte de la cría (Yavas y Walton, 2000).

## **Participación de los péptidos endógenos y la prolactina en el período posparto**

En el mecanismo de inhibición de GnRH y LH durante la lactancia están involucrados los péptidos opioides endógenos (POEs). Estos se producen en el cerebro y en la pituitaria anterior, e incluyen endorfinas, encefalinas y dinorfinas. Los receptores, quienes están acoplados a proteína G, son de 3 tipos, *mu*, *delta* y *kappa*. D-endorfina es el péptido opioide más potente, su función principal es inducir analgesia en respuesta a estímulos nocivos (Malven, 1995; Yavas y Walton, 2000).

Con la administración de alcaloides opioides exógenos, se observó que los POEs participan en el eje regulador de la secreción de LH, ya que suprimen la liberación de GnRH (Malven, 1995). Su participación como neurotransmisor intermediario durante la lactancia se estudia mediante la administración de antagonistas, como la naloxona. La administración de antagonistas opiáceos durante el amamantamiento incrementó los niveles de LH (Malven y Hudgens, 1987; Newton *et al.*, 1988, Lozano *et al.*, 1998).

Los sitios de acción de los POEs dentro del cerebro se identificaron mediante la infusión local de naloxona y anticuerpos anti-endorfina y anti-dinorfina. Probablemente los lugares en los cuales se inhiba la liberación de GnRH sean el hipotálamo basal anterior, núcleo supraquiasmático, área preóptica rostral e hipotálamo medio basal (Malven, 1995).

Aunque todavía no se conoce por completo el mecanismo exacto por el que los opioides regulan la liberación de GnRH y gonadotrofinas, se conoce que modulan fuertemente su secreción en diferentes fases reproductivas, y que esto es dependiente de esteroides (Parvizi *et al.*, 2000). Las fases en que ocurre esta regulación en el ciclo reproductivo son la fase lútea, gestación y período posparto (Malven, 1995). De manera que la participación de los POEs no ocurre únicamente en el anestro lactacional. No obstante, los opioides serían los neuropéptidos clave en la regulación neuroendócrina que causa baja secreción de GnRH y sensibilidad deprimida de la hipófisis durante la primer mitad del amamantamiento (Parvizi, 2000). Se sabe que el sitio de acción es el hipotálamo, más precisamente la eminencia media y el área preóptica. En estos núcleos hipotalámicos se localizan neuronas que sintetizan POEs y GnRH. En este sitio también existen altas concentraciones de receptores opioides y la aplicación de antagonistas opioides, en ambas regiones, estimula la secreción pulsátil de GnRH (Arroyo *et al.*, 2009).

Los opioides amplifican el retrocontrol que ejercen los esteroides gonadales sobre la secreción de LH, actuando a través del hipotálamo mediobasal, es decir vía central (Parvizi, 2000).

Prolactina es una hormona peptídica, compuesta por una sola cadena polipeptídica, presenta polimorfismo estructural, lo que le confiere la característica de contar con múltiples funciones (Goffin *et al.*, 2002). Su función más conocida es la de promover el desarrollo de la glándula mamaria durante la gestación y la lactancia, gracias a su efecto mitogénico. Además, participa en la regulación de la actividad reproductiva en general, sus niveles elevados durante el amamantamiento afectan la ocurrencia de ciclos estrales, al menos durante un corto período (Smith, 1978; McNeilly, 1987).

Durante la lactancia, el principal estímulo liberador es la succión, pero también lo son la luz, el sonido y el estrés (Freeman *et al.*, 2000).

La dopamina, secretada en el núcleo arcuato hipotalámico, se une a sus receptores D2 localizados en las células lactotrofas de la adenohipófisis inhibiendo la secreción de prolactina (Freeman *et al.*, 2000). Además, esta hormona tiene variaciones estacionales en su secreción, siendo mayor durante los días largos y menor en los días cortos, esta regulación no sería vía hipotálamo, sino que dependería del estímulo de melatonina directamente en la pars tuberalis, resultando en la liberación de “tuberalina”, quien por estímulo parácrino regula la secreción de prolactina en las células de la pars distalis (Aguilar, 2009).

Si bien la prolactina es fundamental para el inicio de la lactación, no ocurre lo mismo para el mantenimiento de la misma, donde existen diferencias entre especies. En la cerda, perra, gata y mujer el bloqueo de la secreción de prolactina mediante agonista dopaminérgicos provoca el cese de la secreción de leche de manera rápida. Sin embargo, en la oveja esto solo ocurre parcialmente (Prieto Ocejo, 1995).

El estímulo de la succión provoca la liberación de prolactina pero inhibe la de LH. Sin embargo, el mediador en este efecto inhibitorio no sería prolactina, sino los POEs. En la oveja,  $\beta$ -endorfina se incrementa por el estímulo de la succión y sería la responsable de la supresión en la liberación de LH durante la lactancia (Prieto Ocejo, 1995). En ovejas

evaluadas entre las 3 y 7 semanas posparto, el 86% de los episodios de amamantamiento resultó en un incremento significativo de los valores de  $\beta$ -endorfina en sangre portahipofisiaria, en tanto que el 46% de los episodios incrementó los valores de prolactina. El valor de LH en este momento siempre estuvo por debajo de 1 ng/ml, con 0 a 2 pulsos cada 6 horas (Gordon *et al.*, 1987).

Los efectos del amamantamiento sobre el reinicio de la actividad reproductiva se estudiaron tanto en ovejas lanadas como en ovejas de pelo.

En ovejas Ile de Franz y Churras (raza autóctona de Portugal) paridas en invierno-primavera, y con amamantamiento 2 veces al día, ninguna ovejas Ile de Franz y sólo el 8% de las ovejas Churras tuvo una concentración de P4 superior a 0,5 ng/ml antes de 1 mes de ocurrido el parto, a los 3 meses posparto, se registraron valores de P4 que indican actividad ovárica (0,5 ng/ml o más) en el 16 y 54% de las ovejas, respectivamente. Considerando el tipo de amamantamiento que tenían los animales era esperable que un mayor porcentaje presente actividad ovárica en el periodo estudiado, pero, probablemente lo que provocó la ausencia de hembras en actividad reproductiva haya sido la época del año (Azevedo *et al.*, 2003).

En ovejas Santa Inês paridas en estación seca y lluviosa en la región amazónica de Brasil, se observó que el amamantamiento controlado redujo el intervalo parto-estro y parto-preñez (Oliveira *et al.*, 2013). Por su parte, Castillo Maldonado *et al.* (2013) evaluaron ovejas de pelo, paridas en otoño, con lactancia continua y controlada y sincronizadas. Se observó diferencia significativa en el porcentaje de hembras que ovularon antes de los 35 días posparto a favor del grupo en lactancia controlada. Otros autores también evaluaron el efecto del amamantamiento continuo y restringido en el reinicio de la actividad reproductiva en ovejas tropicales, observando que con el control de la lactancia es posible reducir el periodo de anestro posparto (Morales Terán *et al.*, 2004; Morales Terán *et al.*, 2011; Knights *et al.*, 2012). Estos resultados demuestran que es posible optimizar el ciclo reproductivo en ovejas no estacionales con el empleo de estrategias en el amamantamiento.

La succión del pezón por parte del cordero probablemente no sea el único factor que interviene en la regulación de la lactancia sobre el reinicio de la actividad ovárica. La

importancia que tiene el vínculo madre-cría, sobre todo en rumiantes, donde un reconocimiento precoz entre ambos es necesario, implica la posibilidad de que dicho vínculo constituya un factor regulador en sí mismo

Estudios realizados en vacas acerca del efecto de la presencia de la cría, realizados con mastectomía o destete, sugirieron que la succión suprime la reanudación de los pulsos de LH a través de estímulos táctiles (señales somatosensoriales) de la ubre por parte del ternero. Más adelante, se sugirió que en la supresión de la liberación pulsátil de LH también está implicada la visión y el olfato materno una vez establecido el vínculo madre-cría poco después del parto. Inclusive, estudios realizados con denervación de glándula mamaria, estimulación manual de pezones (imitando la búsqueda de la ubre por parte del ternero), mastectomía, terneros con bozal, lactación restringida o aislamiento del ternero indicaron que la presencia física de un ternero modula el efecto supresor del amamantamiento en la ovulación posparto. Se evaluó también el efecto de la lactancia en vacas que amamantaban a su propia cría o a una cría ajena con quien no se había establecido el vínculo. Se observó que cuando se trataba de la propia cría hubo mayor concentración de oxitocina y en vacas que amamantaron a un ternero ajeno el intervalo posparto fue menor (Yavas y Walton, 2000).

El desarrollo del instinto materno tiene base endócrina, en ovejas, así como en la cerda y la coneja, responde a un cambio en la concentración de esteroides ováricos que ocurre después del parto, una disminución de progesterona junta a incremento en el estradiol. En el caso puntual de ovejas y cabras los esteroides no parecen inducir directamente el comportamiento materno, sino que tendrían un efecto de “preparar” a la madre para que, luego de la expulsión del feto, ésta desarrolle dicho comportamiento (Nowak *et al.*, 2000).

La relación que se establece entre madre y la cría en rumiantes es particular, puesto que por tratarse de especies precoces y que generalmente habitan en manada, es necesario un reconocimiento parental, que ocurre de forma muy eficaz (Nowak *et al.*, 2000). Las madres adquieren rápidamente la capacidad de reconocer a su cría y rechazar la ajena. En ovejas esto se establece entre dos y cuatro horas después del nacimiento (Poindron *et al.*, 1993). Aunque este reconocimiento se basa en el olfato, las madres también pueden identificar a sus crías a distancia por medio de la audición y la visión. La oveja es capaz de

adquirir esta capacidad dentro de las 8 horas de transcurrido el parto (Terrazas *et al.*, 1999). Los corderos son capaces de reconocer a su madre incluso a una distancia considerable ya a los 3 días de vida (Poindron *et al.*, 1993, Nowak *et al.*, 2000).

## **Otros Factores que intervienen en el reinicio de la actividad reproductiva posparto**

### **Involución Uterina**

Además del restablecimiento del eje hipotalámico-hipofisario-gonadal, para que la hembra sea capaz de ovular, concebir y llevar la gestación a término, es necesario que las estructuras morfológicas y anatómicas del sistema reproductivo recuperen el estado “normal” en el que se encontraban antes de la gestación.

En este sentido, el proceso de involución uterina debe completarse. En la oveja esto ocurre a los 30 o 40 días después del parto. Este proceso implica una reducción global del tamaño, pérdida de tejido cotiledonario y reparación de tejidos. Durante la semana posterior al parto, la vasculatura placentomal responsable de la nutrición hematótropa del feto degenera. Como resultado, el lumen uterino está lleno de loquío, una sustancia marrón espesa producida por la autólisis de los glóbulos rojos. Este período también se caracteriza por la disolución de las capas fetal y materna del placentoma y la expulsión de la placenta cotiledonaria fetal restante. Durante la segunda semana posparto, se liberan placas necróticas pardas de las carúnculas y la luz uterina. La reepitelización de las carúnculas ocurre en la tercer y cuarta semana junto con la disminución del tamaño uterino, masa y longitud del cuerno (Gray *et al.*, 2003).

En resumen, tres eventos ocurren durante la involución uterina posparto. 1) Una reducción general en el tamaño uterino; 2) pérdida de tejido del conceptus; y 3) reparación de tejidos. Las reducciones marcadas en la masa húmeda uterina (7-8 veces) y la longitud del cuerno (2-4 veces) se acompañan de un adelgazamiento tanto del endometrio como del miometrio (Gray *et al.*, 2003).

Las aminas biógenas, dopamina, norepinefrina y serotonina fueron implicadas en la regulación neuroendócrina de la LH en ovejas, aunque el rol exacto que juegan estos

neurotransmisores en la regulación de la liberación de luteinizante no está del todo claro. Los estudios desarrollados para evaluar los efectos de las aminas biógenas sobre la secreción de LH tuvieron resultados controversiales que variaban según la naturaleza del agente farmacológico, vía de administración y estatus fisiológico de la oveja.

En un estudio se evaluaron los efectos de la infusión intravenosa de dopamina, norepinefrina y serotonina sobre la concentración plasmática de LH y prolactina, en ovejas (Deaver y Dailey, 1982). Los autores observaron que: en ovejas ovariectomizadas, las aminas biógenas pueden incrementar o disminuir la liberación de LH, dependiendo de la dosis. La infusión intravenosa de aminas biógenas puede afectar la respuesta pituitaria a la hormona liberadora de gonadotropinas. La respuesta dosis-dependiente de LH a las aminas biógenas difiere según se trate de ovejas ovariectomizadas o en anestro estacional. Generalmente, las catecolaminas y la serotonina tienen efectos opuestos sobre LH (Deaver y Dailey, 1982).

Debido a que una amina biógena puede inhibir, estimular o no tener efecto sobre la secreción de LH, dependiendo de la dosis, no es sorprendente que se hayan presentado hipótesis contradictorias sobre cómo ellas podrían regular la secreción de LH. Los mecanismos por los cuales las diferentes dosis afectan la secreción de LH no están claros, pero una posibilidad es que existan varias clases de receptores con diferentes afinidades para los supuestos agonistas y antagonistas, y la activación (o inhibición) de estos receptores podría afectar la secreción de LH de manera diferente (Deaver y Dailey, 1982).

### **Raza y estacionalidad**

Los ovinos son considerados animales de día corto, debido a que poseen un complejo sistema neuroendócrino capaz de transformar la señal lumínica en una señal hormonal, de esta manera detecta los cambios anuales en la duración del fotoperiodo sincronizando el ritmo reproductivo.

Esto ocurre en latitudes iguales o mayores a 35°. En estas regiones los partos tienen lugar en primavera, momento en el cual el anestro posparto se confunde con el anestro estacional ya que las hembras no restablecen su actividad ovulatoria hasta la siguiente temporada reproductiva. Por lo tanto, en latitudes altas, los mecanismos neurales que

inducen el anestro posparto y estacional actúan en conjunto e inhiben la actividad ovulatoria (Arroyo *et al.*, 2009).

En el caso de razas ovinas tropicales, debido a la ausencia de estacionalidad reproductiva, o bien la ocurrencia de un anestro breve y la capacidad de la raza Santa Inês de ciclar con cría al pie (Bueno *et al.*, 2006), es factible desarrollar estrategias de manejo tendientes a reducir el periodo posparto. Estas características de la raza tropical Santa Inês fueron las que motivaron la realización de la presente tesis, en este caso poder conocer la duración del tiempo de retorno al estro luego del parto (Anexo 1).

### **Nutrición y anestro posparto**

La señalización de los cambios metabólicos que ocurren en el organismo hacia las neuronas hipotalámicas que secretan GnRH, es un requisito previo indispensable para una función reproductiva normal en los mamíferos. Esta regulación depende de una serie de señales periféricas diferentes (Pralong, 2010).

Si durante algún periodo de la vida el aporte nutricional es deficiente, se traducirá en pérdida de peso y de condición corporal, pudiendo ocasionar trastornos metabólicos reflejados en modificaciones en la concentración sanguínea de hormonas como leptina, insulina, factor de crecimiento asociado a la insulina (IGF-1), colecistoquinina, hormona del crecimiento, neuropéptido Y, o metabolitos como glucosa, ácidos grasos volátiles, algunos aminoácidos. Al verse alterados estos mediadores metabólicos entre el estado nutricional y la actividad reproductiva durante el periodo posparto ocurrirán retrasos en la presentación del ciclo estral (Arroyo, 2011).

Al reducirse la disponibilidad de nutrientes se produce un balance energético negativo por estar comprometida la disponibilidad de glucosa, aumentando, en consecuencia, la movilización de las reservas corporales (glucógeno, triglicéridos y proteínas). El metabolismo basal, la actividad, el crecimiento y las reservas energéticas básicas tienen prioridad sobre los procesos reproductivos, como el inicio de la ciclicidad y el establecimiento y mantenimiento de la preñez. Cuando además, la hembra está en lactancia posparto, la movilización de reservas corporales prioriza la producción de leche para la supervivencia del cordero (Scaramuzzi *et al.*, 2006; Hayder y Ali, 2008). La



lactancia es un evento fisiológico que tiene prioridad sobre los procesos reproductivos (Álvarez Rodríguez *et al.*, 2009) afectando la función luteal y el periodo de anestro posparto.

El plano nutricional puede afectar las concentraciones periféricas de varias hormonas metabólicas y reproductivas, tales como la insulina, el factor de crecimiento símil insulina, leptina, estriol  $17\beta$  (E2) y progesterona (P4), tanto en vacas como en ovejas no preñadas. En consecuencia, alteraciones en las concentraciones de hormonas específicas pueden ocasionar cambios en las funciones ováricas y reproductivas, incluyendo, actividad endócrina, fertilización y desarrollo embrionario, calidad y crecimiento del oocito y fertilidad (Kaminski *et al.*, 2015).

Un inadecuado consumo de nutrientes en relación con las demandas metabólicas de la hembra, es un factor que contribuye a prolongar el anestro posparto actuando por vía de mecanismos metabólicos y hormonales (Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2009).

Torreão *et al.* (2008) evaluaron el efecto de diferentes niveles de energía metabolizable (2,2 – 2,8 y 3,4 Mcal/día) sobre los valores de progesterona entre los 30 y 70 días posparto en ovejas Morada Nova en lactación, los cuales estuvieron por encima de 1 ng/ml en aquellas hembras que recibieron los mayores niveles de energía. Sus resultados demostraron que la actividad reproductiva tuvo relación directa con la ingesta de energía. Si bien la actividad ovulatoria se reinició alrededor de los 40 días en todos los tratamientos, en el que ofrecía el mayor nivel de energía metabolizable todas las ovejas reiniciaron la actividad ovárica en el tiempo observado. Es notable como las ovejas Morada Nova y Santa Inês tuvieron una condición corporal semejante (inferior a 3, en la escala del 1 al 5) y sin embargo, el mayor aporte de energía metabolizable determinó que se reinicie la actividad reproductiva. Una oferta de 3,4 Mcal de energía metabolizable es recomendable desde el último tercio de la gestación para mejorar la eficiencia reproductiva.

En este sentido, es importante describir a varias hormonas neuroendócrinas y neuropéptidos cuya función es informar a los centros del cerebro sobre la condición metabólica del cuerpo. Los efectos del balance energético negativo, hipoglucemia, hipoinsulinemia, factor semejante a la insulina (IGF) plasmático suprimido y hormona del crecimiento (GH) plasmática elevada, actúan principalmente en el nivel hipotalámico-

pituitario del control reproductivo. La respuesta a estos efectos está asociada con la inhibición de la pulsatilidad de GnRH, anovulación y anestro (Scaramuzzi *et al.*, 2006).

## **Los integradores hipotalámicos del metabolismo y la reproducción:** **Leptina, Insulina y NPY**

El primer paso para que se establezca la respuesta neuroendocrina reproductiva a una nutrición deficiente, es que los cambios metabólicos periféricos se informen al hipotálamo para que luego los mecanismos o vías intra-hipotalámicos traduzcan dichas señales en una secreción alterada de GnRH. La leptina y la insulina son factores metabólicos circulantes importantes que indican el estado nutricional al hipotálamo y se reconoce su papel en la modulación general de la actividad de las neuronas GnRH. El neuropéptido Y (NPY) se propone como un factor intermediario (Pralong, 2010; Miller *et al.*, 2011).

### **Neuronas de “primer orden”**

Las neuronas que expresan NPY, así como las que expresan Kiss-1, serían ejemplos de neuronas de primer orden, ya que son quienes reciben la señal de leptina e insulina y la transmiten a las neuronas GnRH proyectándose hacia ellas. Desde éstas últimas sale finalmente el estímulo hacia las células gonadotrofas (Pralong, 2010).

### **La leptina**

Esta hormona metabólica es sintetizada y secretada por las células adiposas blancas (Barash *et al.*, 1996). Su función es enviar señales al hipotálamo brindando información sobre el estado nutricional del individuo y tiene efecto inhibitorio en las gónadas. Esta proteína y sus receptores se han encontrado también en tejidos reproductivos, lo que implica que se involucra en el desarrollo embrionario e implantación, pues en humanos ya se ha comprobado que es producida por el trofoblasto (Kandiel *et al.*, 2016).

La leptina responde a los cambios agudos en la dieta y también mide las reservas de energía corporal a largo plazo. Cuanto mayores sean estas reservas, mayor será la concentración sanguínea de leptina. Por lo tanto, la concentración de leptina en la sangre envía señales al folículo sobre los efectos nutricionales tanto a corto plazo (aquellos que

ocurren sin modificación del peso corporal) y los efectos a largo plazo (los que ocurren cuando hubo aumento del peso corporal) (Scaramuzzi *et al.*, 2006).

La deficiencia de leptina en humanos y roedores se asocia con obesidad hiperfágica y con hipogonadismo e infertilidad. Esta asociación quedó demostrada porque con la administración de leptina exógena, los efectos de su deficiencia se corrigieron (Pralong, 2010).

Las neuronas GnRH no presentan un nivel elevado de receptores de leptina, por lo tanto es más probable que la señalización sea a través de las interneuronas que se proyectan a las células GnRH. El neuropéptido Y es un posible intermediario, ya que sus neuronas coexpresan receptores para leptina (Baskin *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2006).

### **El neuropéptido Y (NPY)**

El neuropéptido Y (NPY), un péptido de 36 aminoácidos, aislado por primera vez en 1982, fue implicado como un factor modulador en la liberación de GnRH y LH (Barker Gibb *et al.*, 1995).

El NPY es uno de los estimuladores del apetito más potente. Actúa como un importante modulador neuroendócrino que participa en la red neural integrando el metabolismo y la reproducción y mediando la señalización de leptina (Pedrazzini *et al.*, 2003).

El efecto de NPY en el eje reproductivo depende de la presencia de esteroides sexuales. Animales con niveles altos de esteroides sexuales mostraron una fuerte estimulación en la secreción de LH por parte de NPY, en tanto que en animales castrados la administración central de NPY produjo inhibición (Kalra y Crowley, 1984). La administración crónica de NPY ocasionó una profunda inhibición del eje gonadotrópico, sugiriendo que el aumento de sus niveles durante periodos de ayuno o condiciones metabólicas desfavorables podría ser la señal para la inhibición pulsátil de GnRH (Aubert *et al.*, 1998).

En ovejas, la presencia del NPY está relacionada a una inhibición profunda del eje reproductivo y supresión de la secreción de GnRH (Pralong *et al.*, 2010).

Los efectos tanto de NPY como de insulina sobre el eje reproductivo presentan un grado de complejidad, ya que en ellos interviene la “memoria nutricional”, es decir que, el animal responderá a NPY o insulina según el estado metabólico que éste haya atravesado a largo plazo. La administración intracerebroventricular de NPY e insulina a ovejas produjo resultados diferentes según hayan estado flacas pero mantenidas en un plano nutricional creciente o gordas, pero con plano nutricional decreciente. En el primer caso, la administración de insulina estimuló la secreción de LH y suprimió la ingesta voluntaria de alimentos mientras las ovejas estaban delgadas, pero no cuando engordaron. En tanto que NPY no tuvo ningún efecto cuando las ovejas estaban flacas, pero disminuyó la secreción de LH e incrementó el consumo voluntario cuando las ovejas engordaron. En el segundo caso, insulina no tuvo ningún efecto al estar las ovejas gordas, pero sí cuando adelgazaron. NPY disminuyó la secreción de LH al principio, pero no tuvo efecto cuando las hembras bajaron de peso (Miller *et al.*, 2011).

### **La insulina**

Esta hormona, cuya función más reconocida es la homeostasis de la glucosa, es denominada también la hormona de la saciedad, y estimula el almacenamiento de grasa en los tejidos (Woods *et al.*, 1979; Pralong, 2010).

Al igual que la leptina, los niveles periféricos de insulina son proporcionales al contenido de tejido adiposo del organismo y la concentración de esta hormona en el líquido cefalorraquídeo es proporcional a sus niveles periféricos. Además, presenta receptores en neuronas hipotalámicas, que regulan la homeostasis energética y el consumo (Schwartz *et al.*, 1992).

La insulina también está implicada en la integración del estado metabólico y la actividad reproductiva, constituyendo una señal nutricional y metabólica junto con la glucosa y los ácidos grasos volátiles (Downing y Scaramuzzi, 1997).

Catunda *et al.*, (2013) evaluaron ovejas Santa Inês y Morada Nova en pastoreo, un lote suplementado con una mezcla de heno de pasto Tiftón, maíz molido y harina de soja y el otro lote no suplementado, durante la estación reproductiva. Demostraron que los niveles de leptina, insulina y glucosa se incrementaron significativamente en ovejas

suplementadas, pero no hubo efecto significativo sobre la tasa de fertilidad ni de prolificidad. La explicación, al menos para leptina, sería que, si bien sus niveles se incrementaron, no alcanzaron los niveles observados en otros estudios con ovejas lanadas (Delavaud *et al.*, 2000; Sosa *et al.*, 2009), posiblemente debido a que las ovejas de pelo tienen menor cantidad de tejido adiposo (Catunda *et al.*, 2013).

Otro factor regulador de la actividad reproductiva, especialmente de la funcionalidad ovárica, es el factor de crecimiento semejante a la insulina. El sistema IGF, se compone de dos ligandos, IGF-1 e IGF-2. El primero tiene receptores a nivel de las células de la granulosa, epitelio secretor del oviducto y glándulas endometriales del útero (Stevenson y Whates, 1996; Hashizume *et al.*, 2000). IGF-2 actúa como un factor de crecimiento autócrino y parácrino, afectando la proliferación y diferenciación de fibroblastos perivasculares de los grandes vasos y a nivel capilar (Hastie *et al.*, 2004). A nivel folicular existen receptores para IGF-1 en células de la granulosa en folículos grandes y también en el cuerpo lúteo. En ovejas en anestro estacional se observó mayor expresión de ARN-m de IGF-2 e IGF-1 en folículos grandes y pequeños, respectivamente (Hastie *et al.*, 2004).

Existen también proteínas de unión a IGF (IGFBPs), que son proteínas transportadoras que se unen a los IGF incrementando su vida media, bloquean su acción, inhiben en el ovario los efectos sinérgicos de IGF-1 y FSH. Estas proteínas controlan la actividad de los IGF según el tamaño folicular, por ejemplo, durante el fenómeno de atresia folicular en ovejas. Las gonadotropinas son capaces de regular la funcionalidad de los IGF 1 y 2 y de las IGFBPs en diferentes etapas del ciclo estral (Zulu *et al.*, 2002; Kobayashi *et al.*, 2006).

A nivel del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal, IGF-1 regula el control nutricional de la secreción de LH, constituyendo otra señal metabólica importante. A nivel hipofisiario existen receptores para IGF-1 y en ovejas, se observó que modificaciones en la dieta alteraron los niveles séricos de IGF-1, aunque los niveles intraováricos serían más resistentes (Adam *et al.*, 1998; O'Callaghan *et al.*, 2000).

## **Efecto de la presencia del carnero en la reanudación de la actividad ovárica**

La capacidad que tienen los carneros para inducir la actividad ovárica en las hembras se conoce como “efecto macho” y es implementada como herramienta en muchos rebaños. La introducción de carneros a un grupo de ovejas anovulatorias que previamente hayan estado aisladas de su presencia, produce que un porcentaje de éstas manifiesten celo, ovulen y se preñen (Hawken y Martin, 2012).

El fundamento de esta característica es que, sobre todo en mamíferos que viven en grupos de varios individuos, existen estímulos sensoriales, las señales sociosexuales, que son capaces de alterar profundamente varios procesos fisiológicos y comportamentales, incluida la reproducción (Martin *et al.*, 1986; Ungerfeld, 2007).

El principal estímulo es el olfatorio, mediado por una sustancia química secretada por el macho, denominada feromona, cuya concentración depende de la concentración de testosterona. En la hembra expuesta al estímulo se establece un circuito de retroalimentación de feromonas entre las neuronas GnRH y áreas del cerebro responsables del procesamiento olfatorio, finalmente ocurre un incremento sostenido de la secreción de GnRH/LH y se induce la ovulación (Hawken y Martin, 2012).

Existe un estímulo inicial agudo, que determina un cambio en la secreción de LH entre 0 y 6 horas después de la exposición de la hembra al macho, sin embargo, los estímulos pueden ser de diferente naturaleza y no exclusivamente originado por los olores. Además, la respuesta de la hembra varía de acuerdo al método de exposición, ya que el mismo también puede ser originado artificialmente (Iwata *et al.*, 2003; Hawken y Martin, 2012).

El mecanismo exacto que desencadena el incremento en la secreción de GnRH y LH no se conoce en su totalidad, pero se demostró que las células GnRH se activan luego de la exposición al macho. A través de estudios de inmunohistoquímica en ovejas, se observó la expresión de c-fos en neuronas GnRH, una proteína de transcripción que se activa a partir de diversos estímulos y que esta expresión es proporcional al tiempo de exposición (Gelez

y Fabre-Niz, 2006). Probablemente kisspeptina intervenga en el mecanismo, tal como lo sugieren estudios en cabras (Okamura *et al.*, 2010).

## **Citología Vaginal**

El ciclo estral de las hembras está regulado por el sistema neuroendócrino, el que conduce a cambios fisiológicos en los órganos reproductivos. A su vez, estos cambios pueden ser visualizados por el examen clínico o por evaluaciones de laboratorio y/o ultrasonografía.

El examen físico consiste en la palpación y observación de los órganos. La palpación es mucho más efectiva en la hembra bovina, debido a la posibilidad de realizar palpación rectal. En la hembra ovina el examen se restringe a la observación por medio de un espéculum. En ambas especies también es posible la observación por medio de ultrasonografía. El examen de laboratorio puede realizarse a través de citología vaginal exfoliativa, que es un indicador sensible de los cambios ocurridos a lo largo del ciclo estral en muchas especies. Estos cambios a su vez, pueden ser utilizados como diagnóstico auxiliar confiable para determinar el estadio del ciclo estral o el momento óptimo para realizar el servicio o inseminación artificial (Rezende, 2006).

La citología vaginal estudia las células individuales, requiriendo células exfoliadas, sin considerar la arquitectura del tejido u órgano de origen, y es a la vez una herramienta simple, rápida, económica y poco invasiva, de diagnóstico de la fase del ciclo estral (Banks, 1991).

## **Estructura histológica y receptores hormonales de la vagina**

La vagina es un órgano muscular compuesto por tres capas: mucosa, muscular y adventicia. En la mucosa encontramos un epitelio de revestimiento que corresponde a plano estratificado no queratinizado. Como en la epidermis, el epitelio vaginal produce diferentes tipos celulares, cada uno representa un estadio de maduración. Los estratos parabasal o espinoso e intermedio o granuloso, que se apoyan sobre el estrato germinativo, corresponden a células que tienen la capacidad de diferenciarse. En tanto que las capas de la zona superficial están compuestas por células cornificadas, el producto final del proceso

de diferenciación. Estas variaciones ocurren en respuesta a cambios hormonales que ocasionan la muerte y descamación de las células de la capa superficial (Tasat, 1994; Rezende, 2006; Ross y Paulina, 2012).

Las hormonas ováricas tienen un efecto trófico importante sobre todo el tracto genital de los mamíferos, de tal forma que para que estos órganos se desarrollen, crezcan y funcionen de manera óptima es indispensable que tengan una continua exposición a las mismas (Tasat, 1994).

Las células del epitelio vaginal, así como también las del estroma tienen receptores hormonales localizados en el núcleo, los cuales controlan la maduración y la diferenciación celular. El estradiol, a través de sus receptores  $E_{\alpha}$  y  $E_{\beta}$ , induce incremento en la síntesis de ADN, ARN nuclear y citoplasmático, síntesis proteica y actividad mitótica. De esta forma estimula el aumento en el número de las capas celulares de la vagina y cornificación de las capas más superficiales (Tasat, 1994). Las células vaginales en este proceso se alejan de la membrana basal hacia el lumen vaginal, distanciándose del soporte vascular nutricio y progresando hacia la muerte celular. De esta manera, los cambios citológicos vaginales son reflejo de las variaciones de las concentraciones séricas de estrógeno, y los diferentes tipos celulares observados representan distintos estadios de muerte celular. Tan pronto como las células vaginales esféricas mueren, comienzan a agrandarse y su forma se vuelve más irregular. Los núcleos celulares también sufren cambios que reflejan el proceso de muerte, estos comienzan a disminuir su tamaño, se vuelven picnóticos para luego desintegrarse dando como resultado células anucleadas (Calderón Castillo, 2016). Con la caída de los niveles de estrógeno y el incremento de progesterona el epitelio sufre infiltración de polimorfonucleares y se reduce el número de capas a aquellas de los estratos más profundos, con células basales, parabasales o intermedias (Tasat, 1994).

### **Implicancias del estudio de la citología vaginal**

La citología vaginal es usada frecuentemente en medicina humana como parte de los planes de salud reproductiva de la mujer.



En veterinaria también se utiliza para evaluar el estado reproductivo de las hembras y seguir de forma precisa el progreso de las distintas etapas del ciclo estral. El mayor uso se hace en hembras caninas para poder estimar el momento de la ovulación (Schutte, 1967, Ola *et al.*, 2006) y hacer el manejo correspondiente del servicio. En hembras de interés productivo, especialmente en la vaca, la oveja y la cabra, se implementa la técnica hace varios años (Ahmadi y Nazifi, 2006), pero todos los trabajos coinciden en que hasta el momento los resultados son menos aprovechados por la disparidad que hay en los procedimientos, lo que dificulta las comparaciones.

Hay grandes avances en la biotecnología de la reproducción y es ahí donde la citología vaginal se presenta como una herramienta para auxiliar en la identificación del estado reproductivo. Por ejemplo, una buena identificación del estro permite detectar el momento más próximo a la ovulación lo que favorece a que ocurra fecundación. Esto, sumado a la posibilidad de realizar una detección temprana de la gestación, posibilita optimizar los resultados en programas de reproducción. Representa una alternativa al uso de retajos antes de colocar los carneros o realizar la inseminación artificial. Puede ser también utilizada para diagnosticar precozmente patologías del tracto genital femenino (Raposo y Silva, 1999; Toniollo *et al.*, 2005).

Uno de los mayores objetivos del estudio de citología vaginal en hembras caninas es el reconocimiento del momento óptimo para realizar el servicio o la inseminación artificial. Sin embargo, el ciclo estral de la perra difiere del de la oveja en algunos puntos, en especial, en la fase de estro, el que en la perra tiene una duración promedio de 9 días, y en que no existe una fase definida de metaestro, ya que éste ocurre durante el estro (Tamalatzi, 2013). Esta es una situación muy diferente al de vacas y ovejas, donde el estro dura aproximadamente 12 y 24 horas, respectivamente.

Las diferencias que existen en el ciclo estral entre distintas especies debe considerarse al estudiar la citología vaginal en hembras rumiantes, donde lo ideal es realizar el análisis de las modificaciones del epitelio vaginal junto con las modificaciones en las concentraciones hormonales y además el estudio ultrasonográfico de los ovarios para observar el desarrollo folicular. Las informaciones sobre la dinámica folicular obtenidas por exámenes ultrasonográficos, permiten presuponer la actividad hormonal tanto por la presencia de cuerpo lúteo, el cual es indicativo de producción de progesterona, o bien por

la dominancia del folículo mayor, que indica secreción de estrógenos. En este sentido, el hecho de asociar la citología vaginal, con la dinámica folicular en el transcurso del ciclo estral, es necesario para verificar si las ondas foliculares interfieren en la descamación del epitelio vaginal (Rezende, 2006).

### **Células del epitelio vaginal**

Las células del epitelio vaginal se clasificaron en basales, aquellas que descansan sobre la membrana basal. Son pequeñas, ovoides y con núcleo grande. Prácticamente no aparecen en los extendidos celulares. La segunda camada de células corresponde a las parabasales, son similares a las basales pero con núcleo un poco menor, miden entre 15 y 25  $\mu\text{m}$  de diámetro. Luego se encuentran las células intermedias, tienen un núcleo todavía más pequeño y forma navicular. Algunos trabajos dividen a este estadio celular en intermedias profundas, de forma similar a las parabasales pero con un diámetro de 20 a 30  $\mu\text{m}$ , e intermedias superficiales, de forma poligonal y más grandes que las anteriores, con un diámetro celular de 30 a 60  $\mu\text{m}$  y un núcleo de 7 a 11  $\mu\text{m}$ . Por último están las células superficiales, que se subclasificaron en: células con núcleo picnótico y células anucleadas, ambas tienen un diámetro de 30 a 60  $\mu\text{m}$  y forma navicular. El núcleo picnótico de las primeras mide menos de 8  $\mu\text{m}$ . Además presentan queratina en su citoplasma (Schutte, 1967; Rosciani *et al.*, 2006; Macedo Porto *et al.*, 2007).

Cuando los niveles de estrógeno están incrementados estimulan la proliferación celular y el número de estratos del epitelio aumenta, por lo que los neutrófilos no se observan ya que no consiguen migrar hasta el lumen vaginal. Sin embargo, cuando los niveles de estrógeno caen y se incrementan los de progesterona, la pared vaginal se adelgaza y es posible observar neutrófilos (Schutte, 1967; Macedo Porto *et al.*, 2007).

En cabras Saanen, a las células observadas durante el ciclo estral se las clasificó en cinco tipos, basal, parabasal, intermedia, superficial con núcleo y superficial sin núcleo. Durante todas las fases, las células intermediarias fueron significativamente superiores a los otros tipos celulares, demostrando que la hembra está ciclando, sin embargo, otro tipo debe ser buscado para distinguir en qué fase del ciclo se encuentra (Correia *et al.*, 2010).

Macedo Porto *et al.* (2007) observaron 4 tipos de células a lo largo de las diferentes fases del ciclo estral en ovinos: células basales, parabasales, intermedias y superficiales anucleadas. Ovando *et al.* (2013) realizaron un análisis morfométrico de las células del epitelio vaginal en ovejas de pelo. Durante el estro, el diámetro promedio de las células fue de 36  $\mu\text{m}$ . En el metaestro fue de 30  $\mu\text{m}$ . En ambos periodos predominaron las células superficiales. En el diestro, el diámetro fue aún menor, predominando en esta etapa las células intermedias y parabasales.

En los últimos años se están realizando estudios de citología también en especies menos explotadas, tanto rumiantes como no. En alpacas (*Vicugna pacos*) se observaron células parabasales, intermedias pequeñas, intermedias grandes y superficiales, y observaron marcadas diferencias entre alpacas vacías y preñadas (Pacheco, 2017). En la vizcacha de llanura (*Lagostomus maximus*) también se realizó la caracterización de las células del epitelio vaginal, en este caso las células observadas se clasificaron en basales, intermedias, superficiales y escamas, los autores también observaron diferencias entre hembras vacías y preñadas, pudiendo emplearse la citología vaginal como diagnóstico de preñez (Flamini *et al.*, 2016).

### **Toma de muestra, fijación y coloración**

La toma de muestra es un procedimiento relativamente sencillo, rápido y poco invasivo. Consiste en separar los labios de la vulva e introducir un hisopo estéril aproximadamente unos 6 cm y luego realizar suaves movimientos rotatorios contra la pared vaginal. Al retirar el hisopo se lo hace rodar sobre un portaobjetos depositando el material colectado en la superficie del mismo y se fija el material inmediatamente en alcohol 96° por no menos de 5 minutos (Ola *et al.*, 2006). El paso final antes de la observación microscópica es la coloración.

La coloración es la operación por la cual los tejidos son sometidos a la acción de sustancias capaces de teñir sus componentes. Los componentes celulares básicos, como el citoplasma, reaccionan con los colorantes ácidos, como la eosina, y se tiñe en tonalidades de rosa o naranja. El núcleo celular, un componente ácido, se tiñe con colorantes básicos, como la hematoxilina, que le confiere una tonalidad púrpura-azulada (Ross y Pawlina, 2012).

El método de coloración de Papanicolaou es el más empleado en citología, también posee colorantes ácidos y básicos, que son la hematoxilina de Harris, Orange G y Eosina-Azur. Permite diferenciar las células de los diferentes estratos, ya que las células de las capas más profundas (basales y parabasales), se colorean de azul-verdoso (magenta), las intermedias de verde y las superficiales se dividen en basófilas, con una coloración azul-verdosa en su citoplasma y acidófilas, que presentan una coloración citoplasmática anaranjada (Raposo y Silva, 1999, Rosciani *et al.*, 2006).

La técnica de Hematoxilina-Eosina puede emplearse, si bien no discrimina entre las células de las diferentes capas, tiene la ventaja de una preparación más sencilla ya que emplea menor cantidad de colorantes.

Otras coloraciones que se emplean en frotis vaginales son May Grunwald-Giemsa, Wright y Shorr. La elección dependerá del objetivo de estudio y experiencia del observador (Rosciani *et al.*, 2006). Para realizar un mejor análisis microscópico es útil determinar la morfometría celular, esto se realiza actualmente mediante softwares que miden las diferentes dimensiones celulares, como ser diámetro total, diámetro del núcleo, relación núcleo-citoplasma, circunferencia, etc.

## **Sincronización de Celos**

La sincronización de estros es una biotécnica reproductiva que emplea distintas hormonas. En pequeños rumiantes, los objetivos son concentrar las pariciones en épocas deseables o inducir la actividad reproductiva en épocas de anestro (Letelier *et al.*, 2009). Dicha biotécnica consiste en el uso de métodos farmacológicos efectivos y fácilmente aplicables que permiten manipular la fisiología reproductiva de las hembras ovinas, permitiendo la implementación de programas reproductivos con el fin de optimizar la producción (Lozano-González *et al.*, 2012). Es necesario diferenciar el término sincronización del de inducción, el primero hace mención a hembras que presentan CL funcional, es decir que están ciclando, y lo que se pretende es homogeneizar lotes de hembras. El segundo término hace referencia a las hembras que están en anestro y se busca sacarlas de ese estadio fisiológico (Lozano-González *et al.*, 2012).

## **Fármacos hormonales más empleados en pequeños rumiantes**

### **Progesterona y progestágenos**

La progesterona es una hormona esteroide, producida en los ovarios, glándulas adrenales, placenta y luego de la ovulación, en el cuerpo lúteo (Lozano-Gonzales, *et al.*, 2012). De modo general, las funciones de esta hormona se pueden resumir en: preparar el útero para la implantación del embrión, permitir el mantenimiento de la preñez y estimular el instinto materno (Lozano-Gonzales *et al.*, 2012).

Durante el ciclo estral la progesterona ejerce su efecto participando en el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal. Específicamente, durante la fase luteal, momento del ciclo en el cual ella se encuentra elevada, ejerce un feedback negativo sobre el hipotálamo e hipófisis disminuyendo la frecuencia e incrementando la amplitud de los pulsos de hormona LH, suprimiendo el crecimiento del folículo mayor y bloqueando la ovulación (Boscos *et al.*, 2002; Lozano-Gonzales, 2012).

El aporte de LH es crítico para un crecimiento folicular continuo y un descenso en su disponibilidad contribuye a acelerar el recambio del folículo dominante (Savio *et al.*, 1993). Es por eso que altos niveles de progesterona inhiben el crecimiento del folículo mayor, en tanto que los bajos niveles promueven el crecimiento del mismo. Es por eso que en ovejas y cabras, los folículos que se desarrollan en las ondas de la mitad del ciclo alcanzan menor tamaño que los de la primer onda y los de la onda ovulatoria (De Castro *et al.*, 2015).

Los métodos de sincronización del estro y de la ovulación que utilizan P4 o sus análogos, los progestágenos, se basan en sus efectos durante la fase luteal del ciclo, simulando la acción de la progesterona natural producida en el CL después de la ovulación (Lozano-González *et al.*, 2012), la cual es responsable de inhibir la GnRH (Abecia *et al.*, 2012) y consecuentemente también la LH y la FSH (Aké López *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2011).

La sincronización con progesterona provoca que en el primer estro después del tratamiento se presente una menor tasa de fertilidad al promover la persistencia del folículo dominante con la consecuente ovulación de un ovocito envejecido y menos fértil (Aisen,

2004). Esto está relacionado a la cantidad de días que dure el tratamiento, desde un principio se pensó que la permanencia de la fuente exógena de la hormona debía imitar la duración de la vida media del cuerpo lúteo, sin embargo, actualmente se sabe que la curva de liberación hormonal no es la misma cuando esta proviene de fuente endógena o exógena. A su vez, los niveles de progesterona no pueden analizarse sin ser relacionados con la curva de crecimiento del folículo dominante. A raíz de los resultados observados al final de los tratamientos con P4 o sus análogos, se están estudiando protocolos más cortos, con menores dosis o dispositivos de liberación más efectivos (Abecia *et al.*, 2011).

Las vías de administración de progestágenos o progesterona son la intravaginal, implantes subcutáneos y la vía oral. Entre los métodos de aplicación intravaginal existen las esponjas de poliuretano impregnadas con progestágenos y otros dispositivos que contienen progesterona. Los progestágenos más utilizados son acetato de fluorogestona (FGA) cuya dosis va de 30 a 40 mg y acetato de medroxiprogesterona (AMP), que se emplea con una dosis de 60 mg (Córdova-Izquierdo *et al.*, 2008). Estas esponjas se insertan en el fondo de la vagina, en contacto con el cérvix (Días *et al.*, 2001). El uso de esponjas predispone a un incremento de la microbiota bacteriana, lo cual puede causar vaginitis o adherencias y generar problemas reproductivos en el rebaño (Córdova-Izquierdo *et al.*, 2008). Sin embargo, es considerado un buen método para la sincronización del estro por su bajo costo y practicidad (Lozano-Gonzales *et al.*, 2012).

Los dispositivos siliconados de uso intravaginal, como el Dispositivo de liberación interna controlada, Controlled Internal Drug Release (CIDR®) y el Dispositivo Intravaginal Caprino Ovino (DICO®), están fabricados con un elastómero de silicona inerte (Abecia *et al.*, 2012), cargado con progesterona (300 y 400 mg, respectivamente). Los mismos permiten obtener porcentajes de hembras en estro cercanos al 100% y porcentajes de preñez de alrededor del 70% (Vilariño *et al.*, 2013), además, luego de la utilización de estos dispositivos, la presentación de vaginitis e infecciones vaginales son casi inexistentes (Tondello *et al.*, 2010).

El Crestar es un dispositivo de silicona cargado de progestágeno (3 mg de norgestomet) que se implanta de manera subcutánea en la cara dorsal de la oreja, permaneciendo allí por 9 días. Este dispositivo no se recomienda, porque el estrés que se

ocasiona al momento de la retirada genera grandes pérdidas embrionarias (Córdova-Izquierdo *et al.*, 2008).

### **Gonadotrofina Coriónica Equina**

La gonadotrofina coriónica equina (eCG) es una glucoproteína con subunidades alfa y beta, similar a las de la LH y FSH, con un mayor contenido de ácido siálico, responsable de su vida media más larga. El útero equino secreta esta gonadotropina placentaria (Hafez y Hafez, 2002). Es una hormona de gran actividad biológica, empleada en especies diferentes a la yegua tiene un efecto LH y FSH, aumenta la ocurrencia y velocidad de ovulación favoreciendo que éstas se produzcan en un intervalo de tiempo más corto (Martemucci y D`Alessandro, 2010; Quintero-Elisea *et al.*, 2011). Esta hormona se usa frecuentemente en protocolos de sincronización de celos junto con esponjas o dispositivos que contengan progestágenos o progesterona respectivamente.

En general los protocolos consisten en aplicación de esponjas o dispositivos durante cierta cantidad de días y el día del retiro de éstos últimos se administra vía intramuscular una dosis de prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>), para desencadenar la luteolisis de algún posible cuerpo lúteo y una dosis de eCG. La dosis de eCG a emplear varía dependiendo de la edad del animal, de la temporada reproductiva y de la raza. La eCG debe administrarse con precaución ya que provoca el aumento de la tasa de ovulación (Abecia *et al.*, 2011). Las menores dosis son usadas en razas prolíficas puesto que su aplicación incrementa la ocurrencia de partos gemelares y esto demanda un mayor requerimiento metabólico de la oveja así como un buen desarrollo de su habilidad materna (Silva, 2012). Estudios realizados con ovejas Pelibuey en condiciones de trópico demostraron que dosis de 200 y 250 UI de eCG indujeron altos porcentajes de ovejas en estro aunque existió diferencia significativa a favor de la mayor dosis (Aké-López *et al.*, 2014).

Algunos estudios indicaron que con el uso repetido esta hormona puede disminuir la fertilidad debido al desarrollo de anticuerpos. En cabras la respuesta inmunológica a la eCG es variable entre individuos, esta variabilidad posiblemente está relacionada con el complejo mayor de histocompatibilidad (Roy *et al.*, 1999a). La presencia de anticuerpos en el suero de cabras ocasionó una menor fertilidad luego de la IA comparada con aquellas hembras que no presentaron niveles elevados de anticuerpos. Esta baja fertilidad

probablemente se deba a un retraso en la aparición de la manifestación del estro y de la oleada preovulatoria de LH.

En ovejas, la presencia de inmunoglobulinas anti eCG luego de reiteradas aplicaciones de eCG es controversial. Algunos autores informaron que repetidas dosis de eCG no indujeron la producción de anticuerpos (Gherardi y Martin, 1978) mientras que otros sí (Bodin *et al.*, 1997). Roy *et al.* (1999b) demostraron que tratamientos reiterados con eCG inducen la producción de anticuerpos pero no en todos los animales.

La respuesta a tratamientos de sincronización de celos en ovejas de pelo en condiciones de trópico es generalmente alta (Quintero-Elisea *et al.*, 2011). Evaluar cuál es la respuesta a los protocolos de sincronización en hembras de estas razas en regiones situadas a mayores latitudes, resulta de sumo interés ya que esto permitirá optimizar el uso y la dosificación de la eCG.

Los estudios que evalúan la sincronización de celos determinan la cantidad de hembras que presentan estro, a través del comportamiento de las mismas o por el porcentaje de ovulación, tasa de ovulación o número de ovulaciones (Pinna *et al.*, 2012; Dos Santos Cavalcanti *et al.*, 2012). Los resultados también pueden reflejarse por medio de porcentaje de preñez, tasa de fertilidad, tasa de prolificidad o por fecundidad (Martemucci y D Alessandro, 2010; Sandoval *et al.*, 2013). Esto debe tomarse en cuenta a la hora de interpretar y discutir los resultados.

### **Prostaglandinas**

La prostaglandina E2 en forma natural es secretada por el endometrio y su función principal es la de inducir la regresión del CL. Por ello, la administración de PGF2 $\alpha$ , ya sea natural o sintética como el cloprostenol, dinoprost y prostianol, que sea aplicada en la mitad o el final de la fase lútea (día 3 al 14) del ciclo estral, provocarán que la fase lútea se acorte, disminuyendo el riego sanguíneo al CL ocasionando así su lisis (Durán, 2008; Vilariño *et al.*, 2010). Además de predisponer a ovejas cíclicas a mostrar comportamiento sexual (Kermani *et al.*, 2012), activando los centros de comportamiento del estro (Oliveira *et al.*, 2006). La prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ) es una alternativa para la sincronización del estro y la ovulación (Uribe-Velásquez *et al.*, 2008), tiene como única limitante la



posibilidad de ser empleada únicamente en ovejas cíclicas con cuerpo lúteo funcional, en hembras que se encuentren en fase lútea temprana o fase folicular, el tratamiento no es efectivo.

La dificultad para determinar con exactitud la fase del ciclo estral de un grupo de hembras, hace necesaria la aplicación de dos dosis de PGF2 $\alpha$  con intervalos de 9 o 10 días de diferencia. En la aplicación de la segunda dosis, la mayoría de hembras estarán en la mitad de la fase lútea, por lo que el tratamiento será exitoso. La ventaja más notable en el tratamiento con prostaglandinas es la vía de administración intramuscular, lo que conlleva a una mejora en el manejo, sanidad y bienestar de las hembras ovinas (Abecia *et al.*, 2012).

### **Foliculogénesis y ondas de desarrollo**

El uso de la ecografía, como instrumento de investigación, proporcionó un cambio significativo en los conceptos vigentes sobre la fisiología ovárica y, particularmente, sobre uno de sus aspectos más importantes, la dinámica folicular (Uribe-Velásquez *et al.*, 2009).

El crecimiento folicular en ovinos y caprinos, al igual que en bovinos, se da en un patrón de ondas. Una onda folicular está definida como la emergencia y el crecimiento sincrónico de un grupo de folículos antrales (3mm) que inicialmente aumentan de tamaño durante una fase de crecimiento común y subsecuentemente se diferencia uno o dos folículos dominantes que continúan creciendo hasta alcanzar un diámetro mayor o igual a 5 mm, mientras múltiples folículos subordinados cesan el crecimiento durante una fase estática (Evans *et al.*, 2000). Normalmente existen tres ondas foliculares por ciclo, dos ondas ocurren en la fase luteal y una en la fase folicular, siendo el folículo de la última onda el que ovula (Leyva *et al.*, 1998). A su vez, los niveles séricos de P4 tienen efectos sobre la dinámica de ondas foliculares (Sirois y Fortune, 1990).

La foliculogénesis es controlada por las relaciones complejas entre los esteroides intrafoliculares, factores de crecimiento y el sistema de feedback del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Campbell *et al.*, 1995). En la mayoría de los mamíferos, el proceso de foliculogénesis involucra la formación de folículos pre-ovulatorios a partir de un pool de folículos primordiales, los cuales iniciarán su etapa de crecimiento a lo largo de la vida reproductiva.

El ovario ovino prepuber contiene 40.000 a 300.000 folículos primordiales, de los cuales algunos abandonan este estadio durante la vida fetal. El ovario de la oveja adulta posee, según la raza, entre 12.000 y 86.000 folículos primordiales, y entre 100 y 400 folículos en crecimiento en cada ciclo, siendo que solamente 10 a 40 son visibles en la superficie ovárica. Así, durante la mayor parte del ciclo estral, cada ovario en la oveja adulta contiene 10 folículos mayores a 2 mm de diámetro, de los cuales las 2/3 partes sufren atresia (Uribe Velásquez *et al.*, 2009). Del conjunto de folículos primordiales establecidos al nacimiento, gradualmente pequeños folículos inician el crecimiento. El mecanismo que controla este inicio de crecimiento folicular es desconocido, y parece involucrar una compleja interacción de factores genéticos, orgánicos y medioambientales. El proceso de crecimiento folicular es continuo e independiente de la fase del ciclo estral (Uribe Velásquez *et al.*, 2009).

Desde el punto de vista fisiológico, la primer etapa del crecimiento se presenta desde la fase de folículo primordial hasta la fase de folículo respondiendo a las gonadotropinas o folículo preantral, presentando proliferación celular en la granulosa y la aparición de receptores para la hormona folículo estimulante y LH, en la granulosa y en la teca. La segunda fase es caracterizada por la intensa proliferación y diferenciación celular y por la adquisición de la capacidad esteroidogénica, dando lugar a folículos que dependen absolutamente del aporte gonadotrófico. Esta segunda fase es también llamada de reclutamiento folicular, que permite el paso para el estadio de selección folicular, al final del cual emerge un folículo dominante con un diámetro entre 5 y 6 mm destinado a ovular. Cada una de estas etapas es caracterizada por los diversos requerimientos de FSH y LH, y consecuentemente por un índice de atresia folicular diferente, cuando el nivel gonadotrófico es insuficiente.

El proceso continuo de crecimiento y de regresión de los folículos antrales que permiten el desarrollo de un folículo preovulatorio es denominado “Dinámica folicular”, mecanismo que ocurre en dos fases, anterior y posterior a la formación del antro folicular. El patrón de crecimiento en el periodo pre-antral es poco conocido. En esta fase el desarrollo folicular es independiente de la estimulación gonadotrófica, y parece estar bajo control de hormonas y factores intraováricos (Uribe Velásquez *et al.*, 2009).

## **Progesterona y su relación con el desarrollo folicular**

Los niveles elevados de progesterona durante la fase luteal del ciclo hacen que el estradiol, secretado por los folículos, ejerza retroalimentación negativa sobre hipotálamo e hipófisis. Esta retroalimentación negativa no permite que ocurra la oleada preovulatoria de LH de manera que el folículo dominante no llega a ovular. Luego de la luteolisis los niveles de progesterona caen abruptamente, los estrógenos ejercen ahora retroalimentación positiva sobre hipotálamo e hipófisis lo que lleva a que la frecuencia en los pulsos de LH aumente cada vez más hasta que ocurre la ovulación. Este efecto de la progesterona es lo que los progestágenos imitan.

En un estudio realizado en ovejas se evaluaron los niveles séricos de P4 en el ciclo estral siguiente al tratamiento de sincronización. La progesterona se incrementó el día después de la ovulación aunque sólo lo hizo de forma significativa desde el día 2, momento en el cual se identificó por primera vez el cuerpo lúteo en muchas ovejas. Las concentraciones de P4 y el diámetro del cuerpo lúteo se incrementaron hasta el día 6 y 7 del ciclo respectivamente y permanecieron sin cambios hasta el día 10. Las concentraciones de P4 y el diámetro del CL comenzaron a disminuir el día 11, los niveles de P4 lo hicieron de forma más pronunciada que el diámetro del cuerpo lúteo. El día 14 del ciclo se identificó por última vez el cuerpo lúteo y los niveles de P4 fueron iguales a los del día 0 (Leyva *et al.*, 1998).

## **Efectos de la progesterona y progestágenos sobre el desarrollo folicular**

Cuando los folículos en crecimiento se ven expuestos a niveles elevados de P4 endógena y también a progestágenos exógenos, el tamaño del folículo dominante es menor que cuando existe una sola fuente de progesterona (cuerpo lúteo o esponja). Asimismo, el folículo dominante de la segunda onda de crecimiento, aquella que coincide con el momento en el que los niveles de progesterona son más elevados, siempre es más pequeño que el de la primera y la tercera onda (Leyva *et al.*, 1998).

Las características del folículo ovulatorio dependen entonces de la habilidad del tratamiento con progestágenos de controlar la secreción de gonadotrofinas. Se demostró en vacas y en ovejas, que en ausencia de cuerpo lúteo durante el tratamiento de sincronización

la frecuencia de pulsos de hormona luteinizante se incrementa con el correr de los días ya que la liberación del progestágeno desde la esponja disminuye con el tiempo. Este incremento en la frecuencia de pulsos de LH promueve que el crecimiento de los folículos grandes continúe. Se sugirió que una reducción en la fertilidad de ovejas que recibieron tratamiento con progestágenos por 11 días puede deberse a la ovulación de un folículo envejecido (Ungerfeld y Rubianes, 1999).

La exposición a altas concentraciones de progesterona exógena durante la fase luteal temprana suprime al folículo dominante de la primer onda y acelera la emergencia de la siguiente onda. En cambio, cuando los niveles de progesterona son bajos, el crecimiento del folículo dominante se prolonga y la emergencia de la siguiente onda se retrasa (Viñoles *et al.*, 1999; Viñoles *et al.*, 2001), resultando en un folículo de vida media prolongada con ovocito envejecido y con pocas probabilidades de ser fertilizado (Viñoles *et al.*, 2001).

La utilización de progestágenos por periodos cortos de 5 o 6 días y con la adición de una única dosis de PGF $2\alpha$  durante el anestro, pueden ser tan efectivos en inducir celo como los tratamientos largos, manteniendo buena fertilidad (Letelier *et al.*, 2009). Cuando estos protocolos se emplearon en ovejas en estación reproductiva, la sincronización de celos no fue tan buena, no obstante, la fertilidad no se modificó (Rubianes *et al.*, 1998; Ungerfeld y Rubianes, 1999). En ovejas en anestro, Knights *et al.* (2001) usaron un protocolo de corta duración más FSH, 24 hs antes de la remoción del dispositivo induciendo al estro e incrementando las tasas de preñez.

La aplicación de tratamientos cortos con P4 optimizaría el tiempo empleado para la sincronización y además, reduciría los efectos adversos que pueden presentarse en los tratamientos de larga duración como disminución en la fertilidad de la oveja y ocurrencia de adherencias del dispositivo a la mucosa vaginal por actuar como cuerpo extraño (Lozano-Gonzales *et al.*, 2012; Fernández *et al.*, 2015; Sosa *et al.*, 2016).

### **Manejo hormonal del ciclo estral ovino**

En las especies ovina y caprina, el manejo hormonal de la reproducción se emplea para sincronizar el estro, siempre que las hembras estén en actividad reproductiva, o bien

para inducir el mismo, cuando las hembras están en temporada de anestro, particularmente en aquellas razas con anestro estacional marcado.

Si bien el éxito de un programa de sincronización consiste en obtener el mayor porcentaje de hembras en celo, actualmente se conoce que el manejo hormonal debe considerar el desarrollo folicular ovárico, el que es independiente de la fase del ciclo estral (Lozano-Gonzalez, 2012).

La aplicación de hormonas exógenas para controlar el ciclo estral se basa en imitar la actividad del CL (progesterona y progestágenos), eliminar el efecto del CL través de la luteólisis (prostaglandinas) y promover la maduración folicular final y la ovulación (eCG). El objetivo es obtener el mayor porcentaje de hembras con estro fértil y altamente sincronizado. Para alcanzar este objetivo, se diseñaron programas de sincronización que combinan las diferentes hormonas que pueden emplearse, modificando los días de tratamiento y las dosis (Menchaca y Rubianes, 2016).

Los tratamientos que se basan en imitar la actividad del cuerpo lúteo a través de la introducción de dispositivos con progestágenos o progesterona se pueden clasificar actualmente en *tratamientos tradicionales* y *tratamientos cortos*. El fundamento de ambos consiste en el papel inhibitorio que tiene la progesterona producida por el cuerpo lúteo en el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal. De esta forma, los progestágenos o progesterona contenidos en el dispositivo imitan ese efecto. Al introducir una fuente exógena de la hormona todas las ovejas se sincronizan a la fase lútea del ciclo, luego de varios días se retiran los dispositivos y se desencadena una fase folicular que resultará en estro y ovulación (Ungerfeld y Rubianes, 2002, Romano, 2004).

Los tratamientos tradicionales se aplican desde hace varias décadas, aproximadamente desde la década del 60 (Menchaca y Rubianes, 2016), y se diseñaron a partir de la idea que la hembra debía estar expuesta a la progesterona por períodos prolongados, a fin de simular la vida media del CL. En este tipo de tratamientos el dispositivo permanece en la hembra por 14 a 15 días en ovejas. Con la posibilidad de aplicar una dosis de  $PGf2\alpha$  al retirar el dispositivo se logra disminuir la permanencia del mismo a 10 o 12 días. La finalidad de aplicar esta última hormona es destruir el CL en caso de que esté presente.

Con el uso de progestágenos más PGf2 $\alpha$ , la respuesta de las hembras es baja, sobre todo durante el anestro estacional, por eso al momento de retirar el dispositivo, se administra alguna hormona gonadotrófica, la más utilizada es la eCG (Menchaca y Rubianes, 2016).

Sin embargo, un tratamiento tradicional permite conseguir un alto porcentaje de hembras en celo, pero la fertilidad no es la esperada, siendo menor que en un estro espontáneo (Larson y Ball, 1992). La explicación sería que los efectos de la progesterona o progestágenos durante tantos días generan alteraciones en la dinámica folicular y en la liberación de LH y conducen a la ovulación de un ovocito envejecido (Viñoles *et al.*, 1999, Viñoles *et al.*, 2001; Abecia *et al.*, 2011). Si bien los tratamientos tradicionales se utilizaron durante muchos años y ayudaron a optimizar el manejo reproductivo, los conocimientos actuales, en gran medida gracias a la posibilidad de estudiar la dinámica folicular por ultrasonografía permiten proponer tratamientos de menor duración.

El objetivo de estos tratamientos es evitar concentraciones subluteales de progesterona por períodos prolongados y asegurar niveles adecuados que permitan la ovulación de folículos jóvenes (Menchaca y Rubianes, 2016). Estos protocolos consisten en solo 5 o 7 días de exposición a la progesterona.

De manera general, los tratamientos cortos consisten en la aplicación de esponjas o dispositivos de silicona durante 5, 6 o 7 días, el día de la remoción del dispositivo se aplica una dosis de PGf2 $\alpha$  más 200 a 400 UI de eCG. A las 48 horas se realiza el servicio natural o inseminación transcervical, en tanto que si la inseminación es intrauterina esta debe hacerse a las 54 horas (Menchaca y Rubianes, 2004).

Ungerfeld y Rubianes (1999) evaluaron la permanencia de esponjas con AMP por 6, 9 y 13 días más PGf2 $\alpha$  y eCG, con servicio natural. Los mejores resultados, considerando porcentajes de hembras en celo y de concepción fue el tratamiento de 6 días.

Por otra parte, cuando los tratamientos cortos se realizan con dispositivos de silicona, es posible reutilizarlos, dado que su material permite llevar a cabo una buena limpieza y desinfección. Esto trae como ventaja la reducción de los costos del tratamiento. Viraliño *et al.* (2013) evaluaron dispositivos intravaginales (CIDR) de 1º, 2º y 3º uso. Si bien los

niveles de progesterona sérica fueron menores en las ovejas con CIDR reutilizado, no se hallaron diferencias en el número de hembras que ovularon y aunque el porcentaje de preñez disminuyó con el tercer uso, no fue inferior al 70%.

Nuestro grupo de investigación implementó recientemente protocolos con dispositivos de silicona de segundo uso en ovejas Santa Inês y Hampshire Down, sin observar diferencias en porcentajes de ovejas en celo y de preñez (dato aún no publicados).

Es evidente que los tratamientos de sincronización con progesterona o progestágenos permitieron desde hace varios años optimizar los programas de reproducción en pequeños rumiantes. No obstante, los conocimientos adquiridos en los últimos años fueron beneficiosos para mejorar los protocolos y obtener un mayor aprovechamiento de las hormonas, del tiempo destinado a la realización de los mismos y para maximizar los resultados obtenidos.

Otra hormona utilizada en protocolos de sincronización es la prostaglandina F<sub>2α</sub>. Las limitaciones del uso de esta hormona sola son que el tratamiento debe aplicarse únicamente en hembras que se encuentren en temporada reproductiva y su eficacia dependerá del estado funcional que tenga el cuerpo lúteo, debido a que se considera que éste no es sensible a la prostaglandina en su fase de formación (Houghton *et al.*, 1995).

Los tratamientos tradicionales consisten en la administración de una dosis única de PGF<sub>2α</sub> luego de la cual un porcentaje de ovejas entre 60 a 70% manifestará celo durante los 4 o 5 días posteriores. Si bien al comparar con un programa de inseminación artificial con detección de celos (sin sincronización) este método es beneficioso porque reduce los días de observación, su aplicación no permite la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) porque el intervalo entre la aplicación de la droga y el celo es variable. Por estos motivos, su utilización no estuvo muy difundida en pequeños rumiantes (Menchaca y Rubianes, 2016).

Una posibilidad para mejorar la sincronización es administrar 2 dosis de PGF<sub>2α</sub> con un intervalo de 10 a 14 días y luego detección de celos por 4 o 5 días. El fundamento de este protocolo es que con la primera dosis todos los animales que tienen CL sensible responden y ovularan en 4 o 5 días formando un nuevo CL. Con la administración de la

segunda dosis, 10 a 14 días después, todos los animales tendrán un CL sensible, tanto los que respondieron a la primera dosis como los que no lo hicieron. De esta forma se puede obtener un 90% de hembras en celo, aunque la presentación de los mismos continúa siendo dispersa, lo que exige observación y detección de celo (Menchaca y Rubianes, 2016).

La dispersión en la presentación de celos y ovulación se debe a dos factores. Por un lado al tiempo que demore la luteólisis y por el otro al estado en que se encuentre el folículo de mayor tamaño. En el primer caso, cuanto más avanzado está el CL la luteólisis demora más tiempo (Houghton *et al.*, 1995).

En cuanto al estado de desarrollo folicular, el intervalo entre la aplicación de la hormona y el celo y ovulación dependerá del origen del folículo preovulatorio. Si la administración de la droga se realiza en el día 9 del ciclo, el folículo que ovula es el de la segunda onda folicular. Pero si se administra en el día 5 pueden ocurrir 2 fenómenos, que dependen del estado del folículo mayor. Si este se encuentra en su fase de crecimiento o estática, continúa su desarrollo y ovula. Pero si ya inició su fase de atresia, finalmente regresará y será el folículo de la siguiente onda el que ovulará. En el primer caso la ovulación ocurre a las 60 horas pos inyección y en el segundo caso ocurre a las 72 horas (Viñoles y Rubianes, 1998; Rubianes *et al.*, 2003).

Con el fin de promover y afianzar el uso de protocolos con PGf2 $\alpha$  como única droga en programas de IATF, un grupo de investigadores ha estudiado tanto la sensibilidad del CL a las prostaglandinas durante su formación así como la posibilidad de unificar el estado de desarrollo del folículo dominante en todas las hembras que serán tratadas.

En una primera instancia se administraron 160 ug de delprostenate (análogo de PGf2 $\alpha$ ) a ovejas que se encontraban en los días 1, 3 y 5 del ciclo (día 0=ovulación). Sorprendentemente, todas las ovejas que estaban en los días 3 y 5 presentaron luteólisis, la que se determinó por la caída en las concentraciones séricas de P4. Además presentaron estro y ovularon (Rubianes *et al.*, 2003). Esto, permitió, en una segunda instancia diseñar un protocolo que, con dos dosis de PGf2 $\alpha$ , permita la IATF, denominado Synchrovine ®.

La primer administración se realiza sin conocer el momento del ciclo en el que se encuentra la majada. Considerando que la primer onda de desarrollo folicular emerge casi



inmediatamente luego de la ovulación y el folículo dominante crece durante aproximadamente 5 días a partir de ese momento, si se aplica una segunda dosis de PGf2 $\alpha$  en ese período la hembra presenta un folículo dominante en fase de crecimiento que será quien ovule. Synchrovine ® propone dos inyecciones de PGf2 $\alpha$  con un intervalo de 7 días y luego IATF a las 42 horas de la segunda dosis. El protocolo se encuentra aún en fase de validación, con porcentajes de hembras en estro que alcanzaron el 92% dentro de las 72 horas de finalizado el tratamiento, incluso, el 80% de los mismos ocurrió entre las 25 y 48 horas. Sin embargo, la tasa de preñez todavía se encuentra entre el 30 y 50% (Menchaca y Rubianes, 2016).

## **HIPÓTESIS**

“Las ovejas Santa Inês, raza de origen tropical, mantienen la ciclicidad estral durante todo el año en ambientes subtropicales”.

“Protocolos de sincronización con dosis mínimas de hormonas y con menor tiempo de duración permiten la concentración de celos sin aumentar las gestaciones múltiples”.

## **OBJETIVO GENERAL**

“Evaluar características reproductivas de ovejas de raza Santa Inês, relacionadas con poliestrismo anual, y su respuesta a diferentes protocolos de sincronización”

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Caracterizar la ciclicidad de las ovejas Santa Inês a lo largo del año en un ambiente subtropical, comparándola con ovejas de raza Ideal.
- Caracterizar el ciclo del epitelio vaginal de ovejas de raza Santa Inês, mediante el estudio de la citología.
- Evaluar diferentes protocolos de sincronización de estro en ovejas Santa Inês.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abecia J.; Forcada F. y González-Bulnes A. 2011. Pharmaceutical Control of Reproduction in Sheep and Goats. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 27: 67-79.
- Abecia J.; Forcada F. y González-Bulnes A. 2012. Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Animal Reproduction Science* 130: 173-179.
- Abecia J. y Forcada F. 2017. Efectos de la nutrición sobre la reproducción en la oveja. Disponible en [https://www.researchgate.net/publication/316786002\\_Efectos\\_de\\_la\\_nutricion\\_sobre\\_la\\_reproduccion\\_en\\_la\\_oveja](https://www.researchgate.net/publication/316786002_Efectos_de_la_nutricion_sobre_la_reproduccion_en_la_oveja). Activo junio de 2019.
- Abson G.; Yáñez E.; Arbues R.; Hauff Colombet F. y Fernández J. 2013. Comportamiento materno-filial en ovejas lanadas y deslanadas. *Revista Argentina de Producción Animal, suplemento* 1(3): 149-207.
- Abson G.; Yáñez E. y Fernández J. 2014. Comportamiento Ingestivo en ovejas Santa Inês durante la lactancia. XX Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Universidad Nacional del Nordeste. Disponible en [www.unne.edu.ar/trabajando/com2014/agropecuarias.php](http://www.unne.edu.ar/trabajando/com2014/agropecuarias.php). Activo junio de 2019
- Adam C.; Findlay P. y Moore A. 1998. Effects of insulin-like growth factor-1 on luteinizing hormone secretion in sheep. *Animal Reproduction Science* 50:45-56.
- Adams V.; Goodman R.; Salm A.; Coolen I.; Karsch F. y Lehman M. 2006. Morphological plasticity in the neural circuitry responsible for seasonal breeding in the ewe. *Endocrinology* 147(10): 4843-4851.
- Aguilar G. 2009. Rol de las Tuberalinas como factores liberadores de prolactina. Tesis de Maestría en Ciencias. Escuela de Graduados de la Facultad de Medicina. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile 86 pp.
- Ahmadi M. y Nazifi S. 2006. Evaluation of reproductive status with cervical and uterine cytology in fat-tailed sheep. *Comparative Clinical Pathology* 15: 161-164.
- Aisen E. 2004. Reproducción ovina y caprina. En: Preparación de las hembras. Detección y control del estro y la ovulación. Intermédica, Buenos Aires, Argentina 216 pp.
- Aké López, J.; Heredia M.; Alfaro M.; Centurión F. y Rojas O. 2003. Efecto de la hormona en la respuesta superovulatoria y de la sincronía del estro en el porcentaje de gestación de ovejas Pelibuey. *Veterinaria México* 34 (3): 225-233.
- Aké-López J.; Centurión-Castro F.; Magaña-Monforte J. y Aké-Villanueva J. 2014. Efecto del progestágeno y de la dosis de Gonadotropina coriónica equina en la sincronización del estro y tasa de gestación en ovejas Pelibuey inseminadas por laparoscopia. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 1 (3): 261-268.

- Álvarez-Rodríguez J.; Sanz A. y Joy M. 2009. The effect of the spring management system on blood metabolites and luteal function of ewes on Mediterranean mountain areas. *Small Ruminant Research* 82(1):18-26.
- Araujo R.; Pires A.; Susin I.; Mendes C.; Rodrigues G.; Urano F.; Ribeiro M.; Oliveira C.; Viau P. y Day M. 2009. Postpartum ovarian activity of Santa Inês lactating ewes fed diets containing soybean hulls as a replacement for coastcross (*Cynodon* sp.) hay. *Small Ruminant Research* 81(2-3):126-131.
- Argiello Rueda, G. 2010. Concentraciones Séricas de progesterona en ovejas Pelibuey, suplementadas con fruto de palma. *Revista Citecsa* 1: 9-13.
- Armstrong D.; McEvoy T.; Baxter G.; Robinson J.; Hogg C.; Woad K.; Webb R. y Sinclair K. 2001. Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production In Vitro: associations with the ovarian insulin-like growth Factor System. *Biology of Reproduction* 64:1624-1632.
- Arroyo J.; Magaña-Sevilla H. y Camacho Escobar M. 2009. Regulación neuroendocrina del anestro posparto en la oveja. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 10:301-312.
- Arroyo J. 2011. Estacionalidad reproductiva de la oveja en México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 14: 829-845.
- Aubert M.; Pierroz E.; Gruaz N.; d`Alleves V.; Vuagnat B.; Pralong F.; Blum W. y Sizonenco P. 1998. Metabolic control of sexual function and growth: role of neuropeptide Y and leptin. *Molecular and Cellular Endocrinology* 140:107-113.
- Aurich J.; Dobrinski I. y Parvizi N. 1993.  $\beta$ -endorphin in sows during late pregnancy: effects of cloprostenol and oxytocin on plasma concentrations of  $\beta$ -endorphin in the jugular and uterine veins. *Endocrinology* 136: 199-206.
- Azevedo J.; Correia T.; Almeida J.; Valentim R.; Fontes P. y Mendonça A. 2003. Anestro posparto em ovelhas de diferentes raças: II- Amamentação duas vezes ao dia. *Revista de Ciências Agrárias* 26 (1): 101-106.
- Banks W. 1991. *Histologia Veterinária Aplicada*, 2 ed. Editorial Manole. São Paulo pp. 565-588.
- Barash I.; Cheung C.; Weigle D.; Hongping R.; Kabigting E.; Kuijper E.; Clifton J. y Steiner R. 1996. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology* 173:3144-3147.
- Barker-Gibb M.; Scott C.; Boublik J. y Clarke I. 1995. The role of neuropeptide Y (NPY) in the control of LH secretion in the ewe with respect to season, NPY receptor subtype and the site of action in the hypothalamus. *Journal of Endocrinology* 147: 565-679.

- Barrel, G.; Thurn L.; Brown M.; Vigué C. y Karsch F. 2000. IMportance of photoperiodic signal to entrainment of the circannual reproductive rhythm of the ewe. *Biology of Reproduction* 63: 769-774.
- Baskin D.; Breininger J. y Schwartz M. 1999. Leptin receptor mRNA identifies a subpopulation of neuropeptide Y neurons activated by fasting in rat hypothalamus. *Diabetes* 48: 828-833.
- Basu A.; Shrivastav T. y Maitra S. 2006. A direct antigen heterologous enzyme immunoassay for measuring progesterone in serum without using displacer. *Steroids* 71:222-230.
- Bocquier F.; Bonnet M.; Falconnier Y.; Guerre-Millo M.; Martin P. y Chilliard Y. 1998. Effects of photoperiod and feeding level on perirenal adipose tissue metabolic activity and leptin synthesis in the ovariectomized ewe. *Reproduction Nutrition Development* 38: 489-498.
- Bodin L.; Drion P.; Remy B.; Brice G.; Cognie´ Y. y Beckers J. 1997. Anti-PMSG antibody levels in sheep subjected annually to oestrus synchronisation. *Reproduction Nutrition Development* 37:651-660.
- Boscós C.; Samartzi F.; Dellis S.; Rogge A.; Stefanakis A. y Krambovitis E. 2002. Use of progestagen gonadotrophin treatments in estrus synchronization of sheep. *Theriogenology* 58: 1261-1272.
- Bueno M.; Da Cunha E.; Dos Santos L. y Veríssimo C. 2006. Uma boa alternativa para a produção intensiva de carne de cordeiros na região Sudeste. Disponible en: <[http://www.infobibos.com/Artigos/2006\\_2/SantaInes/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2006_2/SantaInes/index.htm)>. Activo junio 2019.
- Bustos Obregón E. y Torres-Díaz L. 2012. Reproducción Estacional en el Macho. *International Journal of Morphology* 30 (4):1266-1279.
- Calderón Castillo J. 2016. Identificación de células epiteliales vaginales dominantes en ovulación para mejorar los índices reproductivos en hembras bovinos. Trabajo Final de Graduación. Universidad Técnica de Babahoyo, Los Ríos, Ecuador 43 pp.
- Calé J. 2011. Kisspeptinas: las protagonistas del eje gonadal. *Revista SAEGRE* 18 (3): 5-12.
- Camacho-Ronquillo J.; Pró-Martínez A.; Becerril-Pérez C.; Figueroa-Sandoval B.; Martín G.; Valencia J. y Gallegos-Sánchez J. 2008. Prevention of suckling improves postpartum reproductive responses to hormone treatment in Pelibuey ewes. *Animal Reproduction Science* 107: 85-93.
- Campbell B.; Scaramuzzi R. y Webb R. 1995. Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. *Journal Reproduction Fertility* 49:335-350.

- Capwanya A.; Clegg T.; Stanley P. y Vaughan L. 2008. Comparison of the Immulite and RIA assay methods for measuring peripheral blood progesterone levels in Greyhound bitches. *Theriogenology* 70: 795-799.
- Cardinalli D. y Scacchi Bernasconi P. 2009. Ritmos Biológicos en Neuroendocrinología. *Revista SAEGRE* 16(3):5-25.
- Castillo-Maldonado P.; Vaquera-Huerta H.; Tarango-Arambula L.; Pérez-Hernández P.; Herrera-Corredor P. y Gallegos-Sánchez J. 2013. Restablecimiento de la actividad reproductiva posparto en ovejas de pelo. *Archivos de Zootecnia* 62 (239): 419-428.
- Casuso J.; Fernández J.; Yáñez E. y Flores Quintana C. 2013. Ganancia de peso hasta el destete en corderos de distintos grupos raciales. *Revista Argentina de Producción Animal, suplemento 1 (3): 45-47.*
- Catunda A.; Lima I.; Bandeira G.; Gadelha C.; Pereira E., Salmito-Banderley C.; Araújo A.; Martins G. y Campos A. 2013. Blood leptin, insulin and glucose concentrations in hair sheep raised in a tropical climate. *Small Ruminant Research* 114: 272-279.
- Chacón G.; Abecia, J.; Palacios C.; Pueyo R. y Baselga R. 2010. Determinación de progesterona mediante Quimioluminiscencia en ganado ovino. XXXV Congreso de la SEOC, Valladolid, España pp. 168-172.
- Chemineau P.; Daveau A.; Cognié Y.; Aumont G. y Chesneau D. 2004. Seasonal ovulatory activity exists in tropical Creole female goats and Black Belly ewes subjected to a temperate photoperiod. *BMC Physiology* 4:1-11.
- Coelho L.; Rodriguez P.; Nonaka K.; Sasa A.; Balieiro J.; Vicente W. y Cipolla-Neto J. 2006. Annual pattern of plasma melatonin and progesterone concentrations in hair and wool ewe lambs kept under natural photoperiod at lower latitudes in the southern hemisphere. *Journal of Pineal Research* 41:101-107.
- Córdova-Izquierdo A.; Córdova-Jiménez M.; Córdova-Jiménez C. y Guerra Liera J. 2008. Procedimientos para aumentar el potencial reproductivo en ovejas y cabras. *Revista Veterinaria* 19 (1): 67-79.
- Correia F.; Ferraz D.; Araújo S.; Marques V.; Morales T.; de Lima J.; Oliveira M.; Alves de Sousa W.; Lima J. y da Rocha J. 2010. Identificação da ciclicidade em cabras leiteiras da Raça Saanen através da citologia vaginal no Município de Venturosa. X Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, Recife, Brasil.
- Cox N.; Stuart M.; Althen T.; Nennet W. y Miller H. 1987. Enhancement of ovulation rate in gilts by increasing dietary energy and administering insulin during follicular growth. *Journal Animal Science* 64: 507-516.
- Da Silva, M. 2010. Resistência às infecções artificiais por *Haemonchus contortus* de cordeiras Santa Inês, Ile de France e de cordeiras produtos do cruzamento entre a raça Santa Inês e as raças Dorper, Ile de France, Suffolk e Texel. Tesis de Maestría. Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração

Biologia de Parasitas e Microorganismos. Instituto de Biociências de Botucatu  
Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil 97 pp.

- Dardente H.; Birnie M.; Lincoln G. y Hazlerigg D. 2008. RFamide-related peptide and its cognate receptor in the sheep: cDNA cloning, mRNA distribution in the hypothalamus and effect of photoperiod. *Journal of Neuroendocrinology* 20: 1252–1259.
- Dardene H.; Wyse C.; Birnie M.; Dupré S.; Loudon A.; Lincoln G. y Hazlerigg D. 2010. A molecular switch for photoperiod responsiveness in mammals. *Current Biology* 20 (24): 2193-2198.
- Deaver D.; Dailey R. 1982. Effects of dopamine, norepinephrine and serotonin on plasma concentrations of luteinizing hormone and prolactin in ovariectomized and anestrous ewes. *Biology of Reproduction* 27:624-632.
- De Castro T.; Menchaca A. y Rubianes E. 2015. Fisiología Reproductiva y control del desarrollo folicular en ovejas y cabras. En: *Fisiología y Tecnologías reproductivas en pequeños ruminantes*. Fundación URAUy- Instituto de reproducción animal Uruguay 90 pp.
- De Gea G. 2007. El ganado lanar en Argentina. Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Córdoba, Argentina 279 pp.
- Delavaud C.; Bocquier F.; Chilliard Y.; Keisler D.; Gertler A. y Kann G. 2000. Plasma leptin determination in ruminants: effect of nutritional status and body fatness on plasma leptin concentration assessed by a specific RIA in sheep. *Journal of Endocrinology* 165:519-526.
- Delpino A. y González Stagnaro C. 1993. Evaluación del comportamiento reproductivo en pequeños ruminantes tropicales utilizando los perfiles de progesterona. *Revista Científica. FCV-LUZ* 3 (3): 231-247.
- De la Isla Herrera G.; Ayala Burgos A.; Aké López J. y González-Bulnest A. 2010. Efecto de la condición corporal y la época del año sobre el ciclo estral, estro, desarrollo folicular y tasa ovulatoria en ovejas Pelibuey mantenidas en condiciones de trópico. *Veterinaria México* 41 (3): 167-175.
- Días F.; López-Junior E. y Villarroel A. 2001. Sincronização do estro, indução da ovulação e fertilidade de ovelhas deslanadas após tratamento hormonal com gonadotrofina coriônica equina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia* 53:618-623.
- Dos Santos Cavalcanti A.; Zandonadi Brandao F.; Garcia Nogueira L. y Ferreira da Fonseca J. 2012. Effects of GnRH administration on ovulation and fertility in ewes subjected to estrous synchronization. *Revista Brasileira de Zootecnia* 41 (6): 1412-1418.

- Downing J. y Scaramuzzi R. 1997. The effect of the infusion of insulin during the luteal phase of the estrous cycle on the ovulation rate and on plasma concentrations of LH, FSH, and glucose in ewes. *Theriogenology* 47:747-759.
- Dubocovich, M. y Markowska M. 2005. Functional MT1 and MT2 Melatonin receptors in mammals. *Endocrine* 27 (2): 101-110.
- Durán F. Manual de explotación y reproducción en ovejas y borregos. 2008. Grupo Latino Editores, Bogotá Colombia 742 pp.
- Espinoza J.; Palacios A.; Ortega R. y Guillén A. 2008. Efecto de la suplementación de grasas sobre las concentraciones séricas de progesterona, insulina, somatotrofina y algunos metabolitos de los lípidos en ovejas Pelibuey. *Archivos de Medicina Veterinaria* 40:135-140.
- Estrada K.; Clay C.; Pompolo S.; Smith J. y Clarke I. 2006. Elevated Kiss-1 expression in the arcuate nucleus prior to the cyclic preovulatory gonadotrophin-releasing hormone/lutenising hormone surge in the ewe suggests a stimulatory role for kisspeptin in oestrogen-positive Feedback. *Journal of Neuroendocrinology* 18 (10): 806-809.
- Evans A.; Duffy P.; Hynes N. y Boland M. 2000. Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. *Theriogenology* 53: 699-715.
- Facó O.; Paiva S.; Alves L.; Lôbo R. y Villela V. 2008. Raça Morada Nova: origem, características e perspectivas. Embrapa Caprinos, Sobral – CE 43 pp.
- Flamini M.; Barbeito G. y Portianski E. 2016. Características de la citología exfoliativa en hembras gestantes y no gestantes de *lagostomus maximus*. *Science Morphology* 18(1): 10-19.
- Forcada F.; Abecia J. y Sierra I. 1992. Seasonal changes in oestrus activity and ovulation rate in Rasa Aragonesa ewes maintained at two different body condition levels. *Small Ruminant Research* 8:313-324.
- Franceschini I.; Lomet D.; Cateau M.; Delsol G.; Tillet Y. y Caraty A. 2006. Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha. *Neuroscience Letters* 401 (3): 225-230.
- Freeman M.; Kanyicska B.; Lerant A. y Nagy G. 2000. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiological Reviews* 80:1523-1631.
- García Sacristán A.; Castejón Montijano F.; De la Cruz Palomino L.; González Gallego J.; Murillo M. y Salido Ruiz G. 1995. Fisiología Veterinaria. Mc Graw-Hill. Madrid, España 1074 pp.
- Gelez H. y Fabre-Nys C. 2006. Neural pathways involved in the endocrine response of anestrous ewes to the male or its odor. *Neuroscience* 140:791-800.



- Gherardi P. y Martin G. 1978. The effect of multiple injections of PMSG on the ovarian activity of Merino ewes. *Australian Society Animal Production* 12:260.
- Goffin V.; Binart N.; Touraine P. y Kelly P. 2002. Prolactin: the new biology of an old hormone. *Annual Review of Physiology* 64:47-67.
- Gómez E.; Duato L.; Domínguez G.; Doménech A.; Gómez M. y Gutiérrez B. 2011. Compendio de guiones para clases teóricas en la asignatura Inmunología en Veterinaria III: técnicas inmunológicas. *Reduca* 3:94-121.
- Goodman R.; Lehman M.; Smith J.; Coolen L.; De Oliveira C.; Jafarzadehshirazi M.; Pereira A.; Iqbal J.; Caraty A.; Ciofi P. y Clarke I. 2007. Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology* 148 (12): 5752-5760.
- Goodman R.; Jansen H.; Billings H.; Coolen L. y Lehman M. 2010. Neural systems mediating seasonal breeding in the ewe. *Journal Neuroendocrinology* 22(7): 674-681.
- Goodman R.; Maltby M.; Millar R.; Hileman S.; Nestor C.; Whited B.; Tseng A.; Coolen L. y Lehman M. 2012. Evidence that dopamine acts via kisspeptin to hold GnRH pulse frequency in check in anestrus ewes. *Endocrinology* 153 (12): 5918-5927.
- Gordon I. 1997. *Controlled Reproduction in Sheep and Goats*. CAB International. Wallingford, Reino Unido 439 pp.
- Gray C.; Stewart M.; Johnson G. y Spencer T. 2003. Postpartum uterine involution in sheep: histoarchitecture and changes in endometrial gene expression. *Reproduction* 125:185-198
- Guerrero J.; Carrillo-Vico A. y Lardone J. 2007. La Melatonina. *Investigación y Ciencia* 30-38.
- Hafez E. y Hafez B. 2002. *Reproducción e inseminación artificial en animales*. Mc Graw Hill Interamericana. México D. F 33 pp.
- Hanon E.; Lincoln G.; Fustin J.; Dardente H.; Masson-Pévet M.; Morgan P. y Hazlerigg D. 2008. Ancestral TSH Mechanism signals summer in a photoperiodic mammal. *Current Biology* 18 (15): 1147-1152.
- Hares L. y Briant M. 1982. Characteristics of oestrous cycles and plasma progesterone profiles of young female sheep during their first breeding season. *Animal Production* 35 (1):1-7.
- Hashizume T.; Ohtsuky K. y Matsumoto N. 2000. Plasma insulin-like growth factor-I concentrations increase during the estrous phase in goats. *Domestic Animal Endocrinology* 18:253-263.

- Hastie P.; Onagbesan O. y Haresign W. 2004. Co-expression of messenger ribonucleic acids encoding IGFI, IGF-II, type I and II IGF receptors and IGF-binding proteins (IGBP-1 to -6) during follicular development in the ovary of seasonally anoestrous ewes. *Animal Reproduction Science* 84:93-105.
- Hattar S.; Liao H.; Takao M.; Berson D. y Yau K. 2002. Melanopsin containing retinal ganglion cells: Architecture, Projections and Intrinsic Photosensitivity. *Science* 295:1065-1070.
- Hawken P. y Martin G. 2012. Sociosexual stimuli and gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone secretion in sheep and goats. *Domestic Animal Endocrinology* 43:85-94.
- Hayder M. y Ali A. 2008. Factors affecting the postpartum uterine involution and luteal function of sheep in the subtropics. *Small Ruminant Research* 79: 174-178.
- Hernández J.; Hallford D. y Wells N. 2003. Ovarian cyclicity in thyroid-suppressed ewes treated with propylthiouracil immediately before onset of seasonal anestrus. *Journal Animal Science* 81:29-34.
- Houghton J.; Liberati N.; Schirk F.; Townsend E.; Dailey R y Inskoop E. 1995. Day of estrous cycle affects follicular dynamics after induced luteolysis in ewes. *Journal Animal Science* 73:2094-2101.
- Horta A. y Gonçalves S. 2006. Bioestimulação pelo efeito macho na indução e sincronização da actividade ovárica em pequenos ruminates. *Anais do XVI Congresso de Zootecnia. Escuela Superior Agrária de Castelo Branco. Portugal* pp 95-108.
- I' Anson H. y Legan S. 1988. Changes in LH pulse frequency and serum progesterone concentrations during the transition to breeding season in ewes. *Journal Reproduction Fertility* 82: 341-351.
- Iwata E.; Kikusui T.; Takeuchi Y. y Mori Y. 2003. Substances derived from 4-ethyl octanoic acid account for primer pheromone activity for the "male effect" in goats. *The Journal of Veterinary Medical Science* 65:1019-1021.
- Kalra S. y Crowley W. 1984. Differential effects of pancreatic polypeptide on luteinizing hormone release in female rats. *Neuroendocrinology* 38:511-513.
- Kaminski S.; Redmer D.; Bass C.; Keisler D.; Carlson L.; Vonnahme K.; Dorsam Sh. y Grazul-Bilska A. 2015. The effects of diet and arginine treatment on serum metabolites and selected hormones during the estrous cycle in sheep. *Theriogenology* 83: 808-816.
- Kandiel M.; El-Khaiat H.; Mahmoud K. 2016. Changes in some hematobiochemical and hormonal profile in Barki sheep with various reproductive statuses. *Small Ruminant Research* 136:87-95.

- Karir T.; Samuel G.; Sivaprasad N. y Venkatesh M. 2009. Comparative evaluation of various solid phases for the development of coated tube assays for the estimation of progesterone in human serum, bovine serum and bovine milk. *Applied Radiation and Isotopes Journal* 67: 1965-1973.
- Karsch F.; Goodman R. y Legan S. 1980. Feedback basis of seasonal breeding: test of an hypothesis. *Journal Reproduction Fertility* 58:521-535.
- Kermani H.; Kohram H.; Zareh A. y Saberifar T. 2012. Ovarian response and pregnancy rate following different doses of eCG treatment in Chall ewes. *Small Ruminant Research* 102 (1): 63-67.
- Knights M.; Bridges P.; Lewis P. y Inskeep E. 2001. Short-term treatment with a controlled internal drug releasing (CIDR) device and FSH to induce fertile estrus and increase prolificacy in anestrus ewes. *Theriogenology* 55: 1181-1191.
- Knights M.; Siew N.; Ramgattie R.; Singh-Knights D. y Bourne G. 2012. Effect of time of weaning on the reproductive performance of Barbados, Black Belly ewes and lamb growth reared in the tropics. *Small Ruminant Research* 103:205-210.
- Kobayashi Y.; Jiménez F.; Ireland J. y Smith G. 2006. Evidence of a local negative role for cocaine and amphetamine regulated transcript (CART), inhibins and low molecular weight insulin like growth factor binding proteins in regulation of granulosa cell estradiol production during follicular waves in cattle. *Reproductive Biology and Endocrinology* 4:22-32.
- Kotani M.; Dethoux M.; Vandebogaerde A.; Communi D.; Vanderwinden J.; Le Poul E.; Brézillon S.; Tyldesley R.; Suarez-Huerta N.; Vandeput F.; Blanpain C.; Schiffmann S.; Vassart G. y Parmentier M. 2001. The metastasis suppressor gene *KiSS-1* encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *Journal of Biological Chemistry* 276 (37): 34631-34636.
- Lamming G. y Mann G. 1995. Control of endometrial oxytocin receptors and prostaglandin F2 $\alpha$  production in cows by progesterone and oestradiol. *Journal of Reproduction and Fertility* 103: 69-73.
- Larson L y Ball P. 1992. Regulation of estrous cycles in dairy cattle: a review. *Theriogenology* 38: 255-267.
- Lee J.; Miele M.; Hicks D.; Phillips K.; Trent J.; Weissman B. y Welch D. 1996. *Kiss-1*, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *Journal of the National Cancer Institute* 88:1731-1737.
- Lehman M.; Ladha Z.; Coolen L.; Hileman S.; Connors J. y Goodman R. 2010. Neuronal plasticity and seasonal reproduction in sheep. *European Journal of Neuroscience* 32(12): 2152-2164.
- Letelier C.; Contreras-Solís I.; García-Fernández R.; Ariznavarreta C.; Tresguerres J.; Flores J. y Gonzales-Bulnes A. 2009. Ovarian follicular dynamics and plasma steroid concentrations are not significantly different in ewes given intravaginal

- sponjes containig either 20 or 40 mg of fluorogestone acetate. *Teriogenology* 71: 676-682.
- Lewis J. y Ebling F. 2017. Tancytes as regulators of seasonal cycles in neuroendocrine function. *Frontiers in Neurology* 8:1-7.
- Leyva V.; Buckrell B. y Walton J. 1998. Regulation of follicular activity and ovulation in ewes by exogenous progestagen. *Theriogenology* 50: 395-416.
- Lima H. 2012. Avaliação do perfil de progesterona plasmático em ovinos por quimioluminescência durante a gestação. Tesis de Maestría. Universidade Estadual do norte fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Río de Janeiro, Brasil 40 pp.
- Lindsay D. 1991. Reproduction in the sheep and goat. En: *Reproduction in domestic animals*. California, Estados Unidos 294 pp.
- Lozano J.; Forcada F. y Abecia J. 1998. Opioidergic and nutritional involvement in the control of luteinizing hormone secretion of postpartum Rasa Aragonesa ewes lambing in the mid-breeding season. *Animal Reproduction Science* 52: 267-277.
- Lozano-Gonzales J.; Uribe Velázquez L. y Osorio J. 2012. Control hormonal de la reproducción en hembras ovinas (*ovis aries*). *Veterinaria y Zootecnia* 6 (2): 134-147.
- Macedo Porto R.; Vasconcelos T.; Ferreira F.; Moreira J. y Torres de Souza J. 2007. Perfil citológico vaginal de ovelhas da raça Santa Inês no acompanhamento do ciclo estral. *Medicina Veterinaria* 8 (3): 521-527.
- Magalhaes Melo G. 2014. Identificação de polimorfismos no gene MyoD1 e associação com características de desempenho e carcaça em ovinos Santa Inês. Tesis de Maestría. Universidad Federal de Bahía. Salvador Bahía, Brasil 63 pp.
- Malven P. 1995. Role of Endogenous Opioids for Regulation of the Oestrous Cycle in Sheep and Cattle. *Reproduction in Domestic Animals* 30: 183-187.
- Malven P. y Hudgens R. 1897. Naloxone reversible inhibition of luteinizing hormone in postpartum ewes: effects of suckling and season. *Journal Animal Science* 65:196-202.
- Malpaux B.; Viguie C.; Skinner D.; Thiery J.; Pelletier, J. y Chemineau, P. 1996. Seasonal breeding in sheep: Mechanism of action of melatonin. *Animal Reproduction Science* 42(1): 109-117.
- Malpaux B.; Robinson J.; Wayne N. y Karsch F. 1989. Regulation of the onset of the breeding season of the ewe: importance of long days and of an endogenous reproductive rhythm. *Journal Endocrinology* 122:269-278.

- Martemucci G y D` Alesandro A. 2010. Estrous and fertility responses of dairy ewes synchronized with combined short-term GnRH, PGF 2 $\alpha$  and estradiol benzoate treatments. *Small Ruminant Research* 93:41-47.
- Martin G.; Oldham C.; Cognié Y. y Pearce D. 1986. The physiological response of anovulatory ewes to the introduction of rams-a review. *Livestock Production Science* 15:219-247.
- Martínez V.; Flores Quintana C.; Yáñez E. y Fernández J. 2019. Evaluación del Desarrollo Ruminal de corderos lanados y corderos media sangre Santa Inês. *Revista Veterinaria*. En prensa.
- McEvoy T.; Robinson J.; Aitken R.; Findlay P.; Palmer R. y Robertson I. 2005. Dietary-induced suppression of pre-ovulatory progesterone concentrations in superovulated ewes impairs the subsequent in vivo and in vitro development of their ova. *Animal Reproduction Science* 39 (2): 89-107.
- McNeilly A. 1987. Prolactin and the control of gonadotrophin secretion. *Journal of Endocrinology* 115: 1-5.
- Menchaca A. y Rubianes E. 2004. New treatment associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reproduction, Fertility and Development* 16: 403-414.
- Menchaca A. y Rubianes E. 2016. Sincronización de la ovulación en ovejas y cabras. En: *Fisiología y Tecnologías Reproductivas en Pequeños Rumiantes*. Instituto de Reproducción Animal Uruguay. Montevideo, Uruguay pp 21-41.
- Mendoza G.; Osorio J.; Oliveira N.; Osório M.; Esteves R. y Wiengard M. 2003. Morfología, características da carcaça e componentes do peso vivo em borregos Corriedale e Ideal. *Ciencia Rural* 33(2):351-355.
- Miller D.; Bennett E.; Harrison J.; Findlay P. y Adam C. 2011. Adiposity and plane of nutrition influence reproductive neuroendocrine and appetite responses to intracerebroventricular insulin and neuropeptide-Y in sheep. *Reproduction, Fertility and Development* 23: 329-338.
- Moraes G.; Fonseca de Macedo F.; Lourenço F.; Gomes de Macedo F.; Rigolon L.; Nogueira G. y Santello G. 2013. Frequency of estrus in Santa Inês, Texel and Ile de France ewes in the northwest of Paraná State, Brazil. *Revista Brasileira de Zootecnia* 42:706-712.
- Morales C. y Rodriguez M. 2005. Hormonas tiroideas en la reproducción y en la producción lacteal del Ganado lechero: revision de literatura. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 18 (2): 136-148.
- Mortales Terán G.; Pro A.; Figueroa B.; Sánchez C. y Gallegos J. 2004. Amamantamiento continuo o restringido y su relación con la duración del anestro posparto en ovejas Pelibuey. *Agrociencia* 38 (2): 165-171.

- Morales Terán G.; Herrera-Corredor C.; Pérez-Hernández P.; Salazar-Ortiz J. y Gallegos-Sánchez J. 2011. Influencia del amamantamiento controlado y del efecto macho sobre el restablecimiento de la actividad ovárica posparto en la oveja Pelibuey. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 13:493-500.
- Morgan P. 2000. The pars tuberalis: the missing link in the photoperiodic regulation of prolactin secretion? *Journal of Neuroendocrinology* 12:287-295.
- Morgan P. y Hazlerigg D. 2008. Photoperiodic signaling through the melatonin receptor turns full circle. *Journal Neuroendocrinology* 20:820-826.
- Nett T. 1987. Function of the hypothalamic-Hypophysial axis during the postpartum period in ewes and cows. *Journal of Reproduction and Fertility* 34 (1): 201-213.
- Newton G.; Schillo K. y Edgerton L. 1988. Effects of weaning and naloxone on luteinizing hormone secretion in postpartum ewes. *Biology of Reproduction* 39:532-535.
- Nowak R.; Porter R.; Lévy F.; Orgeur P. y Schaal B. 2000. Role of mother – young interactions in the survival of offspring in domestic mammals. *Reviews Reproduction* 5: 153-163.
- Oakley A.; Clifton D. y Steiner R. 2009. Kisspeptin Signaling in the Brain. *Endocrine Reviews* 30 (6): 713-743.
- O'Callaghan D. y Boland M. 1999. Nutritional effects on embryo development and the establishment of pregnancy in ruminants. *Animal Science* 68: 299-314.
- O'Callaghan D.; Yaakub H. y Hyttel P. 2000. Spicer L, Boland M. Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone concentrations in ewes. *Journal Reproduction and Fertility* 118:303-313.
- Okamura H.; Murata K. y Sakamoto K. 2010. Male effect pheromone tickles the gonadotrophin-releasing hormone pulse generator. *Journal of Neuroendocrinology* 22:825-832.
- Ola S.; Sanni A. y Egbunike G. 2006. Exfoliative vaginal cytology during the oestrus cycle of West African Dwarf goats. *Reproduction Nutrition Development* 46: 87-95.
- Oliveira J.; Fierro S.; López V. y Gil J. 2011. Comparison of prostaglandin and progesterone based protocols for timed artificial insemination in sheep. *Theriogenology* 75: 1232-1238.
- Oliveira M.; Dias B. y Toledo D. 2006. Phisiology and reproductive management in sheep: Revision. *Revista Eletrônica Faculdade de Montes Belos* 1 (1): 79-98.
- Oliveira M.; Sousa A.; Moura A.; Vicente W.; Rodrigues L. y Araújo A. 2013. The effects of parturition season and suckling mode on the puerperium of Santa Inês ewes and on the weight gain of lambs. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia* 65 (3): 857-864.

- Osorio J.; Suárez Y. y Uribe-Velázquez L. 2014. Hormonas tiroideas en pequeños rumiantes. Artículo de Revisión y Actualización de la Literatura. Biosalud 13(1):85-95.
- Ovando N.; Orihuela A.; Flores F. y Aguirre V. 2013. Citología y análisis morfométrico de las células del epitelio vaginal durante el ciclo estral en ovejas de pelo (*Ovis aries*). International Journal Morphology 31(3): 888-893.
- Pacheco J. 2017. Caracterización de la citología exfoliativa vaginal en Alpacas (*Vicugna pacos*). Revista Investigación Veterinaria 28 (4): 886-893.
- Panda S.; Nayak S.; Compo B.; Walker J.; Hogenesch J. y Jegla T. 2005. Illumination of the melanopsin signaling pathway. Science 307:600-604.
- Parvizi N. 2000. Neuroendocrine regulation of gonadotropins in the male and the female. Animal Reproduction Science 60 (61): 31-47.
- Pedrazzini T.; Pralong F. y Grouzmann E. 2003. Neuropeptide Y: the universal soldier. Cellular and Molecular Life Sciences 60:350-377.
- Pelleymounter M.; Cullen M.; Baker M.; Hecht R.; Winters D.; Boone T. y Collins F. 1995. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob Mice. Science 269, 540-543.
- Pereira J. 2008. Melhoramento genético aplicado à produção animal. Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia. Belo Horizonte, Brasil 617 pp.
- Pinna A.; Brandao F.; Cavalcanti A.; Borges A.; Souza J. y Fonseca J. 2012. Reproductive parameters of Santa Inês ewes submitted to short-term treatment with re-used progesterone devices. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 64 (2): 333-340.
- Poindron P.; Nowak R.; Lévy F.; Porter R. y Schaal B. 1993. Development of exclusive mother-young bonding in sheep and goats. Oxford Reviews of Reproductive Biology 15:311-364.
- Porras Almeraya A.; Zarco Quintero L. y Valencia Méndez J. 2003. Estacionalidad reproductiva en ovejas. Ciencia Veterinaria 9:2-25.
- Pralong F. 2010. Insulin and NPY pathways and the control of GnRH function and puberty onset. Molecular and cellular Endocrinology 324: 82-86.
- Prevot V.; Dehouck B.; Sharif A.; Ciofi P.; Giacobini P. y Clasadonte J. 2018. The Versatile Tanycyte: A Hypothalamic Integrator of Reproduction and Energy Metabolism. Endocrine Reviews 39 (3): 333-368.
- Prieto Ocejó D. 1995. Fisiología de la lactación. En: Fisiología Veterinaria. McGraw-Hill Madris, España 893-914.

- Quesada M.; Mcmanus C. y D´Araujo Couto F. 2001. Tolerância ao Calor de Duas Raças de Ovinos Deslanados no Distrito Federal. *Revista Brasileira de Zootecnia* 30:1021-1026.
- Quintero–Elisea J.; Macías-Cruz U.; Álvarez-Valenzuela F.; Correa-Calderón A.; González-Reyna A.; Lucero-Magaña F.; Soto-Navarro S. y Avendaño-Reyes L. 2011. The effects time and dose of pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) on reproductive efficiency in hair sheep ewes. *Tropical Animal Health and Production* 43:1567-1573.
- Raposo R. y Silva L. 1999. Comparação qualitativa de diferentes técnicas de coloração para citología vaginal de cabras da raça Saanen. *Ciência Animal* 9 (2): 81:85.
- Revel F.; Saboureau M.; Pevet P.; Simoneaux V. y Mikkelsen J. 2008. RFamide-related peptide gene is a melatonin-driven photoperiodic gene. *Endocrinology* 149 (3): 902-912.
- Revel F.; Masson-Pévet M.; Pévet P.; Mikkelsen J. y Simonneaux V. 2009. Melatonin Controls Seasonal Breeding by a Network of Hypothalamic Tarjets. *Neuroendocrinology* 90:1-14.
- Rezende L. 2006. Perfil citológico vaginal e dinâmica folicular durante o ciclo estral em novhila Nelore. Tesis de Maestría. Universidade Federal de Goiás, Goiás, Brasil 47 pp.
- Roche J.; Foster D.; Karsch F.; Cook B. y Dziuk P. 1970. Levels of luteinizing hormone in sera and pituitaries of ewes during the estrous cycle and anestrous. *Endocrinology* 86: 568-572.
- Rojas R. y Rodríguez R. 1997. Tasa ovulatoria y presencia de folículos después del estro en ovejas Blackbelly. *Técnica Pecuaria en México* 35:32-38.
- Romano J. 2004. Synchronization of estrus using CIDR, FGA or MAP intravaginal pessaries during the breeding season in Nubian goats. *Small Ruminant Research* 55: 15-19.
- Romeu A.; López Villaverde V.; Monzó A.; Carmona Ruiz I. y Romeu M. 2016. Regulación de la Actividad GnRH. Los sistemas Kisseptina/GPR54 y GnIH/GPR147. *Revista Iberoamericana de Fertilidad* 33:33-41.
- Rosa H. y Bryant M. 2003. Seasonality of reproduction in sheep. *Small Ruminant Research* 48:155-171.
- Rosciani A.; Merlo W. y Macció O. 2006. Citodiagnóstico en pequeños animales. Editorial Universitaria de la Universidad Nacional del Nordeste 66 pp.
- Ross M. y Pawlina W. 2012. Sistema Endócrino. En: *Histología*. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina pp. 740-783.



- Rotta López P. 2017. Avaliação de imunoensaio multianálito para dosagem de esteroides sexuais em ruminantes. Tesis Doctoral. Universidade de Sao Paulo. Sao Paulo, Brasil 83 pp.
- Rouvière H. y Delmas A. 2005. Anatomía Humana. 4 Sistema Nervioso Central, Vías y Centros Nerviosos. ELSEVIER. Barcelona, España 408 pp.
- Roy F.; Maurel M.; ComSao Paulo, Brasil, bes M.; Vaiman V.; Cribiu E.; Latier L.; Pobel T.; Delétang F., Combarous Y. y Guillou F. 1999a. The negative effect of repeated equine chorionic gonadotrophin treatment on subsequent fertility in alpine goats is due to a humoral immune response involving the major histocompatibility complex. *Biology of Reproduction* 60:805-813.
- Roy F.; Combes B.; Vaiman D.; Cribiu E.; Pobel T.; Delétang F.; Combarous Y.; Guillou F. y Maurel M. 1999b. Humoral immune response to Equine Chorionic Gonadotrophin in ewes: Association with Major Histocompatibility Complex and interference with subsequent fertility. *Biology of Reproduction* 61: 209-218.
- Rubianes E.; Castro T. y Kmaid S. 1998. Estrus response after e short progesterone priming in seasonally anestrous goats. *Theriogenology* 49: 356-362.
- Rubianes E. Menchaca A. y Carabajal B. 2003. Response of the 1 to 5-day aged ovine corpus luteum to Prostaglandin F2 $\alpha$ . *Animal Reproduction Science* 78:47-55.
- Sandoval R.; Ruiz L.; Olivera K.; Villanueva E. y Santiani A. 2013. Evaluación reproductiva de cabras sincronizadas con dos protocolos empleando progestagenos intravaginales. *Spermova* 3(1): 101-102
- Sasa A.; Teston D.; Almeida Rodriguez P.; Coelho L. y Schalch E. 2002. Concentrações Plasmáticas de Progesterona em Borregas Lanadas e Deslanadas no Período de Abril a Novembro, no Estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Zootecnia* 31 (3): 1150-1156.
- Sasa A.; Nonaka K.; Balieiro J. y Coelho L. 2011. Progesterona plasmática de ovelhas submetidas ao efeito macho e mantidas sob diferentes condições nutricionais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 63(5):1066-1072.
- Savio J.; Thatcher W.; Badinga L.; de la Zota R. y Wolfenson D. 1993. Regulation of dominant follicle turnover during the oestrus cycle in cows. *Reproduction Fertility* 97:107-203.
- Scaramuzzi R.; Campbell B.; Downing J.; Kendall N.; Khalid M.; Muñoz-Gutiérrez M. y 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. *Reproduction Nutrition Development* 46: 339-354.
- Schirar A.; Cognié I.; Louault F.; Poulin N.; Levasseur M. y Martinet J. 1989. Resumption of oestrous behaviour and cyclic ovarian activity in suckling and non-suckling ewes. *Journal of Reproduction and Fertility* 87: 789-794.

- Schute A. 1967. Canine vaginal cytology II- Cycly changes. *Journal of Small Animal Practice* 8:307-311.
- Schwartz M.; Sipols A.; Marks J.; Sanacora G.; White J.; ScheurinkA.; Kahn S.; Baskin D.; Woods S. y Figlewicz. 1992. Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. *Endocrinology* 130:3608-3616.
- Silva B.; Castro E.; Souza C.; Paiva S.; Sartori R.; Franco M.; Azevedo H.; Silva T.; Vieira A.; Neves J. y Melo E. 2010. A new polymorphism in the Growth and Differentiation Factor 9 (GDF9) gene is associated with increased ovulation rate and prolificacy in homozygous sheep. *Animal Genetics* 42 (1):89-92
- Silva M. 2012. Uso de la combinación de melatonina y prostaglandinas para la sincronización del estro en ovejas de raza Rasa aragonesa. Tesis de Maestría en Iniciación a la Investigación en Ciencias Veterinarias. Universidad Zaragoza, España 69 pp.
- Smith J.; Acohido B.; Clifton D. y Steiner R. 2006. Kiss-1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. *Journal of Neuroendocrinology* 18:298-303.
- Smith J.; Clay C.; Caraty A. y Clarke I. 2007. Kiss-1 messenger ribonucleica cid expression in the hypothalamus of the ewe is regulated by sex steroids and season. *Endocrinology* 148 (3): 1150-1157.
- Smith J.; Coolen L.; Kriegsfeld L.; Sari I.; Jaafarzadehshirazi M.; Maltby M.; Bateman K.; Goodman R.; Tilbrook A.; Ubuka T.; Bentley G.; Clarke I. y Lehman M. 2008. Variation in Kisspeptin and RFamide-Related Peptide (RFRP) Expression and Terminal Connections to Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons in the Brain: A Novel Medium for Seasonal Breeding in the Sheep. *Endocrinology* 149 (11): 5770-5782.
- Smith J.; Roseweir A.; Millar M.; Clarke I. y Millar M. 2018. Stimulation of growth hormone by kisspeptin antagonists in ewe. *Endocrinology* 237 (2): 165-173.
- Smith M. 1978. A comparison of pituitary responsiveness to luteinizing hormone-releasing hormone during lactation and the estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 102: 114-120.
- Singh S.; Hileman S.; Connors J.; Mc Manus C.; Coolen L.; Lehman M. y Goodman R. 2009. Estradiol negative Feedback regulation by glutamatergic afferents to A15 dopaminergic neurons: variation with season. *Endocrinology* 150 (10): 4663-4671.
- Sirois J. y Fortune J. 1990. Lengthening the bovine estrus cicle with low levels of exogenous progesterone: a model for studying ovarían follicular dominance. *Endocrinology* 2: 916-925.
- Sosa C.; Abecia J.; Carriquiry M.; Forcada F.; Martin G.; Palacin I. y Meikle A. 2009. Early pregnancy alters the metabolic responses to restricted nutrition in sheep. *Domestic Animal Endocrinology* 36(1): 13-23.

- Stevenson K, y Whates D. 1996. Insulin-like growth factors and their binding proteins in the ovine oviduct during the oestrous cycle. *Journal Reproduction and Fertility* 108:31-40.
- Tamalatzí M. 2013. La citoquímica aplicada para la determinación de fases del ciclo reproductivo en perras. Trabajo final de graduación. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Torreón, Coahuila 43 pp.
- Tasat D. 1994. Regulación Hormonal del Epitelio Vaginal. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina 210 pp.
- Terrazas A.; Ferreira G.; Lévy F.; Nowak R.; Serafin N. y Orgeur P. 1999. Do ewes recognize their lambs within the first day postpartum without the help of olfactory cues? *Behavioural Processes* 47:19-29.
- Tilbrook A.; Turner M.; Ibbott M. y Clarke I. 2006. Activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis by isolation and restraint stress during lactation in ewes: effect of the presence of the lamb and suckling. *Endocrinology* 147: 3501-3509
- Toledano-Díaz A.; Alvarez M. y Toledano A. 2017. Reproduction and Brain. I Morphofunctional basis of brain control: advances and therapeutical implications. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* 83 (2): 224-240.
- Tondello L.; Dos Santos P.; Neto S.; Pereira L.; Bertolini M.; Diniz A. y Mezzalana A. 2010. Microbiological and functional evaluation of an alternative device (OB®) for estrus synchronization in ewes. *Ciencia Rural* 40 (2): 389-395.
- Toniollo G.; Monreal A.; Laura I.; Salazar W. y Delfini A. 2005. Citología vaginal em Cabras Alpinas com CIDR® e eCG. *Archivos de Zootecnia* 54 (208): 634-637.
- Torreão J.; Pimenta Filho E.; Medeiros A.; Gonzaga Neto S.; Catanho M.; Barreto L. y Silva J. 2008. Retorno da atividade cíclica reprodutiva em ovelhas da raça Morada Nova submetidas a diferentes níveis de energia metabolizável. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal* 9 (3): 621-630.
- Tsutsui K.; Saigoh E.; Ukena K.; Teranishi H.; Fujisawa Y.; Kikuchi M.; Ishii S y Sharp P. (2000). A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 275:661-667.
- Tsutsui K. 2009. A new key neurohormone controlling reproduction, gonadotropin inhibitory hormone (GnIH): Biosynthesis, mode of action and functional significance. *Progress in Neurobiology* 88: 76-88.
- Tsutsui K.; Ubuka T.; Bentley G. y Kriegsfeld L. 2013. Review: regulatory mechanisms of gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) synthesis and release in photoperiodic animals. *Frontiers in Neuroscience* 7:1-11.
- Ubuka T.; Bentley G.; Ukena K.; Wingfield J. y Tsutsui K. 2005. Melatonin induces the expression of gonadotrophin inhibitory hormone in the avian brain. *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences of the United States of America 102 (8): 3052-3057.
- Ungerfeld R. y Rubianes E. 1999. Effectiveness of short progestagen priming for the induction of fertile oestrus with eCG in ewes during late seasonal anoestrus. *Animal Science* 68:349-353.
- Ungerfeld R. y Rubianes E. 2002. Short term primings with different progestogen intravaginal devices (MAP, FGA and CIDR) for eCG-estrous induction in anestrus ewes. *Small Ruminant Research* 46:63-66.
- Ungerfeld R. 2007. Socio-sexual signalling and gonadal function: oportunities for reproductive management in domestic ruminants. *Society of Reproduction and Fertility supplement* 64:207-221.
- Uribe-Velásquez L.; Souza M. y Osorio J. 2008. Origem e características do folículo préovulatório depois de luteólise induzida em diferentes estágios da fase luteal do ciclo estral em ovelhas. *Veterinária y Zootecnia* 2 (1): 32-41.
- Uribe-Velásquez L.; Correa-Orozco A. y Osorio J. 2009. Características del crecimiento folicular ovárico durante el ciclo estral en ovejas. *Biosalud* 8: 117-131.
- Velasco H. y Gutiérrez Aguilar C. 2008. Leptina: interacción nutrición-reproducción. *Quehacer Científico en Chiapas* 1 (6): 45-52.
- Verdoljak J.; Vásquez R.; Acosta F.; Pereira M.; Casco J.; Sarco P.; González Reyna A. y Martínez González J. 2014. Evaluación productiva de corderos deslanados (Dorper) en el norte de Corrientes, Argentina. *Boletín Informativo* nº 5, año II. INTA 6 pp. Disponible en <https://inta.gob.ar>. Activo junio 2019.
- Vilariño M.; Rubianes E.; Van Lier E. y Menchaca A. 2010. Serum progesterone concentrations, follicular development and time of ovulation using a new progesterone releasing device (DICO®) in sheep. *Small Ruminant Research* 91: 219-224.
- Vilariño M.; Rubianes E. y Menchaca A. 2013. Ovarian responses and pregnancy rate with previously used intravaginal progesterone releasing devices for fixed-time artificial insemination in sheep. *Theriogenology* 79:206-210.
- Viñoles C. y Rubianes E. 1998. Origin of the preovulatory follicle after induced luteolysis during the early luteal phase in ewes. *Canadian Journal of Animal Science* 78:429-431.
- Viñoles C.; Meikle A.; Forsberg M. y Rubianes E. 1999. The effect of subluteal levels of exogenous progesterone on follicular dynamics and endocrine patterns during the early luteal fase in the ewe. *Theriogenology* 51: 1351-1361.
- Viñoles C.; Forsberg M.; Banchemo G. y Rubianes E. 2001. Effect of long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. *Theriogenology* 55:993-1004.

- Wang H.; Khoradmher A.; Jalali M.; Saied M.; Tsutsui K.; Shirazi M. y Tamadon A. 2018. The roles of RFamide-related peptides (RFRPs), mammalian gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) orthologues in female reproduction. *Iranian Journal of Basic Medical Science* 21 (12): 1210-1220.
- Weems P.; Goodman R. y Lehman M. 2015. Neural mechanisms controlling seasonal reproduction: principles derived from the sheep model and its comparison with hamsters. *Frontiers in Neuroendocrinology* 37:43-51.
- Wise M. 1990. Gonadotropin-releasing hormone secretion during the postpartum anestrous period of the ewe. *Biology of Reproduction* 43: 719-725.
- Wodzicka-Tomaszewska M.; Hutchinson J. y Bennett W. 1967. Control of the annual rhythm of breeding in ewes: effect of an equatorial daylength with reversed termal seasons. *Journal Agriculture Science* 68:61-67.
- Woods S.; Lotter E.; McKay L. y Porte D. 1979. Chronic intracerebroventricular infusión of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature* 282:503-505.
- Wright P.; Geytenbeek P.; Clarke I. y Findlay J. 1983. LH release and luteal function in postpartum acyclic ewes after the pulsatile administration of LH-RH. *Journal of Reproduction and Fertility* 67:257-262.
- Yáñez, E. y Fernández, J. 2014. Ovinos Deslanados. Producción de Carne. Material didáctico. Programa de Formación Continua para profesionales en producción animal de ruminates. INTA Mercedes 56 pp.
- Yasuo S.; Nakao N.; Ohkura S.; Iigo M.; Hagiwara S.; Goto A.; Ando H.; Yamamura T.; Watanabe M.; Watanabe T.; Oda S.; Maeda K.; Lincoln G.; Okamura H.; Ebihara S. y Yoshimura T. 2006. Long-day suppressed expression of type 2 deiodinase gene in the mediobasal hypothalamus of the Saanen goat, a shortday breeder: implication for seasonal window of thyroid hormone action on reproductive neuroendocrine axis. *Endocrinology* 147: 432-440.
- Yavas Y. y Walton J. 2000. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: a review. *Theriogenology* 54:25-55.
- Yen M. 2001. Physiological and Molecular Basis of Thyroid Hormone Action. *Physiological Reviews* 81 (3): 1097-1142.
- Zulu V.; Nakada K. y Sawamukai Y. 2002. Insulin-like growth factor-I as a possible hormonal mediator of nutritional regulation in reproduction in cattle. *The Journal of Veterinary Medical. Science* 64:657-665.

## CAPÍTULO 2

### “Determinación de la ciclicidad estral durante el año de ovejas Santa Inês e Ideal en el subtrópico argentino”

#### INTRODUCCIÓN

La estacionalidad de los ciclos sexuales femeninos, caracterizado por la existencia de un periodo de actividad sexual y otro de inactividad ovárica o anestro (Porras Almeraya *et al.*, 2003), representa una adaptación natural de los ovinos para que las épocas de parto coincidan con las épocas de mejor clima y mayor disponibilidad de forrajes para una mejor tasa de supervivencia de la descendencia (Horta y Gonçalves, 2006). Así, las hembras ovinas se vuelven sexualmente activas después del solsticio de verano, cuando los días comienzan a ser cada vez más cortos. Al contrario, la transición de días cortos a largos resulta en anestro (Yeates, 1949). Sin embargo, esta estrategia se presenta mayormente en ovinos que viven en latitudes iguales o mayores a 35°, donde los cambios ambientales son contrastantes en las diferentes estaciones del año (Lindsay, 1991). Las razas ovinas originarias de latitudes cercanas a los trópicos carecen de anestro estacional o los mismos son de menor duración (Porras Almeraya *et al.*, 2003).

Santa Inês es una raza tropical, deslanada, originaria de Brasil. Entre sus características reproductivas se puede mencionar poliestrismo anual en condiciones controladas de manejo, alta frecuencia de partos múltiples, sobre todo dobles. Las hembras con buena condición general (nutrición, sanidad) presentan partos aun con cría al pie, lo que posibilita intervalos entre partos de menor duración. Su acentuada habilidad materna favorece la supervivencia perinatal (Bueno *et al.*, 2006). Estos atributos la colocan en una posición estratégica como genética factible de ser usada en programas de mejoramiento por medio de selección o cruzamiento.

La producción ovina de la región mesopotámica utiliza frecuentemente la raza Ideal que produce lana de excelente calidad y tiene una destacada aptitud carnífera pero es poliéstrica estacional con un anestro breve (De Gea, 2007).

La obtención de un único parto en el año es el reflejo de una estación reproductiva estrecha que implica una oferta estacional de carne, leche, cuero y derivados. Esto favorece a que el consumo de carne ovina se restrinja solo a determinadas épocas del año. Por ello, resulta de sumo interés la evaluación de la actividad reproductiva de hembras ovinas de origen tropical que verifique la ausencia de estacionalidad en otros puntos geográficos, para justificar su introducción en áreas productivas de regiones subtropicales o templadas.

## **OBJETIVO**

Caracterizar la ciclicidad de las ovejas Santa Inês a lo largo del año en un ambiente subtropical, comparándola con ovejas de raza Ideal.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Lugar de Trabajo**

El trabajo se desarrolló entre los meses de marzo a diciembre durante el año 2012, en el establecimiento agropecuario Don Donato, Colonia Mota, departamento de Monte Caseros, Corrientes. Su localización es 30° 30' S y 58° 02' O, con clima subtropical húmedo y precipitaciones anuales promedio de 1100 mm.

### **Animales y Manejo de la majada**

Se utilizaron borregas sexualmente maduras no gestantes, de 18 meses de edad. Peso promedio 36 Kg, las cuales conformaron dos grupos según su raza. El grupo 1 formado por 10 ovejas Santa Inês y el grupo 2 por 10 ovejas Ideal. Todas fueron mantenidas bajo las mismas condiciones de alimentación, la que consistió en pastizal natural y agua *ad libitum*. Los primeros 20 días del ensayo, es decir durante el otoño, los animales recibieron suplementación alimentaria. La misma estuvo compuesta por maíz picado y heno de alfalfa. El manejo para llevar a cabo la suplementación fue el siguiente. Durante este período las borregas permanecían en potreros durante todo el día y al anochecer eran llevadas a un corral para pasar la noche. La suplementación se administraba en comederos, cada noche al momento de traer los animales al corral.

La sanidad de las hembras consistió en desparasitación y calendario sanitario acorde a la edad. El manejo general fue el mismo para todos los animales, ambos grupos permanecieron juntos en potreros que fueron rotando durante el año según la disponibilidad de pastos.

El PV se determinó a todas las hembras en estudio al iniciar el ensayo, a mitad del otoño, al inicio y mitad de invierno y al inicio y finales de primavera. El registro se realizó con balanza digital. La misma constó de una plataforma para colocar al animal y una jaula de metal adaptada para ovinos que se colocó arriba para minimizar la movilidad del mismo.

Se obtuvieron datos de temperatura ambiente y precipitaciones del Servicio Meteorológico Nacional.

Se tomaron muestras de sangre en cuatro períodos a lo largo del año: **marzo-abril, junio-julio, septiembre-octubre y noviembre diciembre**. En cada período se realizaron 3 extracciones de sangre cada 10 días, a 10 ovejas de cada grupo de la vena yugular y se colectaron en tubos sin anticoagulante (Delpino y Gonzalez Stagnaro, 1993). Inmediatamente se centrifugaron a 3000 rpm por 10 minutos y se conservaron a -20°C. Posteriormente las muestras se analizaron por la técnica de Radioinmunoanálisis (RIA) para conocer el nivel de progesterona (P4). Cuando los niveles de P4 fueron mayores a 0,5 ng/ml al menos una vez en la estación se consideró que esa hembra era cíclica en esa estación.

Los niveles de progesterona se determinaron en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata.

### **Diseño experimental y análisis estadístico**

Se utilizó un diseño para variables categóricas, las mismas fueron las siguientes.  
Variable de clasificación: **Raza (Santa Inês e Ideal)**.

Variable respuesta: **Estado reproductivo**. Siendo **ciclantes**, aquellas hembras que presentaron nivel de P4 mayor a 0,5 ng/ml al menos una vez en la estación, y **no ciclantes** aquellas hembras que tuvieron nivel de P4 inferior a 0,5 ng/ml. La combinación de ambas



variables fue también dividida en estratos, cada estrato correspondió a una estación del año (**otoño, invierno, primavera**). Los datos se analizaron mediante tablas de frecuencia y Prueba de Chi 2.

Para el análisis del PV se realizó un Análisis de la varianza (ANOVA), comparando entre razas, entre ovejas ciclantes y no ciclantes y entre estaciones. El grado de significancia fue de 0,05. El software utilizado para el análisis de datos fue Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2013).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las frecuencias de hembras con actividad estral cíclica, Santa Inês e Ideal en cada estación estudiada, se presentan en la Figura 2.1.

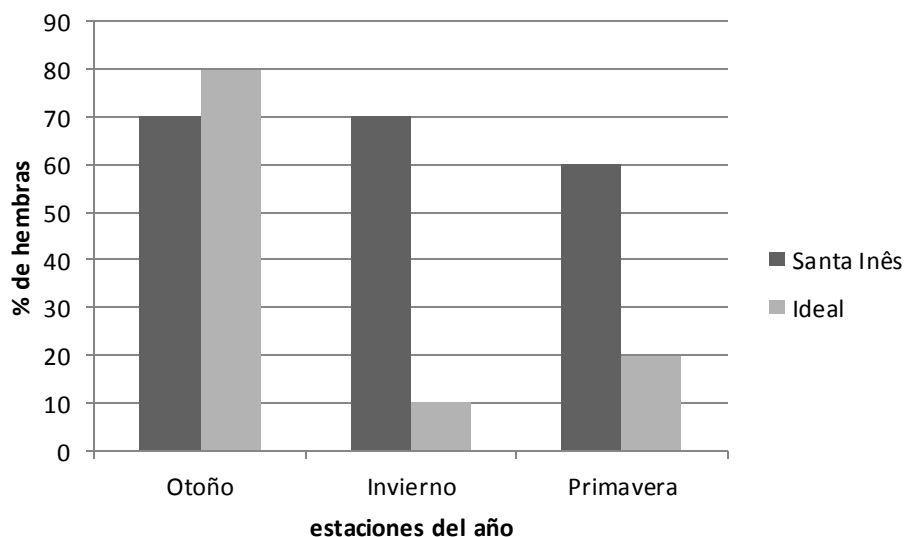


Figura 2.1. Porcentajes de ovejas Santa Inês e Ideal cíclicas durante el otoño, invierno y primavera en el subtrópico argentino.

Como lo evidencia la Figura 2.1, la presentación de ciclos estrales durante las diferentes estaciones del año fue diferente entre razas. El análisis estadístico de  $\chi^2$  tuvo un valor de  $p < 0,0001$ , lo que demuestra que hay asociación significativa entre las variables estudiadas (la variable raza tiene efecto sobre la variable estado reproductivo). El intervalo de confianza del cociente de chance no incluye al valor 1, esto significa que la chance de ciclar para las razas Santa Inês e Ideal no es la misma (Tabla 2.1).

Los resultados estadísticos corregidos por estación (estrato), indican que la diferencia fue significativa (Tabla 2.1).

En el análisis de  $\chi^2$  para cada estación se evidenció que en el otoño no existió diferencia significativa para estado reproductivo entre razas ( $p = 0,1025$ ), en tanto que para invierno y primavera los resultados del análisis permiten aceptar la existencia de asociación ( $p < 0,0001$ ) Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Resultados estadísticos de  $CHI^2$ , Intervalo de coeficiente de chance, corrección por efecto del estrato y  $CHI^2$  para cada estación estudiada en ovejas Santa Inês e Ideal en el subtrópico argentino.

	Valor del Estadístico	p-valor
<b><math>CHI^2</math></b>	54,06	<0,0001
<b>Coefficiente de chance</b>		
<b>1/2</b>	0,29 (0,21/0,4)	
<b>2/1</b>	3,45 (2,47/4,83)	
<b>Corrección por estrato</b>	60,37	<0,0001
<b><math>CHI^2</math> otoño</b>	2,67	0,1025
<b><math>CHI^2</math> invierno</b>	75	<0,0001
<b><math>CHI^2</math> primavera</b>	33,33	<0,0001

En ovejas de raza Santa Inês, existen antecedentes sobre la uniformidad en la distribución de sus ciclos estrales durante el año, a 21° de LS (Almeida *et al.*, 2007). El presente trabajo aporta un dato más en este tema ya que se hizo a mayor latitud (30° LS) y sin la presencia de machos.

Almeida *et al.* (2007) además de realizar el dosaje de P4 en sangre, observaron la presentación de celos mediante el uso de carneros vasectomizados. Este detalle no es menor, ya que la presencia del macho constituye una señal que promueve el desencadenamiento de la actividad reproductiva en las hembras (efecto macho; Arroyo *et al.*, 2007). Sasa *et al.* (2011) observaron que las ovejas de raza Santa Inês presentan buena respuesta al efecto macho, aunque las ovejas del presente ensayo estuvieron aisladas de los carneros, los niveles de P4 fueron elevados en un alto porcentaje de hembras indicando actividad ovárica. Esto permite considerar que si se sumara el efecto macho la presentación de ciclos estrales a lo largo del año podría ocurrir en un mayor porcentaje de hembras.

La caracterización de la actividad ovulatoria durante el año de ovejas de la raza tropical Pelibuey y ovejas de raza Suffolk, a 19° de LN, con dieta de alta calidad y ausencia

de carneros, mostró que el 60% de las hembras Pelibuey ovularon continuamente durante todo el estudio. Las ovejas Suffolk presentaron un anestro definido durante algunos meses de invierno y primavera en los dos años de estudio. En coincidencia con los resultados del presente estudio, la presentación de ciclos ovulatorios durante la estación reproductiva tradicional (otoño) fue semejante entre ambas razas, pero fue diferente en los meses de invierno y primavera (Arroyo *et al.*, 2007).

En otra raza ovina tropical, la Black Belly, el fotoperiodo templado simulado indujo marcada estacionalidad en la actividad ovulatoria. Llamativamente, ovejas expuestas a fotoperiodo tropical simulado, también mostraron significativa estacionalidad en la actividad ovulatoria, diferente a lo que ocurre en la raza en condiciones naturales en su región de origen (Chemineau *et al.*, 2004). Se concluyó que las señales del medio ambiente (T°, humedad y presipitaciones) actuarían en combinación con el fotoperiodo determinando la finalización o reactivación de la estación reproductiva (Chemineau *et al.*, 2004). Las ovejas del presente trabajo estuvieron en condiciones completamente naturales, de manera que todos los factores ambientales pudieron haber influido en la función reproductiva.

Chemineau *et al.* (2004), proponen dos hipótesis explicando la ausencia de estacionalidad en razas ovinas tropicales. Las hembras tropicales podrían ser insensibles al fotoperiodo, teoría que podría aplicarse a los resultados del presente trabajo, o bien la amplitud de los cambios del fotoperiodo en zonas tropicales es demasiado pequeña que los animales no son capaces de percibirla, en este caso, la respuesta debería cambiar al ubicar los animales en regiones de mayor amplitud, lo que no ocurrió en la mayoría de las ovejas Santa Inês del presente trabajo.

Por otra parte, Arroyo *et al.* (2007) describen que podrían existir 3 grupos diferentes de ovejas tropicales. Un grupo de ovejas con una alta sensibilidad a los sutiles cambios del fotoperiodo tropical, presentando un anestro estacional de un año a otro. Un segundo grupo, con una sensibilidad menor, por lo que estos animales no perciben los cambios lumínicos típicos de regiones tropicales, y continúan presentando ciclos estrales durante todo el año bajo éstas condiciones. El tercer grupo, corresponde a ovejas que serían insensibles a los cambios del fotoperiodo, por lo que presentan ciclos estrales durante todo el año, aún en latitudes altas.

En el presente estudio, el 40% de ovejas Santa Inês presentó un periodo de anestro coincidente con la época en que los días comienzan a alargarse pero, también existió alto porcentaje de hembras que continuó ciclando luego del solsticio de invierno, soportando la idea de que las ovejas tropicales tengan diferentes umbrales de sensibilidad a los cambios del fotoperiodo.

Esta “variabilidad” en la respuesta al cambio de fotoperiodo había sido observada con anterioridad, también en razas ovinas de reproducción estacional. Estudios realizados en condiciones controladas, con fotoperiodos simulados registraron variabilidad en la presentación de ciclos estrales al modificar la cantidad de horas de luz/oscuridad. Ovejas Suffolk, al ser ubicadas en fotoperiodo constante de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad presentaron ciclos ováricos irregulares, siendo que algunas ciclaron continuamente y otras tuvieron intervalos de anestro entre periodos de actividad ovulatoria, sin embargo, cuando parte de las ovejas fueron cambiadas a un fotoperiodo de 8 horas de luz y 16 de oscuridad, los ciclos estrales se volvieron regulares. Los autores sugieren que podría deberse a un fuerte componente genético en los rebaños, ya que variaciones inter e intra animal parecen ser una característica común (Jansen y Jackson, 1993). La variación genética que afecta la respuesta al fotoperiodo en razas ovinas también fue mencionada anteriormente por otros autores (Poulton y Robinson, 1987). El factor genético también podría ser la causa de la interrupción de la actividad reproductiva en un porcentaje menor de ovejas Santa Inês.

Estudios genéticos en ovejas demostraron que en el gen que codifica al receptor de melatonina existen dos sitios polimórficos que podrían asociarse a la actividad reproductiva estacional (Pelletier *et al.*, 2000, Chu *et al.*, 2006, Faigl *et al.*, 2008). En ovejas tropicales de región árida se caracterizó molecularmente el gen del receptor de melatonina. Se observó la presencia de dos sitios polimórficos asociados a la reproducción fuera de temporada (Saxena *et al.*, 2015).

Esta variabilidad inter e intra animal respondería al objetivo común de asegurar la producción de descendencia. Esto ocurriría cuando el estímulo para el cese de la actividad reproductiva no es suficiente, como es el caso de estudios controlados en los que factores como el fotoperiodo, disponibilidad de alimentos, temperatura, etc. permanecen estables y en consecuencia, los ciclos ováricos se presentan de manera asincrónica (Jansen y Jackson,

1993). Esta teoría resulta interesante y lógica, pero no puede explicar las diferentes respuestas en las ovejas del presente estudio ya que el mismo se realizó en condiciones naturales. En el presente ensayo, todos los factores capaces de influir en la presentación de ciclos ováricos estuvieron presentes, sin embargo, un alto porcentaje de hembras continuó con actividad ovárica durante las 3 estaciones evaluadas.

Otros autores proponen la existencia de un efecto enmascarador y/o amortiguador del ovario que permite que los ciclos ováricos sigan ocurriendo a pesar de las variaciones en los niveles de gonadotrofinas (Jacson *et al.*, 1990, Jansen y Jackson, 1993).

No hay dudas que en especies de reproducción estacional es el fotoperiodo quien regula estrechamente la reproducción (Revel *et al.*, 2009). También está descrito que en estas especies, las señales del medio externo se comunican con el eje hipotalámico-hipófisis –gonadal, por un camino más complejo que aquellas especies no estacionales (Revel *et al.*, 2009).

Los resultados del presente estudio demuestran que ovejas de las 2 razas evaluadas se comportaron de manera diferente frente al estímulo fotoperiódico. Esto podría deberse a que las razas ovinas de origen tropical presentan una vía de señalización diferente en el eje melatonina-hipotálamo-hipófisis-gonadal.

Mientras que hace tiempo sólo se conocía a la melatonina secretada durante las noches cada vez más largas como la responsable del incremento de la secreción de GnRH, hoy se conocen muchos mediadores que participan en el eje y que son regulados por la melatonina.

El primer mediador que podría ser responsable de la diferencia en la vía de señalización en razas tropicales es la hormona T3. La melatonina es capaz de regular la secreción de T3 en especies de reproducción estacional (Revel *et al.*, 2009).

Por otra parte, está el rol de la kisspeptina, quien estimula positivamente al eje neuroendócrino. Se observó que kisspeptina se incrementa durante la estación reproductiva, y niveles bajos se detectan en temporada de anestro. Estos cambios son influenciados por melatonina. Este mecanismo está perfectamente demostrado en ovejas de

lana con reproducción estacional pero podrían no activarse en ovejas de razas de pelo de origen tropical (Arroyo *et al.*, 2011).

Las RF amidas, RFRP1, RFRP3, tienen efectos inhibidores de la actividad reproductiva y sus niveles también son regulados por los niveles de melatonina. En ovejas la expresión de RFRP estuvo incrementada durante el anestro. Probablemente exista una regulación diferente de las RFRP 1 y 3 según se trate de especies estacionales o no estacionales (Revel *et al.*, 2009). Esta podría ser otra explicación a la diferencia en la respuesta entre las borregas Santa Inês e Ideal en el presente trabajo.

Por otra parte, la variabilidad de las hembras del presente trabajo podría no deberse a cuan sensibles sean al fotoperiodo, sino a las concentraciones de melatonina que éstas alcanzan. Se conoce que los niveles plasmáticos nocturnos de esta hormona son altamente variables entre individuos, pero altamente repetibles para un mismo individuo, especialmente en ovejas y humanos (Chemineau *et al.*, 1996). Sin embargo, en ovejas que ciclaron continuamente bajo fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, se observó que en algunas de ellas la elevación nocturna de melatonina fue pequeña mientras que en otras fue marcada (Jackson *et al.*, 1990). De acuerdo a los resultados de estos autores, parece más probable que la variabilidad en la respuesta a un fotoperiodo diferente no se debería a diferencias en la secreción de melatonina sino más a bien a variaciones en cómo se procesa la señal de la misma en el SNC (Jackson *et al.*, 1990).

En el presente trabajo el 60% de las hembras Santa Inês tuvieron niveles elevados de progesterona durante invierno y primavera, en tanto que lo opuesto ocurrió en borregas de la raza Ideal. Estos resultados son similares a los de Coelho *et al.* (2006) quienes también evaluaron los niveles de progesterona de las hembras Santa Inês, Suffolk y Romney March. Mientras que las razas Suffolk y Romney March tuvieron un patrón estacional, con niveles elevados en otoño e invierno y bajos en primavera y verano, las ovejas Santa Inês tuvieron niveles altos durante todo el año. Estos resultados coinciden parcialmente con los del presente estudio, con la diferencia que a 30° de LS no se registraron niveles elevados de progesterona en la raza Ideal en el invierno.

En ovejas Santa Inês la secreción de melatonina podría estar influenciada por la época del año, pero no así la progesterona. Coelho *et al.* (2006) observaron que ovejas

Santa Inês, Suffolk y Romney March a 21° de LS tuvieron el mismo patrón de secreción de melatonina, el que presentó mayores niveles hormonales en las horas de oscuridad durante otoño e invierno. Los autores concluyeron que, independientemente de la raza y de la latitud, la secreción de melatonina tiene un patrón estacional. En el presente trabajo no se realizó el dosaje de melatonina, pero probablemente el patrón de secreción a 30° de LS, también presente variaciones estacionales como ocurre a los 21° de LS. La secreción de progesterona no se vio afectada en ovejas Santa Inês durante la primavera.

La nutrición constituye un factor que influye fuertemente sobre la actividad reproductiva. Debido a que las variables del análisis de ciclicidad son de tipo categóricas, y el PV es una variable continua, no fue posible analizar estadísticamente si existió interacción entre ambas. De todas maneras, ambos datos se consideraron juntos (Tabla 2.2). En la Figura 2.2 se presentan las modificaciones del PV de ambas razas durante las tres estaciones estudiadas.

Tabla 2.2. Porcentajes de ciclicidad y peso vivo (PV) promedio en ovejas Santa Inês (SI) e Ideal (ID) en el subtrópico argentino.

		Otoño		Invierno		Primavera	
		Ciclicidad (%)	PV (kg)	Ciclicidad (%)	PV	Ciclicidad (%)	PV
SI	Cíclicas	70	37,13 (2,16)	70	33,2 (1,95)	60	36,81 (3,05)
	No cíclicas	30	34,9 (2,26)	30	31,97 (1,4)	40	36,36 (2,19)
ID	Cíclicas	80	36,21 (2,96)	10	31,2	20	35,11 (1,36)
	No cíclicas	20	36,5	90	33,34 (2,28)	80	36,49 (3,09)

Valores entre paréntesis indican desvío estándar.



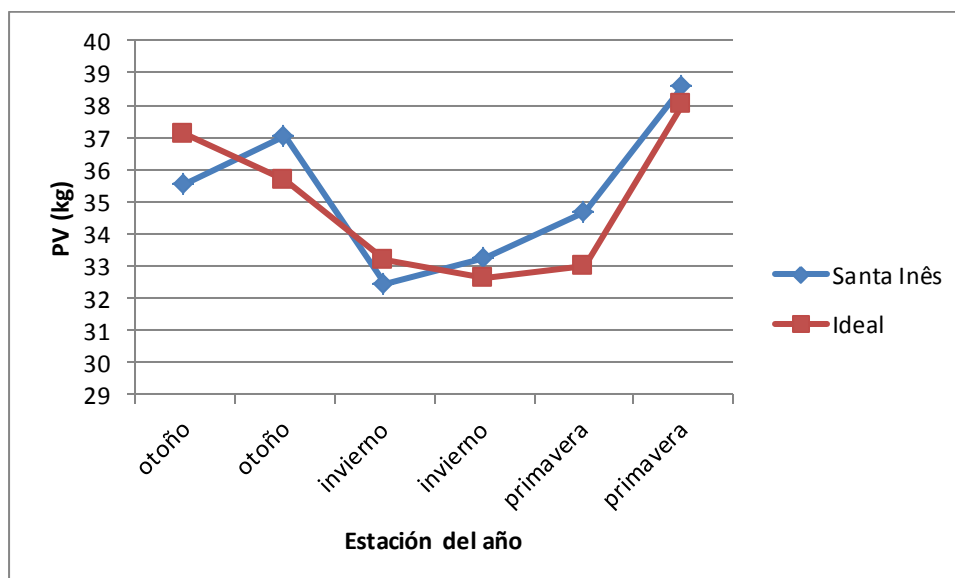


Figura 2.2. Modificaciones del PV promedio de hembras Santa Inês e Ideal durante otoño, invierno y primavera en el subtrópico argentino.

En ambas razas se observa que el descenso de peso ocurrió en el invierno. Los resultados del Análisis de la varianza para PV, tanto entre razas, entre estaciones y entre estado reproductivo no presentaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

Algunos trabajos consideran que la disminución de estros en los meses de primavera podría estar en relación con las modificaciones de temperatura y humedad (De la Isla Herrera *et al.*, 2010; González *et al.*, 1992). Conociendo que Santa Inês es una raza adaptada a vivir en regiones con temperaturas medias superiores a 18 °C, se podría esperar buena adaptación en una región subtropical a templada. El efecto de las bajas T°, a las que están menos habituadas no fue detectado en la respuesta cíclica. Los datos de T° Mínimas Medias, Precipitaciones (P) y Humedad Relativa (HR) se presentan en la Tabla 2.3.

**Tabla 2.3.** Promedios mensuales temperaturas mínimas (TM), precipitaciones (P) y humedad relativa (HR) en Monte Caseros, Corrientes, año 2012.

	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic
TM (°C)	19,9	20,9	17,8	14,3	12,9	9,7	5,9	12,6	12,7	16,1	17,9	19,6
P (mm)	26,0	201,1	61,5	95,4	39,0	25,3	11,7	109,5	76,3	342,2	29,8	296,2
HR (%)	59	68	71	76	76	78	69	75	73	81	64	74

## CONCLUSIÓN

Las ovejas de raza Santa Inês mantuvieron la capacidad de presentar ciclos estrales durante las 3 estaciones evaluadas en un ambiente subtropical.

Las ovejas de raza Ideal mostraron una marcada época de anestro. La observación de periodos de anestro en algunas hembras tropicales hace necesario seguir investigando cuales fueron las causas.

Estos resultados demuestran que la raza Santa Inês introducida en el subtrópico argentino mantiene su característica de poliestrica continua, lo que permitiría conseguir desestacionalizar la época de partos y consecuentemente la oferta de carne ovina.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Almeida Rodrigues P.; Alencar Coelho L.; Okino Nonaka K.; Sasa A.; Vicente W.; Carvalho Valieiro J. y Ramos de Siqueira, E. 2007. Annual characteristics of estrous activity in wool and hair ewe lambs under Subtropical conditions. *Scientia Agricola* 64 (5): 468-475.
- Arroyo L.; Gallegos-Sánchez J.; Villa-Godoy A.; Berruecos J.; Perera, G. y Valencia, J. 2007. Reproductive activity of Pelibuey and Suffolk ewes at 19° north latitude. *Animal Reproduction Science* 102:24-30.
- Arroyo J. 2011. Estacionalidad reproductiva de la oveja en México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 14: 829-845.
- Bueno M.; Da Cunha E; Dos Santos L. y Veríssimo C. 2006. Uma boa alternativa para a produção intensiva de carne de cordeiros na região Sudeste. Disponible en: <[http://www.infobibos.com/Artigos/2006\\_2/SantaInes/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2006_2/SantaInes/index.htm)>. Activo junio 2019.
- Chemineau P.; Beltran De Heredia I.; Daveau A. y Bodin L. 1996. High repeatability of the amplitude and duration of the nycthemeral rhythm of the plasma melatonin concentrations in the Ile de France ewes. *Journal of Pineal Research* 21:1-6.
- Chemineau P.; Daveau A.; Cognié Y.; Aumont G. y Chesneau D. 2004. Seasonal ovulatory activity exists in tropical Creole female goats and Black Belly ewes subjected to a temperate photoperiod. *BMC Physiology* 4:1-11.
- Chu M.; Cheng D.; Liu W.; Fang L. y Ye S. 2006: Association between melatonin receptor 1A gene and expression of reproductive seasonality in sheep. *Asian Australasian Journal Animal Science* 19:1079–2084.
- Coelho L.; Rodriguez P.; Nonaka K.; Sasa A.; Balieiro J.; Vicente W. y Cipolla-Neto J. 2006. Annual pattern of plasma melatonin and progesterone concentrations in hair and wool ewe lambs kept under natural photoperiod at lower latitudes in the southern hemisphere. *Journal of Pineal Research* 41:101-107.
- Delpino A. y González Stagnaro C. 1993. Evaluación del comportamiento reproductivo en pequeños rumiantes tropicales utilizando los perfiles de progesterona. *Revista Científica. FCV-LUZ* 3 (3): 231-247.
- De Gea G. 2007. El ganado lanar en Argentina. Universidad Nacional de Río Cuarto 279 pp.
- De la Isla Herrera G.; Ayala Burgos A.; Aké López J. y González-Bulnest A. 2010. Efecto de la condición corporal y la época del año sobre el ciclo estral, estro, desarrollo folicular y tasa ovulatoria en ovejas Pelibuey mantenidas en condiciones de trópico. *Veterinaria. México* 41(3): 167-175.

- Di Rienzo J.; Casanoves F.; Balzarini M.; González L.; Tablada M. y Robledo C. InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Faigl V.; Arnyasi M.; Keresztes M.; Kulcsar M.; Reiczigel J.; Danko G.; Javor A.; Cseh S. y Huszenicza G. 2008. Seasonality of reproduction and MT1 receptor gene polymorphism in Awassi sheep. *Reproduction of Domestic Animals* 43: 11.
- González A.; Murphy B.; Foote W. y Ortega E. 1992. Circannual estrous variations and ovulation rate in Pelibuey ewes. *Small Ruminant Research* 8: 225-232.
- Horta A. y Gonçalves, S. 2006. Bioestimulação pelo efeito macho na indução e sincronização da atividade ovárica em pequenos ruminantes. *Anais do XVI Congresso de Zootecnia. Escola Superior Agrária de Castelo Branco, Portugal* pp 95-108.
- Jackson G.; Jansen H. y Kao C. 1990. Continuous exposure of Suffolk ewes to an equatorial photoperiod disrupts expression of the annual breeding season. *Biology of Reproduction* 42: 63-73.
- Jansen H. y Jackson G. 1993. Circannual rhythms in the ewe: patterns of ovarian cycles and prolactin secretion under two different constant photoperiods. *Biology of Reproduction* 49: 627-634.
- Kolb E. 1987. *Fisiología Veterinaria*. Editorial Acribia, Zaragoza España. 1113 pp.
- Lindsay D. 1991. *Reproduction in the sheep and goat*. En: *Reproduction in domestic animals*. Cupps, P.T. Academic Press. California, Estados Unidos. 294 pp.
- Pelletier J.; Bodin L.; Hanocq E.; Malpoux B.; Teyssier J.; Thimonier J. y Chemineau P. 2000. Association between expression of reproductive seasonality and alleles of the gene for Mel (1a) receptor in the ewe. *Biology of Reproduction* 62:1096-1101.
- Porras Almeraya A.; Zarco Quintero L. y Valencia Méndez J. 2003. Estacionalidad reproductiva en ovejas. *Ciencia Veterinaria* 9:2-25.
- Poulton A. y Robinson T. 1987. The response of rams and ewes of three breeds to artificial photoperiod. *Journal of Reproduction and Fertility* 79: 609-626.
- Revel F.; Saboureau M.; Pevet P.; Simoneaux V. y Mikkelsen J. 2008. RFamide-related peptide gene is a melatonin-driven photoperiodic gene. *Endocrinology* 149 (3): 902-912.
- Sasa A.; Nonaka K.; Balieiro J. y Coelho L. 2011. Progesterona plasmática de ovelhas submetidas ao efeito macho e mantidas sob diferentes condições nutricionais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 63(5):1066-1072.
- Saxena V.; Jha B.; Meena A.; Narula H.; Kumar D. y Naqvi S. 2015. Assessment of Genetic Variability in the Coding Sequence of Melatonin Receptor Gene

(MTNR1A) in Tropical Arid Sheep Breeds of India. *Reproduction in Domestic Animals* 50: 517-521.

Yeates, N. 1949. The breeding season of the sheep with particular reference to its modification by artificial means using light. *Journal Agriculture Science, Cambridge* 39: 1-43.

## CAPÍTULO 3

### **Evaluación del uso de diferentes días de permanencia de esponja intravaginal y diferentes dosis de eCG en el protocolo de Sincronización de celo en ovejas Santa Inês e Ideal**

#### **INTRODUCCIÓN**

La sincronización de estros es una biotécnica reproductiva que emplea distintas hormonas. En pequeños rumiantes, los objetivos son concentrar las pariciones en épocas deseables o inducir la actividad reproductiva en épocas de anestro (Letelier *et al.*, 2009).

Los métodos más usados involucran a los progestágenos, la prostaglandina y la eCG. Las dos primeras hormonas actúan imitando o destruyendo al cuerpo lúteo, respectivamente. En tanto que la eCG, promueve el desarrollo del folículo dominante y la ovulación.

Los progestágenos se utilizan mucho en ovinos, su principal actividad es la de suprimir el estro y la ovulación a través del mecanismo de retroalimentación negativa que éstos ejercen sobre la liberación de GnRH y gonadotrofinas. Después del retiro del progestágeno, entre el 60 y 95% de las ovejas presentan estro y este aparece entre 24 a 48 horas después del retiro del tratamiento de sincronización (Cordero-Mora *et al.*, 2011).

Las vías de administración de progestágenos o progesterona son la intravaginal, implantes subcutáneos y la vía oral. Entre los métodos de aplicación intravaginal existen las esponjas de poliuretano impregnadas con progestágenos y los dispositivos que contienen progesterona. Los progestágenos más utilizados son acetato de fluorogestona cuya dosis va de 30 a 40 mg y acetato de medroxiprogesterona, que se emplea con una dosis de 60 mg (Córdova-Izquierdo *et al.*, 2008).

Estos dispositivos intravaginales se emplearon ampliamente en tratamientos largos de 12 a 14 días de permanencia de los mismos pero los resultados fueron dispares. Si bien la tasa de inducción de celos es alta, la fertilidad es muy variable, es por ello que algunos protocolos proponen mantenerla por menos días (Ungerfeld y Rubianes, 1999; Menchaca y

Rubianes, 2004; Prieto *et al.*, 2010). Es necesario aclarar que existen factores externos que pueden afectar la fertilidad de la hembra luego de estos tratamientos, como ser el manejo de la oveja, nutrición, lactación, variaciones bruscas de temperatura, cambios estacionales en la fertilidad del carnero y momento de la inseminación (Romano *et al.*, 1996), pero también la baja fertilidad podría estar relacionada con los efectos que tienen los progestágenos sobre la dinámica de crecimiento folicular.

El crecimiento folicular en ovinos y caprinos, al igual que en bovinos, se da en un patrón de ondas. Una onda folicular está definida como la emergencia y el crecimiento sincrónico de un grupo de folículos antrales (3mm), que inicialmente aumentan de tamaño durante una fase de crecimiento común y subsecuentemente se diferencia uno o dos folículos dominantes, que continúan creciendo hasta alcanzar un diámetro mayor o igual a 5 mm, mientras múltiples folículos subordinados cesan el crecimiento durante una fase estática (Evans *et al.*, 2000). Normalmente existen tres ondas foliculares por ciclo, dos ondas ocurren en la fase luteal y una en la fase folicular, siendo el folículo de la última onda el que ovula (Leyva *et al.*, 1998). A su vez, los niveles séricos de progesterona tienen efectos sobre la dinámica de ondas foliculares (Sirois y Fortune, 1990).

Los niveles elevados de progesterona durante la fase luteal del ciclo hacen que el estradiol, secretado por los folículos, ejerza una retroalimentación negativa sobre hipotálamo e hipófisis. Esta retroalimentación negativa no permite que ocurra la oleada preovulatoria de LH de manera que el folículo dominante no llega a ovular. Luego de la luteolisis los niveles de progesterona caen abruptamente, los estrógenos ejercen ahora una retroalimentación positiva sobre hipotálamo e hipófisis lo que lleva a que la frecuencia en los pulsos de LH aumente cada vez más hasta que ocurre la ovulación. Este efecto de la progesterona es lo que imitan los progestágenos.

En un estudio realizado en ovejas se evaluaron los niveles séricos de P4 en el ciclo estral siguiente al tratamiento de sincronización. La progesterona se incrementó el día siguiente a la ovulación aunque sólo lo hizo de forma significativa desde el día 2, momento en el cual también se identificó por primera vez el cuerpo lúteo en muchas ovejas. Las concentraciones de P4 y el diámetro del cuerpo lúteo se incrementaron hasta el día 6 y 7 del ciclo, respectivamente. Ambas medidas permanecieron sin cambios hasta el día 10 y el día 11 comenzaron a decrecer. La disminución en los niveles de P4 fue más pronunciada

que el diámetro del cuerpo lúteo. El día 14 del ciclo se identificó por última vez el cuerpo lúteo y los niveles de P4 fueron iguales a los del día 0 (Leyva *et al.*, 1998).

Sin embargo, de acuerdo a los trabajos que evaluaron la concentración plasmática de progesterona luego de la colocación de un dispositivo intravaginal impregnado con la hormona o un análogo, las modificaciones en los niveles de progesterona o progestágenos provenientes de dispositivos intravaginales ocurren en tiempos diferentes a aquellas que se dan desde el CL. Pinna *et al.* (2012) en ovejas Santa Inês observaron que la concentración hormonal alcanzó su pico máximo (5,7 ng/ml) a las 24 h de la inserción del dispositivo, y a partir de allí la concentración comenzó a disminuir paulatinamente. Es decir que existió un rápido incremento de la hormona que se mantuvo en niveles supraluteales hasta el día 6 y cayó a niveles subluteales el día 7.

Santos Cavalcanti *et al.* (2012) observaron una situación semejante, también en ovejas Santa Inês, empleando esponja intravaginal con 60 mg de AMP. Determinaron los niveles de progesterona el día de la colocación de la esponja, y los días cuatro, cinco, seis y siete (la esponja permaneció hasta el día seis). Los valores declinaron a menos de 1 ng/ml el día 5 post-colocación. Arroyo-Ledezma (2013) por su parte empleando 300 mg de progesterona impregnada a un dispositivo intravaginal (CIDR®) en ovejas de pelo, observaron que los niveles de P4 fueron máximos el día 1 y permanecieron elevados hasta el día cinco luego de la colocación del dispositivo. El día 6 disminuyeron a 2 ng/ml permaneciendo así hasta el día 11, cuando se extrajo el dispositivo.

Gaston-Parry *et al.* (1988) evaluaron niveles de progestágenos luego de colocar las esponjas intravaginales en ovejas lanadas y observaron que los niveles de la droga se elevan hasta 3 ng/ml a las 24 hs de insertadas las esponjas, luego descienden llegando a ser de 1,4 ng/ml al cuarto día y se mantienen en valores entre 1,3 y 1,1 ng/ml hasta el 12° día, momento en el cual se retira la esponja.

Rubianes *et al.* (1998) determinaron los niveles de P4 luego de la inserción intravaginal del dispositivo en cabras. Los niveles se elevaron a más de 7 ng/ml a las 24 hs de la inserción. El día 13 estos valores cayeron a menos de 3 ng/ml.



A partir de estos resultados se evidencia que, mientras la progesterona proveniente del CL alcanza su pico entre los días 5 o 6 luego de su formación, la progesterona que proviene de un dispositivo lo hace alrededor de las 24 horas de la colocación del mismo.

Cuando los folículos en crecimiento se ven expuestos a niveles elevados de P4 endógena y también a progestágenos exógenos el tamaño del folículo dominante es menor que cuando existe una sola fuente de progesterona (cuerpo lúteo o esponja). Asimismo, el folículo dominante de la segunda onda de crecimiento, aquella que coincide con el momento en el que los niveles de progesterona son más elevados, siempre es más pequeño que el de la primera y la tercera onda (Leyva *et al.*, 1998).

Las características del folículo ovulatorio dependen entonces de la habilidad del tratamiento con progestágenos de controlar la secreción de gonadotrofinas. Se demostró en vacas y ovejas con ausencia de cuerpo lúteo durante el tratamiento de sincronización, que la frecuencia de pulsos de hormona luteinizante se incrementa con el correr de los días ya que la liberación del progestágeno desde la esponja disminuye con el tiempo. Este incremento en la frecuencia de pulsos de LH promueve que el crecimiento de los folículos grandes continúe. Se sugirió que una reducción en la fertilidad de ovejas que recibieron tratamiento con progestágenos por 11 días, puede deberse a la ovulación de un folículo envejecido (Ungerfeld y Rubianes, 1999).

La exposición a altas concentraciones de progesterona exógena durante la fase luteal temprana suprime al folículo dominante de la primer onda y acelera la emergencia de la siguiente onda. En cambio, cuando los niveles de progesterona son bajos, el crecimiento del folículo dominante se prolonga y la emergencia de la siguiente onda se retrasa (Viñoles *et al.*, 1999; Viñoles *et al.*, 2001), resultando en un folículo de vida media prolongada con ovocito envejecido y con pocas probabilidades de ser fertilizado (Viñoles *et al.*, 2001).

Una dificultad que puede presentarse con el uso de esponjas intravaginales durante un periodo tan prolongado (12 a 14 días) es la ocurrencia de adherencias entre la esponja y la pared vaginal. Estas adherencias pueden ocurrir debido a una vaginitis leve que genera un proceso inflamatorio local, ya que la esponja actúa como cuerpo extraño (Lozano-Gonzalez *et al.*, 2012; Fernández *et al.*, 2015). No obstante, con el empleo de un

antibiótico como la oxitetraciclina y un corticoide como la hidrocortisona es posible evitar o disminuir la presentación de las mismas (Sosa *et al.*, 2016).

Los tratamientos largos se utilizaron ampliamente con buenos resultados en el porcentaje de hembras en celo. Con el uso de esponjas con 40 mg de acetato de fluorogestona por 14 días en ovejas Altamurana en primavera, se obtuvo un 93,3% de hembras en estro (Martemucci y D'Alesandro, 2010). Al comparar dos protocolos con 12 y 6 días de permanencia de la esponja con acetato de medroxiprogesterona 60 mg en ovejas durante el otoño, se observó mayor porcentaje de ovejas en estro en el primer tratamiento dentro de las 96 h de retirada—la esponja. Sin embargo, la tasa de preñez fue mayor en aquellas ovejas que recibieron esponja por 6 días (Viñoles *et al.*, 2001). Al usar dispositivos intravaginales con 0,3 gr de progesterona por 9 días en cabras Saanen se observó porcentaje de estro superior al 90% (Oliveira *et al.*, 2001), demostrando que al acortar 3 o 4 días el tratamiento de sincronización se obtuvieron buenos resultados.

Por otra parte, Letelier *et al.* (2009) utilizaron esponjas 20 y 40 mg de acetato de fluorogestona en ovejas Manchega en estación reproductiva, retirándolas el día 6 después de su inserción. Todas las ovejas ovularon luego de la remoción de la esponja y no se observaron diferencias al usar la mitad de la dosis (20 mg). Esto indica que, el hecho de que los niveles de progesterona se eleven hasta el día 5 o 6 y luego decaigan, estaría relacionado con la liberación de la hormona y/o con la absorción de la misma más que con la dosis total de la droga.

Otra hormona utilizada frecuentemente en programas de sincronización es la Gonadotrofina Coriónica Equina (eCG). El útero equino secreta esta gonadotrofina placentaria (Hafez y Hafez, 2002). Al ser empleada en especies diferentes a la yegua, tiene efecto LH y FSH, aumenta la ocurrencia y velocidad de ovulación y favorece que éstas se produzcan en un intervalo de tiempo más corto (Martemucci y D'Alesandro, 2010; Quintero-Elisea *et al.*, 2011). En general los protocolos de sincronización de celos consisten en aplicación de esponjas o dispositivos durante cierta cantidad de días, el día del retiro de éstos últimos se administra una dosis de PGF $2\alpha$  y una dosis de eCG.

La dosis de eCG que se emplea varía dependiendo de la edad del animal, de la temporada reproductiva y de la raza. La eCG debe administrarse con precaución ya que

provoca el aumento de la tasa de ovulación (Abecia *et al.*, 2011). Las menores dosis son usadas en razas prolíficas puesto que su aplicación incrementa la ocurrencia de partos gemelares y esto demanda un mayor requerimiento metabólico de la oveja así como un buen desarrollo de su habilidad materna (Silva, 2012). Estudios realizados con ovejas Pelibuey en condiciones de trópico demostraron que dosis de 200 y 250 UI de eCG indujeron altos porcentajes de ovejas en estro aunque existió diferencia significativa a favor de la mayor dosis (Aké-López *et al.*, 2014).

En el estudio de Zaiem *et al.*, (1996) donde usaron 300, 450 y 600 UI de eCG en ovejas, se observó que la prolificidad se incrementó al usar las 2 dosis más altas. Esto sugiere que, una dosis que no supere las 300 UI de eCG sería la adecuada cuando el objetivo del tratamiento sea sincronizar el momento de aparición del estro y obtener buena fertilidad, sin incrementar la cantidad de gestaciones dobles.

Por otra parte, estudios indicaron que con el uso repetido esta hormona puede disminuir la fertilidad debido al desarrollo de anticuerpos. En cabras, la respuesta inmunológica a la eCG es variable entre individuos (Roy *et al.*, 1999). En ovejas con reiteradas aplicaciones de eCG la presencia de inmunoglobulinas es controversial. La reducción al mínimo de la dosis efectiva de eCG representa una ventaja también en este punto.

La respuesta a tratamientos de sincronización de celo en ovejas de pelo en condiciones de trópico generalmente es alta (Quintero-Elisea *et al.*, 2011). La evaluación de la respuesta a los protocolos de sincronización en hembras de estas razas en regiones situadas a mayores latitudes resulta de sumo interés, ya que esto permitirá optimizar el uso y la dosificación de la eCG.

Actualmente los protocolos de sincronización utilizados en los rebaños de la región NEA, consisten en colocar esponja o dispositivo intravaginal durante 7 días y el día de la remoción del mismo se aplica una dosis de PGf<sub>2</sub> $\alpha$  más 300 o 400 UI de eCG (Verdoljak *et al.*, 2017). La efectividad de los resultados al acortar aún más los días de tratamiento resulta interesante en la práctica para optimizar el tiempo empleado para la sincronización y potencialmente conseguir mayor fertilidad. Por otra parte, con sólo 5 días de

permanencia de esponja o dispositivo podrían reducirse las complicaciones de vaginitis y adherencias.

## **OBJETIVOS**

- Evaluar el porcentaje de preñez en un protocolo de sincronización de celo con 5 o 7 días de permanencia de esponja intravaginal con AMP en ovejas Santa Inês e Ideal en el subtrópico argentino.
- Evaluar el porcentaje de celo y preñez en un protocolo de sincronización de celo con cinco días de permanencia de esponja intravaginal y 200 o 300 UI de eCG en ovejas Santa Inês en el subtrópico argentino.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Lugar de Trabajo**

El trabajo se desarrolló durante la estación reproductiva, en el mes de marzo, en el establecimiento agropecuario Don Donato, Colonia Mota, departamento de Monte Caseros, Corrientes. Su localización es 30° 30' S y 58° 02' O, con clima subtropical húmedo y precipitaciones anuales promedio de 1100 mm.

### **Animales**

Se llevaron a cabo dos ensayos, en ambos se utilizaron ovejas sexualmente maduras, no gestantes, se determinó PV y CC (escala 0 a 5; De Gea, 2007). En el primer ensayo se utilizaron 40 ovejas de la raza Santa Inês y 30 de la raza Ideal, con PV promedio de 41 Kg y CC 2,5 a 3,5. Se emplearon 4 carneros de la raza Santa Inês y 4 de la raza Ideal con edad promedio de 3 a 3,5 años, CC entre 3,5 a 4 y PV de 60 a 80 kg.

El segundo ensayo se realizó con 55 ovejas Santa Inês con PV promedio de 43 kg y CC entre 2 a 4. Para el servicio se utilizaron 5 machos Santa Inês con PV promedio de 71,5 kg.

## **Primer ensayo**

Se conformaron 2 grupos según la raza, grupo de la raza Ideal y grupo de la raza Santa Inês. Luego cada uno de ellos se dividió al azar en 2 subgrupos que recibió un tratamiento distinto, como se describe a continuación: un subgrupo recibió esponja con acetato de medroxiprogesterona por 7 días mientras que el otro recibió esponja por 5 días.

Los tratamientos quedaron conformados de la siguiente manera:

Tratamiento 1: aplicación de esponja intravaginal con Acetato de medroxiprogesterona, 60 mg (Progespon, Syntex®) durante 7 días. El día de la remoción de la misma se aplicaron 75 mcg de PGF2 $\alpha$  (Ciclase DL, Syntex ®) más 300 UI de eCG (Novormón 5000, Syntex®).

Tratamiento 2: aplicación de esponja intravaginal con Acetato de medroxiprogesterona, 60 mg (Progespon, Syntex®) durante 5 días. El día de la remoción de la misma se aplicaron 75 mcg de PGF2 $\alpha$  (Ciclase DL, Syntex ®) más 300 UI de eCG (Novormón 5000, Syntex®).

A las 24 horas de finalizado el tratamiento se introdujeron los carneros para servicio natural. El servicio se organizó en diferentes corrales, de manera que los carneros Ideal sirvan a las hembras Ideal y los carneros Santa Inês a las hembras Santa Inês. En cada raza, 2 carneros se destinaron al subgrupo de 5 días de permanencia de la esponja intravaginal y los otros 2 carneros al subgrupo de 7 días de permanencia.

Treinta días después del servicio se realizó ecografía transrectal para detección de preñez. El equipo utilizado para el examen ultrasonográfico fue un ecógrafo Mindray DP30, con transductor lineal y un adaptador para la sonda. La frecuencia se reguló entre 7 y 8 MHz.

## **Diseño experimental y análisis estadístico**

Se utilizó un diseño para variables categóricas. Los tratamientos fueron los días de permanencia de la esponja intravaginal. Cinco y siete días de permanencia, con 35 repeticiones cada uno (20 ovejas Santa Inês y 15 Ideal).

La variable respuesta fue estado reproductivo (**gestante- no gestante**). Además se realizó la estratificación y cada estrato correspondió a una raza (Santa Inês e Ideal). Los datos se analizaron mediante tablas de frecuencia y Prueba de Chi<sup>2</sup> ( $p < 0,05$ ). El programa utilizado fue Infostat, (Di Rienzo *et al.*, 2013).

## **Segundo ensayo**

En este caso se utilizaron 55 ovejas de la raza Santa Inês, el esquema de sincronización de celo fue el siguiente:

El día 0 se colocó a todas las hembras esponja intravaginal con Acetato de medroxiprogesterona, 60 mg (Progespon, Syntex®). El día 5 se retiró la esponja y se aplicaron 75 mcg de PGF<sub>2</sub> $\alpha$  (Ciclase DL, Syntex ®).

Luego, las ovejas se dividieron al azar en 2 tratamientos: El T1 (n=27) recibió 200 UI de eCG (Novormón 5000, Syntex®), por vía intramuscular y T2 (n=28) recibió 300 UI de eCG por la misma vía. El día 5 por la tarde se colocaron las ovejas de ambos tratamientos con los carneros.

El servicio se organizó en dos potreros contiguos. Las ovejas del T1 se ubicaron juntas con 2 machos y las ovejas del T2 en el potrero contiguo, con 3 machos. Para identificar a las ovejas de cada tratamiento se utilizó pintura para detección de celo (Celotest®) en la región de la grupa, de dos colores diferentes según tratamiento. A los carneros se les colocó ferrite de color amarillo por delante del prepucio a fin de que éstos marquen a las hembras al montarlas. Los animales permanecieron en los potreros durante el día y se traían a un corral cercano para pasar la noche. En la mañana siguiente, a las 7:00 horas eran llevados nuevamente a los potreros.

## **Observación del servicio para detección de ovejas en celo**

Para el servicio se colocaron a las ovejas y carneros en piquetes de 4 ha, apropiados para realizar una fácil observación de los animales, incluso a distancias considerables. Existió un sector de aproximadamente  $\frac{1}{4}$  del área total del piquete que contó con la presencia de abundantes árboles en tanto que el espacio restante presentó pastos que no superaban los 30 cm de altura. .

La observación del servicio para detectar hembras en celo se inició 24 horas después de finalizado el tratamiento de sincronización, es decir el día 6 por la mañana y finalizó a las 82 horas del mismo, es decir el día 8. El tipo de observación fue continuo durante el día, interrumpiéndose en las horas de la noche. Desde el día seis del inicio de la sincronización se comenzó la observación cada día a las siete de la mañana y se finalizó a las 19 hs. La observación se realizó recorriendo los piquetes de manera lenta y cuidadosa a fin de interferir lo menos posible en el comportamiento de los animales. Siempre que fue necesaria una mayor aproximación a los mismos, como en el caso de las zonas con presencia de árboles, se pudo realizar con normalidad debido al acostumbramiento de los animales a la presencia de humanos. Se utilizaron planillas en la cuales se registró que señal de celo fue observada, el día y la hora en la que se observó.

La hembra se consideró en celo cuando aceptó la cópula del carnero o presentó algún comportamiento que indique celo, como buscar la compañía del carnero o quedarse quieta junto él (Fraser, 1980). O bien, presencia de ferrite en la zona de la grupa o pérdida del color de la pintura (Celotest®) de la grupa, ambas se consideraron como señal de que la hembra recibió la cópula.

Al momento de observar una o más de estas tres variables se anotó en planillas la caravana de la oveja, la fecha y la hora. A partir de los datos obtenidos durante la observación del servicio se determinó:

Intervalo al celo: horas transcurridas desde la finalización del tratamiento de sincronización hasta la observación de síntomas de celo.

Frecuencia de hembras en celo: los porcentajes de hembras en celo en cada intervalo de tiempo. Éste resultó de dividir el tiempo total de observación en periodos de 12 h, de la

siguiente manera: Entre 24 y 36 h; entre 36 y 48 h; entre 48 y 60 h; entre 60 y 72 h y entre 72 y 82 h.

Una vez que las ovejas se encontraban en el corral para pasar la noche y en la mañana antes de soltarlas a los potreros, se realizaba una observación a todas las hembras para ver ferrite en la grupa o Celotest® despintado. De registrarse algunos de estos eventos se consideró que la hembra estaba en celo. Para el cálculo de *intervalo al celo* de esas hembras, se registró la hora en que se observó, aunque el evento pudo ocurrir unas horas antes. Para el cálculo de *frecuencia de hembras en celo* se incluyó la oveja en el intervalo de 12 horas que finalizaba en ese momento.

A los 7 y 30 días del servicio se realizaron ecografías para observar cuerpo lúteo y diagnosticar preñez respectivamente.

### **Diseño Experimental y Análisis Estadístico**

Se utilizó un diseño en el que los tratamientos fueron las diferentes dosis de gonadotrofina coriónica equina. T1 con 200 UI de eCG, con 27 repeticiones y T2 con 300 UI de eCG, con 28 repeticiones. Las variables respuesta fueron del tipo continuas, cantidad de horas transcurridas desde la finalización del tratamiento hasta el celo. Y categóricas, porcentaje de celo y de hembras preñadas. Los resultados se analizaron estadísticamente por medio de Tablas de Frecuencia y  $\chi^2$  para hembras en celo y preñadas y Análisis de la Varianza para intervalo sincronización-celo ( $p < 0,05$ ). El programa utilizado fue Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2013).



## RESULTADOS

La proporción de hembras preñadas y vacías en cada tratamiento de sincronización se presentan en la Figura 3.1.

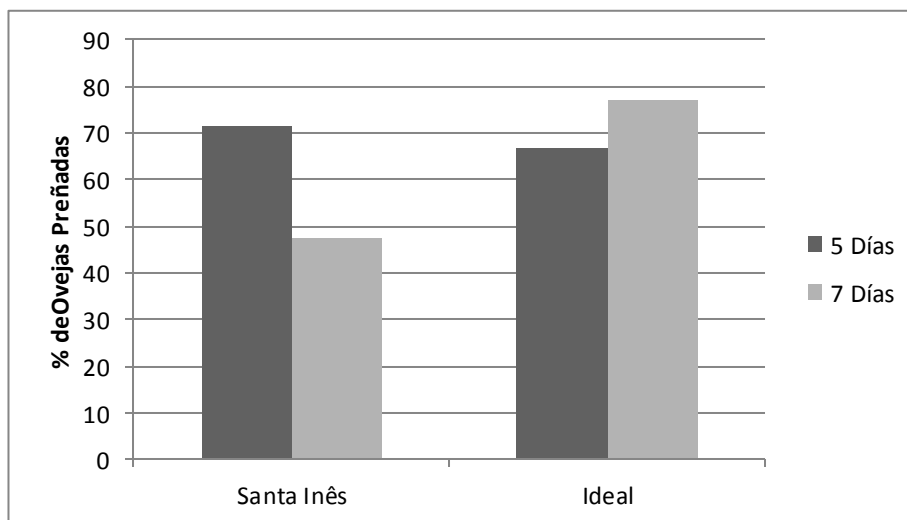


Figura. 3.1. Porcentajes de preñez en ovejas Santa Inês e Ideal, sincronizadas con 5 o 7 días de permanencia de esponja intravaginal en el subtropico argentino.

El análisis de  $\chi^2$  tuvo un p valor de  $<0,0001$ , lo que refleja la asociación significativa entre las variables, el tratamiento tuvo efecto sobre la frecuencia de hembras preñadas.

Al corregir el análisis por efecto de la raza (estrato) no se observó asociación significativa ( $P>0,05$ ) indicando que los tratamientos no afectaron de la misma manera a ambas razas. En el análisis de  $\chi^2$  considerando las razas por separado, se observa que existió asociación significativa en la raza Santa Inês (p valor 0,027) mientras que en la raza Ideal no ocurrió lo mismo (p valor 0,38). Los resultados del análisis estadístico se presentan en la tabla 3.1.

Tabla 3.1. Resultados estadísticos de CHI<sup>2</sup> y corrección por efecto del estrato, para la variable preñez, en ovejas Santa Inês e Ideal, con diferentes días de permanencia de la esponja intravaginal en el protocolo de sincronización, en el subtrópico argentino.

	Valor del Estadístico	p-valor
Chi <sup>2</sup>	23,45	<0,0001
Corrección por efecto del estrato		>0,9999
Chi <sup>2</sup> Santa Inês	4,87	0,027
Chi <sup>2</sup> Ideal	0,74	0,388

En la evaluación de diferentes dosis de eCG a ovejas Santa Inês, durante el periodo observado, 76,36 % de las ovejas tratadas presentaron celo, 85,2% en el T1 y 67,85% en el T2. No obstante, el análisis estadístico no arrojó diferencia significativa ( $p > 0,05$ ). Los resultados se presentan en la Tabla 3.2. El intervalo al celo si fue diferente entre tratamientos ( $p < 0,05$ ) Tabla 3.3.

Tabla 3.2. Porcentaje de ovejas en celo y prueba de Chi<sup>2</sup> en tratamientos de sincronización con 200 y 300 UI de eCG en ovejas Santa Inês en el subtrópico argentino.

Tratamientos	n	Ovejas en celo (%)	Valor Chi <sup>2</sup>	p-valor
200 UI de eCG	27	85,2 (23/27)	1,96	0,1612
300 UI de eCG	28	67,85 (19/28)		

eCG: gonadotropina coriónica equina.

Tabla 3.3. Promedio y DS del intervalo al celo (h) en tratamientos de sincronización con 200 y 300 UI de eCG en ovejas Santa Inês en el subtrópico argentino.

Tratamientos	n	Intervalo al celo (horas)	p-valor
200 UI de eCG	27	53,46 (11,35)	0,0114
300 UI de eCG	28	42,84 (12,12)	

En la Figura 3.2 se presentan los porcentajes de ovejas en celo distribuidos en intervalos de 12 horas cada uno. Se observa que en el tratamiento con 300 UI de eCG la mayor concentración de hembras en celo ocurrió entre las 24 y 36 horas de finalizado el tratamiento y en los intervalos siguientes el porcentaje disminuyó progresivamente. Sin embargo, al usar 200 UI de eCG la concentración de celos ocurrió entre las 48 y 60 horas de finalizado el tratamiento, con un valor superior a 55%. En ninguno de los 2 tratamientos se observaron hembras en celo entre las 60 y 72 horas, en tanto que en el intervalo final (72-82 horas) el porcentaje de ovejas en celo no superó el 10%.

La distribución en la presentación de celos fue diferente entre ambos tratamientos y esta información resulta de interés sobre todo si se va a realizar inseminación artificial.

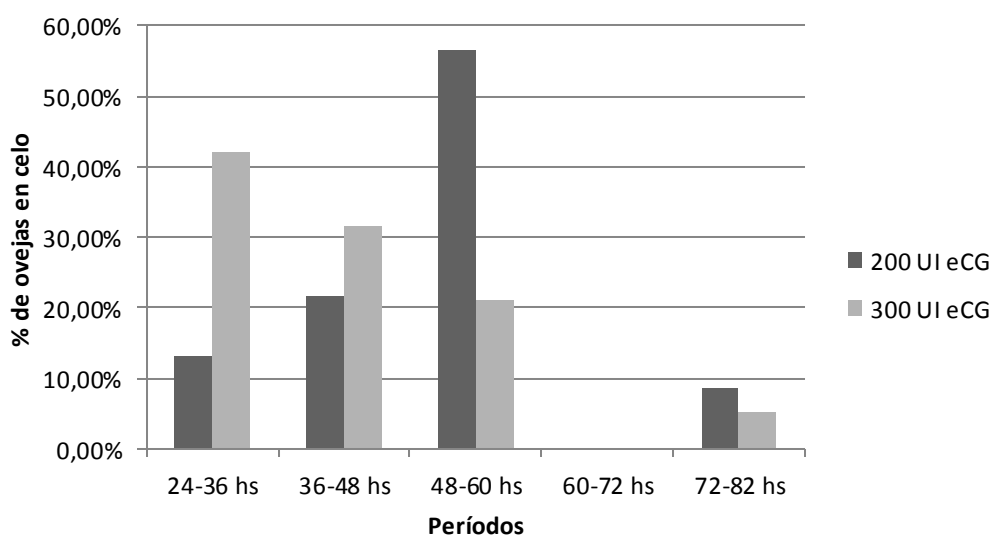


Figura 3.2 Frecuencias de ovejas Santa Inês en celo agrupadas en intervalos de 12 horas desde la finalización del tratamiento de sincronización.

En las ovejas del T1 se pudo localizar el ovario mediante ultrasonografía en el 70,4% (19/27), en tanto en las hembras del T2 solo se observó en el 57,14% (16/28) de los animales. Los resultados de las estructuras identificadas en los ovarios (CL o foliculo ovárico) se presentan en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Frecuencias de ovejas con uno y dos cuerpos lúteos y solo con folículos.

tratamientos	n	1 CL	2 CL	Solo folículos.
200 UI eCG	19	78,9% (15/19)	10,52% (2/19)	10,52% (2/19)
300 UI eCG	16	68,75% (11/16)	25% (4/16)	6,26% (1/16)

eCG: gonadotropina coriónica equina.

Del total de hembras observadas en celo en ambos tratamientos, se pudo constatar ovulación mediante la observación del CL en el 62% de las mismas. Existió un 11% de ovejas que no fueron observadas en celo y sin embargo presentaron CL. Es posible que estas hembras tuvieran un celo demasiado corto o fueron servidas durante la noche o en momentos en los cuales la observación no se estaba realizando. Posiblemente en estos pocos casos también existió algún problema en la identificación con pinturas ya que de estas hembras, más de la mitad resultaron preñadas. Por otra parte, algunas hembras que si fueron detectadas en celo, en la ecografía solo presentaron folículos.

El porcentaje de preñez sin discriminar por tratamiento fue 78 %. La dosis de eCG no afectó el porcentaje de preñez, ya que el resultado estadístico no indicó asociación significativa entre ambas variables ( $p > 0,05$ ). Los resultados se detallan en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5. Porcentajes de gestación total, simple, doble y hembras vacías con dos dosis diferentes de gonadotropina coriónica equina (eCG), en ovejas Santa Inês en el subtrópico argentino.

Tratamientos	Simple	Dobles	Total	Vacías
200 eCG	66,60%	11,11%	77,71	22,22%
300 eCG	60,71 %	17,90%	78,61	21,42%

## DISCUSIÓN

Las razas empleadas en el primer ensayo respondieron de manera diferente a los protocolos de sincronización. En la raza Santa Inês hubo diferencia significativa en el porcentaje de gestación a favor del tratamiento de cinco días, lo que no ocurrió en la Ideal. En hembras de razas tropicales podría existir mayor labilidad del ovocito a las diferencias en la concentración de progesterona que ocurren según ésta provenga del CL o del dispositivo intravaginal lo que pudo conducir a la ovulación de un ovocito envejecido.

Con niveles elevados de progesterona, los estrógenos ejercen un efecto negativo sobre LH inhibiendo su pulsatilidad, de esta manera, el folículo dominante no ovula, sino que regresa acelerándose el recambio con el desarrollo de un nuevo folículo dominante (Savio *et al.*, 1993). Con el empleo de un dispositivo intravaginal los niveles de progesterona se elevan rápidamente y se mantienen supraluteales hasta el día cinco o seis, luego caen a niveles subluteales (Pinna *et al.*, 2012). Si el dispositivo intravaginal permanece por más días, el folículo dominante estará en fase estática hasta que se retire el dispositivo, momento en el que ovulará un ovocito envejecido con menos posibilidades de ser fertilizado (Rubianes *et al.*, 1996).

Los trabajos que evaluaron como se modifican las concentraciones de progesterona luego de la colocación del dispositivo intravaginal demostraron que éstas ocurren de manera diferente a cuando la progesterona proviene del CL. En el primer caso, el pico en el nivel hormonal ocurre aproximadamente a las 24 hs de la colocación del dispositivo mientras que en el segundo caso el pico se presenta a los cinco o seis días de la formación del CL (Gaston-Parry *et al.*, 1988; Leyva *et al.*, 1998; Rubianes *et al.*, 1998; Pinna *et al.*, 2012; Santos Cavalcanti *et al.*, 2012; Arroyo-Ledezma, 2013).

Viñoles *et al.* (2001) observaron resultados semejantes al presente estudio al evaluar la efectividad de esponjas intravaginales con 12 y 6 días de permanencia. La tasa de gestación fue mayor al usar esponja durante 6 días.

El porcentaje de gestación también fue significativamente mayor en ovejas que recibieron un tratamiento con dispositivo intravaginal con cinco días de permanencia en comparación con uno de 12 días (Agromeat, 2013). Letelier *et al.* (2009) utilizaron

esponjas con acetato de fluorogestona en ovejas Manchega en estación reproductiva, durante seis días. Los autores observaron que todas las ovejas ovularon luego de la remoción de la esponja.

Respecto al porcentaje de celo, con la permanencia de esponja durante 5 días se observó un porcentaje superior al 67 %. Semejante a lo observado por Sandoval *et al.* (2013) y Martemucci y D'Alessandro (2011) en ovejas y cabras, donde protocolos con esponjas con 40 mg de AFG o dispositivos con 0,3 gr de progesterona durante 5 días resultaron tan efectivos en inducir el estro como aquellos de 14 días.

De forma similar, en el trabajo publicado en Agromeat (2013) en ovejas Dorper, el porcentaje de celo fue mayor al usar 5 días de permanencia del dispositivo que al usar 12 días, aunque sin diferencia significativa.

Los resultados del presente trabajo demuestran que no hay diferencias en el porcentaje de preñez al reducir el tiempo de duración de los protocolos de sincronización, de siete a cinco días de permanencia del dispositivo intravaginal, pudiéndose incluso mejorar el porcentaje de gestación al implementar cinco días de permanencia. Se presenta además una ventaja para el productor que ahorra tiempo al tener la posibilidad de completar la sincronización y el servicio o IA de sus animales en 10 o 7 días respectivamente.

En el presente trabajo no se encontró diferencia significativa en el porcentaje de hembras en celo al emplear 200 o 300 UI de eCG. Resultados similares a los de Catalano *et al.* (2007), quienes tampoco observaron diferencia significativa al aplicar 300 y 500 UI de eCG en ovejas lanadas en anestro. Martínez-Tinajero *et al.* (2006) tampoco observaron diferencias significativas en el porcentaje de ovejas en celo al utilizar 150 y 300 UI de eCG en el protocolo de sincronización en ovejas cruce Merino por Damara.

En ovejas de pelo se evaluaron dosis de 0, 200, 300 y 400 UI de eCG mas esponja con FGA durante 12 días, en primavera. Los porcentajes de estro mostraron diferencias ( $p < 0,05$ ) entre 0 y 200 UI de eCG, pero, similar a lo ocurrido en el presente ensayo, no hubo diferencia entre 200 y 300 UI de eCG (Gonzalez-Reina *et al.*, 2014). Sin embargo, Quintero Elisea *et al.* (2011) no encontraron diferencias en el porcentaje de celo en ovejas

de pelo al comparar 0, 100, 200 y 400 UI de eCG, los porcentajes de celo fueron superiores a 85% aún sin aplicar eCG.

En el presente estudio existió diferencia significativa entre tratamientos en el intervalo sincronización-celo. Al aplicar 300 UI de eCG la presentación de celo se adelantó. Resultados semejantes se observaron por Catalano *et al.*, (2007), quienes compararon 300 y 500 UI de eCG en ovejas lanadas en anestro, donde el intervalo al celo fue más largo al emplear la menor dosis. De forma similar, en el estudio de Martínez-Tinajero *et al.* (2006) el intervalo sincronización-celo tuvo tendencia a acortarse y concentrarse con la mayor dosis, aunque sin diferencia significativa.

Sin embargo, Gonzalez-Reina *et al.* (2014) evaluaron el intervalo sincronización-celo en ovejas usando 200, 300 o 400 UI de eCG y en un grupo control. No se encontraron diferencias significativas usando 200, 300 o 400 UI de eCG pero sí al no aplicar la droga.

En el presente trabajo se observó que la dosis de eCG influyó en la distribución de los porcentajes de hembras en celo en diferentes horarios hasta las 82 h (Figura 3.2) De forma semejante, Quintero-Elisea *et al.* (2011) compararon protocolos con 0, 100, 200 y 400 UI de eCG en ovejas Black Belly y Pelibuey. Observaron que dentro de las 24 hs presentaron celo más del 40 % y el 60 % de las hembras que recibieron 200 y 400 UI de eCG respectivamente. Entre las 24 y 36 h no hubo efecto de la dosis y finalmente entre las 36 y 48 h la mayor respuesta se dio en las hembras control.

Sin embargo, Aké-López *et al.* (2014) evaluaron el efecto de 200 y 250 UI de eCG sobre porcentajes de celo y de gestación en ovejas Pelibuey en una región tropical de otoño a primavera. A diferencia del presente trabajo, ellos sí encontraron diferencias significativas entre tratamientos en ambas variables estudiadas. Las causas de los diferentes resultados entre el trabajo de Aké-López *et al.* (2014) y los del presente podrían ser el número de animales en estudio (el que fue mayor en aquel trabajo) o el tiempo total de observación de ovejas en celo, el que en el primer trabajo abarcó las 48 hs posteriores al retiro del dispositivo mientras que en el presente trabajo se extendió por 82 hs post retiro del dispositivo.

En el presente trabajo no se encontró diferencia significativa entre tratamientos en los porcentajes de gestación (tanto simples como dobles), semejante a lo ocurrido en los trabajos de Quintero Elisea *et al.* (2011) y Martínez Tinajero *et al.* (2006), pero diferente a lo observado por Aké López *et al.* (2014)

Las gestaciones dobles no superaron el 20% y no existieron gestaciones triples. Este resultado sugiere que, una dosis de 300 UI de eCG sería la adecuada cuando el objetivo del tratamiento sea sincronizar el momento de aparición del estro y obtener buena fertilidad, sin incrementar la cantidad de gestaciones dobles. Resultados similares se observaron por Zaiem *et al.* (1996), quienes usaron dosis de eCG de 300, 450 y 600 UI y la prolificidad se incrementó recién al aplicar las dos dosis más altas

## CONCLUSIÓN

En ovejas Santa Inês es posible reducir los días de permanencia de la esponja intravaginal a cinco días obteniendo porcentaje de celo superior al 67% y de preñez superior a 70 %.

En ovejas de raza Ideal, los tratamientos durante cinco y siete días tuvieron porcentajes de preñez superiores a 65% sin diferencias significativas entre ambos.

Dosis de 200 y 300 UI de eCG permiten conseguir porcentajes de hembras en celo superiores al 67 %. La dosis de 300 UI de eCG concentró la presentación del estro dentro de las primeras 48 h de finalizado el tratamiento, en tanto que al usar 200 UI los celos se concentraron entre 48 y 60 h.

Con ambas dosis se obtuvieron semejantes porcentajes de gestación, superiores a 77%, y la dosis de 300 UI de eCG no incrementó la proporción de gestaciones dobles.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abecia J.; Forcada F. y González-Bulnes A. 2011. Pharmaceutical Control of Reproduction in Sheep and Goats. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 27: 67-79.
- Agromeat. 2013. Sincronización del estro y fertilidad en ovejas Dorper aplicando un esquema corto de progesterona. Disponible en: [www.agromeat.com/129359/sincronizacion-del-estro-y-fertilidad-en-ovejas-dorper-aplicando-un-esquema-corto-de-progesterona](http://www.agromeat.com/129359/sincronizacion-del-estro-y-fertilidad-en-ovejas-dorper-aplicando-un-esquema-corto-de-progesterona) Activo junio de 2019.
- Aké-López J.; Centurión-Castro F.; Magaña-Monforte J. y Aké-Villanueva J. 2014. Efecto del progestágeno y de la dosis de Gonadotropina coriónica equina en la sincronización del estro y tasa de gestación en ovejas Pelibuey inseminadas por laparoscopia. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 1 (3): 261-268.
- Arroyo-Ledezma J.; De la Torre J. y Ávila-Serrano N. 2013. Repuesta reproductiva de ovejas de pelo sincronizadas con progesterona o prostaglandinas. *Agrociencia* 47(7): 661-670.
- Catalano R.; Teruel M.; Cabodevila J. y Callejas S. 2007. Efecto de diferentes dosis de gonadotropina coriónica equina sobre la respuesta reproductiva de hembras con un tratamiento para inducción de celos. *Investigación Veterinaria* 9: 11-17.
- Cordero-Mora J.; Sánchez-Torres E.; Molina-Mendoza P.; Nieto-Aquino R.; Peralta-Ortiz J.; Cárdenas-León M.; Mejía-Villanueva O.; Olivares-Reyna L. y Figueroa-Velasco J. 2011. Reducción de dosis de acetato de fluorogestona Mediante partición de esponjas para sincronización del estro en ovejas. *Revista Científica FCV-LUZ* 21 (6):492-499.
- Córdova-Izquierdo A.; Córdova-Jiménez M.; Córdova-Jiménez C. y Guerra Liera J. 2008. Procedimientos para aumentar el potencial reproductivo en ovejas y cabras. *Revista Veterinaria* 19 (1): 67-79.
- De Gea G. 2007. El ganado lanar en Argentina. Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Córdoba, Argentina 279 pp.
- Di Rienzo J.; Casanoves F.; Balzarini M.; González L.; Tablada M. y Robledo C. InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Evans A.; Duffy P.; Hynes N. y Boland M.; 2000. Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. *Theriogenology* 53: 699-715
- Fraser A. 1980. Comportamiento de los animales de granja. Editorial Acribia, Zaragoza, España 291 pp.
- Gaston-Parry O.; Heasman K.; Nemorin J. y Robinson T. 1988. A radioimmunoassay for flurogestone acetate (FGA) and its application to the measurement of plasma FGA

and progesterone in ewes treated with FGA- impregnated intravaginal sponges. *Australian Journal of Biological Science* 41: 57-67.

- Gonzalez-Reina A.; Lucero-Magana F.; Briones-Encinia F.; Vázquez-Armijo J.; Limas-Martinez A. y Martinez-Gonzales J. 2014. Factores que alteran la conducta del estro en ovejas de pelo sincronizadas con acetato de fluorogestona y gonadotropina de suero de yegua preñada. *Avanico Veterinario* 4 (2): 13-20.
- Hafez E. y Hafez B. 2002. Reproducción e inseminación artificial en animales. Mc Graw Hill Interamericana. México, D.F. 33 pp.
- Letelier C.; Contreras-Solís I.; García-Fernández R.; Ariznavarreta C.; Tresguerres J.; Flores J. y Gonzales-Bulnes A. 2009. Ovarian follicular dynamics and plasma steroid concentrations are not significantly different in ewes given intravaginal sponges containing either 20 or 40 mg of fluorogestone acetate. *Theriogenology* 71: 676-682.
- Leyva V.; Buckrell B. y Walton J. 1998. Regulation of follicular activity and ovulation in ewes by exogenous progestagen. *Theriogenology* 50: 395-416.
- Martemucci G. y D` Alesandro A. 2010. Estrous and fertility responses of dairy ewes synchronized with combined short-term GnRH, PGF 2 $\alpha$  and estradiol benzoate treatments. *Small Ruminant Research* 93: 41-47.
- Martemucci G. y D` Alesandro A. 2011. Induction/synchronization of oestrus and ovulation in dairy goats with different short term treatments and fixed time intrauterine or exocervical insemination system. *Animal Reproduction Science* 126: 187-194.
- Martínez-Tinajero J.; Sánchez-Torres E.; Bucio A.; Rojo R.; Mendoza M.; Cordero M. y Mejía V. 2006. Efecto de eCG e inseminación laparoscópica sobre el comportamiento reproductivo en ovejas F1 (Damara x Merino). *Revista Científica* 16: 72-77.
- Menchaca A. y Rubianes E. 2004. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reproduction and Fertility Development* 16:403-414.
- Oliveira M.; Guido S. y Lima P. 2001. Comparison of different protocols used to induce and synchronize estrus cycle of Saanen goats. *Small Ruminant Research* 40: 149-153.
- Pinna A.; Brandao F; Cavalcanti A.; Borges A.; Souza J y Fonseca J. 2012. Reproductive parameters of Santa Inês ewes submitted to short-term treatment with re-used progesterone devices. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinaria e Zootecnia* 64 (2): 333-340.
- Prieto M.; García Martínez G.; Lateulade I. y Villa M. 2010. Sincronización de celos en ovinos con doble dosis de prostaglandina. *Sitio Argentino de Producción Animal*. Disponible en: [www.producción-animal.com.ar](http://www.producción-animal.com.ar). Activo junio de 2019.

- Quintero–Elisea J.; Macías-Cruz U.; Álvarez-Valenzuela F.; Correa-Calderón A.; González-Reyna A.; Lucero-Magaña F.; Soto-Navarro S. y Avendaño-Reyes L. 2011. The effects time and dose of pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) on reproductive efficiency in hair sheep ewes. *Tropical Animal Health and Production* 43:1567-1573.
- Romano J.; Rodas E.; Ferreira A.; Lago I. y Benech A. 1996. Effect of progestagen, PMSG and artificial insemination time on fertility and prolificacy in Corriedale ewes. *Small Ruminant Research* 23: 157-162.
- Roy F.; Combes B.; Vaiman D.; Cribiu E.; Pobel T.; Delétang F.; Combarnous Y.; Guillou F. y Maurel M. 1999. Humoral immune response to Equine Chorionic Gonadotrophin in ewes: Association with Major Histocompatibility Complex and interference with subsequent fertility. *Biology of Reproduction* 61: 209-218.
- Rubianes E.; de Castro T. y Carabajal B. 1996. Effect of high progesterone levels during the growing phase of the dominant follicle of wave 1 in ultrasonically monitored ewes. *Canadian Journal of Animal Science* 76:473-475.
- Rubianes E.; Castro T. y Kmaid S. 1998. Estrus response after e short progesterone priming in seasonally anestrous goats. *Theriogenology* 49: 356-362.
- Sandoval R.; Ruiz L.; Olivera K.; Villanueva E. y Santiani A. 2013. Evaluación reproductiva de cabras sincronizadas con dos protocolos empleando progestágenos intravaginales. *Spermova*; 3(1): 101-102
- Santos Cavalcanti A.; Zandonadi Brandão F.; Altamiro Garcia L.; Nogueira C. y Ferreira da Fonseca J. 2012. Effects of GnRH administration on ovulation and fertility in ewes subjected to estrous synchronization. *Revista Brasileira de Zootecnia* .41:1412-1418.
- Savio J.; Thatcher W.; Badinga L.; de la Zota R. y Wolfenson D. 1993. Regulation of dominant follicle turnover during the oestrus cycle in cows. *Reproduction Fertility* 97:107-203.
- Silva M. 2012. Uso de la combinación de melatonina y prostaglandinas para la sincronización del estro en ovejas de raza Rasa aragonesa. Tesis de Maestría. Universidad de Zaragoza, España 69 pp.
- Sirois J. y Fortune J. 1990. Lengthening the bovine estrus cycle with low levels of exogenous progesterone: a model for studying ovarian follicular dominance. *Endocrinology* 2: 916-925.
- Sosa J.; Fernández G.; Boggero C.; Toffoli G.; Leva P. y Garcia M. 2016. Utilización de Oxitetraciclina e Hidrocortisona para evitar adherencias en dispositivos intravaginales en ovinos. *Revista FAVE- Ciencias Agrarias* 15 (2): 77-81.
- Ungerfeld R. y Rubianes E. 1999. Effectiveness of short progestagen priming for the induction of fertile oestrus with eCG in ewes during late seasonal anoestrus. *Animal Science* 68:349-353.

- Verdoljak J.; Vásquez R.; Casco J.; Pereira M.; Gándara L.; Acosta F.; Fernández López C.; Castillo Rodríguez S. y Martínez González J. 2017. Protocolo de Inducción de Estro en Ovejas de Lana en Anestro Estacional y su Comportamiento Productivo. *Revista de Investigación Veterinaria Perú* 28 (4): 904-910.
- Viñoles C.; Forsberg M.; Banchemo G. y Rubianes E. 2001. Effect of long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. *Theriogenology* 55:993-1004.
- Viñoles C.; Meikle A.; Forsberg M. y Rubianes E. 1999. The effect of subluteal levels of exogenous progesterone on follicular dynamics and endocrine patterns during the early luteal fase in the ewe. *Theriogenology* 51: 1351-1361.
- Zaiem I.; Tainturier D.; Chemli J. y Soltani M. 1996. Vaginal sponges and different PMSG doses to improve breeding performances of Black Thibar ewes. *Revista de Medicina Veterinaria* 147:305-310.

## CAPÍTULO 4

### Caracterización del Perfil Citológico de la mucosa vaginal durante el ciclo estral en ovejas Santa Inês

#### INTRODUCCIÓN

La citología vaginal es un método de estudio simple y económico que permite la observación de varios tipos celulares de la mucosa vaginal (Raposo y Silva, 1999). Es usado frecuentemente en medicina humana como parte de los planes de salud reproductiva de la mujer. Su importancia surge por la extrema sensibilidad del epitelio vaginal a las hormonas ováricas que inducen, a lo largo del ciclo, a un cambio de espesor de los estratos celulares que lo componen (Schutte, 1967b; Hussin, 2006). El estrógeno tiene un efecto directo sobre el epitelio vaginal de hembras mamíferas, estimulando el incremento en el número de capas celulares en la vagina, lo que moviliza glucógeno en las células y causa cornificación de las capas superficiales (Sanger *et al.*, 1958). Por otra parte, la disminución de la concentración de estrógenos provoca una gran descamación de las capas superficiales y el epitelio se mantiene de esta forma hasta la regresión del CL, cuando el desarrollo folicular nuevamente ejerce su influencia (Brown, 1944).

En veterinaria el estudio de la citología vaginal se utiliza para evaluar el estado reproductivo de las hembras y seguir de forma precisa el progreso de las distintas etapas del ciclo estral. El mayor uso se hace en hembras caninas para poder estimar el momento de la ovulación (Schutte, 1967a; Ola *et al.*, 2006) y hacer el manejo correspondiente del servicio.

En hembras de interés productivo, especialmente en la vaca, la oveja y la cabra, la técnica se empleó en momentos muy diversos del ciclo. En algunos trabajos se realizó sincronización de celo mientras que en otros no, la utilización de diferentes coloraciones y tiempos de permanencia de la muestra en los mismos también es variable (Ahmadi y Nazifi, 2006; Hussin, 2006; Macedo Porto *et al.*, 2007; Ovando *et al.*, 2013). La disparidad que hay en los procedimientos dificulta las comparaciones y esto hace que los resultados sean menos aprovechados.

Sin embargo, hay grandes avances en la biotecnología de la reproducción y es ahí donde la citología vaginal podría presentarse como una herramienta para auxiliar en la identificación del estado reproductivo, posibilitando el control del estro para favorecer la fecundación y permitiendo la detección temprana de la gestación, maximizando así los resultados en los programas de reproducción. Es la alternativa al uso de retajos antes de colocar los carneros o realizar la inseminación artificial. Puede ser también utilizada para diagnosticar precozmente patologías del tracto genital femenino (Raposo y Silva, 1999; Toniollo *et al.*, 2005).

La obtención de la muestra es simple, se realiza en menos de un minuto, no implica riesgos y es indolora. El procesamiento de las muestras en el laboratorio es sencillo y no requiere de una etapa extensa de capacitación técnica. La observación microscópica de las mismas demanda un tiempo mayor.

La mucosa vaginal presenta un epitelio plano estratificado y las células planas que llegan a la superficie apical se van descamando. De esta forma, varias capas celulares, morfológicamente distintas forman la túnica mucosa (Schutte, 1967a; Macedo Porto *et al.*, 2007). Las capas varían en número a lo largo del ciclo estral, durante la gestación, anestro y lactación, de acuerdo con el estímulo hormonal al que son sometidas (Raposo *et al.*, 2000). Las células epiteliales responden a los aumentos en los niveles de estradiol durante el proestro, con aumento de la cornificación de las células (Linde-Forsberg, 1995). El cambio de epitelio cubico biestratificado a plano estratificado con más de 30 estratos de células ocurre en cada ciclo.

Las células del epitelio vaginal se clasificaron en basales, aquellas que descansan sobre la membrana basal. Son pequeñas, ovoides y con núcleo grande. Prácticamente no aparecen en los extendidos celulares. La segunda capa de células corresponde a las parabasales, son similares a las basales pero con núcleo un poco menor, miden entre 15 y 25  $\mu\text{m}$  de diámetro. Luego se encuentran las células intermedias, tienen un núcleo todavía más pequeño y forma navicular. Algunos trabajos dividen a este estadio celular en intermedias profundas, de forma similar a las parabasales pero con un diámetro de 20 a 30  $\mu\text{m}$ , e intermedias superficiales, de forma poligonal y más grandes que las anteriores, con un diámetro celular de 30 a 60  $\mu\text{m}$  y un núcleo de 7 a 11  $\mu\text{m}$ . Por último están las células superficiales, que se subclasificaron en: células con núcleo picnótico y células anucleadas,

ambas tienen un diámetro de 30 a 60  $\mu\text{m}$  y forma navicular. El núcleo picnótico de las primeras mide menos de 8  $\mu\text{m}$ . Además presentan queratina en su citoplasma (Schutte, 1967a, Rosciani *et al.*, 2006; Macedo Porto *et al.*, 2007).

Cuando los niveles de estrógeno están incrementados estimulan la proliferación celular y el número de estratos del epitelio aumenta, por lo que los neutrófilos no se observan ya que no consiguen migrar hasta el lumen vaginal. Sin embargo, cuando los niveles de estrógeno caen y se incrementan los de progesterona, la pared vaginal se adelgaza y es posible observar neutrófilos (Schutte, 1967b; Macedo Porto *et al.*, 2007).

En ovinos existe muy poca información sobre citología vaginal exfoliativa que describa el comportamiento de las células epiteliales durante el ciclo estral completo. Además, la mayoría de los trabajos se realizaron en razas originarias de latitudes altas y climas templados (Sanger *et al.*, 1958; Ghannam *et al.*, 1972, citado por Ovando *et al.*, 2013).

Macedo Porto *et al.* (2007) observaron 4 tipos de células a lo largo de las diferentes fases del ciclo estral: células basales, parabasales, intermedias y superficiales anucleadas. Ovando *et al.* (2013) realizaron un análisis morfométrico de las células del epitelio vaginal en ovejas de pelo. Durante el estro, el diámetro promedio de las células fue de 36 micras. En el metaestro fue de 30 micras. En ambos periodos predominaron las células superficiales. En el diestro, el diámetro fue aún menor, predominando en esta etapa las células intermedias y parabasales.

En vacas Nelore se realizó la descripción del perfil citológico vaginal considerando la dinámica folicular a través de ultrasonografía, se observó que las células superficiales tuvieron picos en los días 5, 10 y 18 del ciclo. Los picos en los días 5 y 18 podrían explicarse por los niveles de estradiol provenientes del folículo dominante en estos días, sin embargo el día 10 coincidió con el momento de la emergencia de una nueva onda, momento en el cual no hay folículo dominante (Rezende, 2006).

La utilidad del estudio de citología vaginal en reproducción de animales de compañía es indiscutible. Sin embargo, las diferencias que existen en la fisiología del ciclo estral entre la perra y ovejas, cabras, vacas y demás especies poliestricas (continuas y

estacionales) hace que los resultados no siempre sean extrapolables. La perra pertenece a una especie monoéstrica. La duración del estro tiene un promedio de 9 días, periodo en el cual ocurren las ovulaciones de forma asincrónica. En consecuencia el metaestro se superpone con el estro, porque los eventos fisiológicos característicos de esta fase ocurren mientras la perra sigue en estro. Por lo tanto solo debe referirse al diestro como la etapa de influencia progestacional (Tamalatzí, 2013).

En la vaca y en la oveja el estro dura en promedio 12 y 24 horas respectivamente (Salisbury, 1964, citado por Olhagaray Hoyos, 2004; De Castro *et al.*, 2015), sumado a la existencia de ondas de desarrollo folicular en el periodo inter-estro hace que las modificaciones que ocurren en la citología vaginal de estas especies no puedan ser comparadas con la perra.

La caracterización de las modificaciones que ocurren en el epitelio vaginal durante el ciclo estral en ovejas Santa Inês es importante al aportar conocimientos que ayudarán a afianzar el uso de la técnica en pequeños rumiantes.

Bajo la hipótesis que en ovejas tropicales es posible determinar la fase del ciclo estral mediante el estudio de las células del epitelio vaginal, este capítulo tuvo como objetivo caracterizar el ciclo del epitelio vaginal de ovejas de raza Santa Inês, mediante el estudio citológico.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Lugar de Trabajo**

El trabajo se desarrolló desde el 20 de marzo hasta el 10 de abril del mismo año en el establecimiento agropecuario Don Donato, Colonia Mota, departamento de Monte Caseros, Corrientes. Su localización es 30° 30' S y 58° 02' O, con clima subtropical húmedo y precipitaciones anuales promedio de 1100 mm.

### **Animales y Manejo de la majada**

Se utilizaron 10 borregas Santa Inês, sexualmente maduras no gestantes, de 18 meses de edad y peso promedio 36 Kg. Todas fueron mantenidas bajo las mismas condiciones de



alimentación, la que consistió en pastizal natural y agua *ad libitum*. Además, recibieron suplementación alimentaria, la misma estuvo compuesta por maíz picado y heno de alfalfa. El manejo para llevar a cabo la suplementación fue el siguiente, las borregas permanecían en potreros durante todo el día y al anochecer eran llevadas a un corral para pasar la noche. La suplementación se administraba en comederos, cada noche al momento de traer los animales al corral. La sanidad de las hembras consistió en desparasitación y calendario sanitario acorde a la edad.

El PV se determinó a todas las hembras en estudio al iniciar el ensayo. El registro se realizó con balanza digital. La misma constó de una plataforma para colocar al animal y una jaula de metal adaptada para ovinos que se colocó arriba para minimizar la movilidad del mismo.

Se tomaron muestras de mucosa vaginal a todas las hembras desde el día que presentaron celo y de allí en adelante todos los días, alrededor de las 7 y 30 horas de la mañana, durante 18 días. Para la detección de celo se introdujeron retajos en la majada a los que se les colocó ferrite alrededor del prepucio para que marquen a las hembras al saltarlas. Una vez identificada la hembra en celo se inició la toma de muestras.

La técnica utilizada para el muestreo fue la recomendada por Ola *et al.* (2006). Apartando los labios vulvares de la oveja se introdujo un hisopo estéril previamente humedecido con solución fisiológica, en la comisura dorsal de la vulva, hasta una profundidad de unos 5 o 6 cm. Con el hisopo ubicado allí se realizaron suaves movimientos rotatorios por las paredes de la vagina. Una vez obtenida la muestra, se hizo rodar el hisopo sobre un portaobjeto debidamente identificado. Se fijó el material en alcohol 96° por no menos de 5 minutos y se dejó secar al aire libre.

Una vez en el laboratorio, las muestras se colorearon con Papanicolaou y se observaron en el microscopio óptico.

Se obtuvieron 18 muestras por oveja (una por cada día), en total 180 extendidos. En cada uno se contaron 100 células, clasificándolas por su morfología en parabasales, intermedias profundas, intermedias superficiales y superficiales. Los extendidos se fotografiaron y las células se midieron considerando su diámetro total y el diámetro de su

núcleo. Para esto se utilizó el programa Image Pro Plus. El análisis estadístico consistió en el uso de tablas de frecuencia, cálculo de promedio y desvío estándar.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el análisis de los frotis vaginales se reconocieron los siguientes tipos celulares: parabasales, intermedias profundas, intermedias superficiales y superficiales. Los diámetros de células y núcleos se presentan en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Diámetro promedio y desvío estándar (DS) en  $\mu\text{m}$  de los diferentes tipos de células epiteliales de la vagina de borregas Santa Inês.

Tipo de célula	n	Citoplasma ( $\mu\text{m}$ )	Núcleo ( $\mu\text{m}$ )
Parabasales	189	20 (3,6)	11,9 (1,89)
Intermedias profundas	1.793	25,42 (2,82)	10,75 (1,75)
Intermedia superficial	6.318	43,24 (8,24)	10,2 (1,57)
Superficial A	4.412	38,71 (6,58)	6,53 (1,01)
Superficial B	1.475	24,16 (3,36)	6,24 (1,16)

La Figura 4.1 presenta las frecuencias promedio de cada tipo celular a lo largo del ciclo. No se observaron células basales, al igual que en los trabajos de Ovando *et al.* (2013); Zohara *et al.* (2014) y Pacheco (2017) en ovejas de pelo y alpacas. Las **células parabasales**, presentaron forma redondeada, con citoplasma escaso y núcleo grande (Figura 4.2 A y B). Este tipo celular fue escaso en todas las fases del ciclo, no superando el 20 %.

Las **células intermedias profundas** presentaron bordes redondeados, citoplasma más abundante y núcleo menor que en el estadio anterior. Se la pudo identificar en mayor cantidad que las parabasales, sin embargo la frecuencia promedio no superó el 25% (Figura 4.2 B, C y D).

Las **intermedias superficiales** fueron las más abundantes en todo el periodo estudiado y las que alcanzaron mayor diámetro de citoplasma. Presentaron forma poligonal y núcleo más pequeño que en el estadio anterior (Figura 4.2. C, E y F). Predominaron sobre los otros tipos celulares los dos primeros días del ciclo, con una frecuencia promedio

de 55% y descendieron hasta el día 4 cuando alcanzaron un valor promedio de 40%. A partir de allí se mantuvieron en valores entre 35 y 45 % aproximadamente hasta el final del ciclo.

La identificación de dos tipos de célula intermedia, profundas y superficiales coincide con los trabajos de Rosciani *et al.* (2006) en perras, quienes las llaman profundas y superficiales, Rezende (2006) en vacas, quien las describe como células jóvenes y viejas y Pacheco (2017) en alpacas, las llama células chicas y grandes. La descripción morfológica de estos tipos celulares por los diferentes autores indica que, aunque se denominaron de forma distinta, se trata de dos estadios de la célula intermedia. Por otra parte, Macedo Porto *et al.* (2007); Correia *et al.* (2010); Ovando *et al.* (2013); Zohara *et al.* (2014) describen un solo tipo de célula intermedia.

**Las células superficiales** se dividieron en dos subtipos de acuerdo a su morfología. El primero, denominado A, presentó forma poligonal y núcleo picnótico (Figura 4.3. A y C). El subtipo B, presentó citoplasma más pequeño que el A, e intensamente acidófilo y núcleo picnótico (Figura 4.3. B, C y D). Al calcular las frecuencias de los dos subtipos juntos, en los dos primeros días del ciclo tuvieron menor proporción promedio que las células intermedias superficiales, con un valor de 36 % y a partir de allí fueron incrementándose hasta superar el 50 % al finalizar el ciclo.

En el presente estudio no se observaron células anucleadas, al igual que en los trabajos de Macedo Porto *et al.* (2007) con ovejas Santa Inês, Ovando *et al.* (2013) también en ovejas de pelo y Pacheco (2017) en alpacas.

La presencia de un subtipo celular B no se encontró hasta el momento en otros trabajos con ovejas. Sin embargo, en la vizcacha de llanura, se describió recientemente un tipo celular denominado “mucoso” cuyo diámetro del citoplasma y del núcleo coincide con aquellos de la célula superficial B, aunque las características morfológicas y tintoriales son diferentes (Flamini *et al.*, 2016). La morfología de las células superficiales B podría deberse a la pérdida de volumen y retracción de los filamentos de queratina, eventos que ocurren cuando la célula epitelial sufre apoptosis, que además le confieren al citoplasma un tinte intensamente eosinófilo (Fernández-Figueras y Puig, 2002). Otra explicación de este hallazgo sería que las células superficiales se fragmentan perdiendo parte de su citoplasma,

por lo que parecen ser más chicas. Sin embargo, en el análisis de muchas células se observa un citoplasma de bordes nítidos, bien delineados que no parece haber sufrido fragmentación. Además, esta segunda opción explica únicamente el menor tamaño pero no la intensa acidofilia observada en el citoplasma

Las células intermedias superficiales predominaron los dos primeros días del ensayo, durante el estro. Las superficiales por su parte tuvieron una proporción menor en esta fase pero se incrementaron hacia el siguiente estro. Sin embargo existió variabilidad en los porcentajes de cada tipo celular a lo largo del ciclo. Esto se refleja en los valores de desvío estándar presentados en la Tabla 4.2).

En ovejas Santa Inês, Macedo Porto *et al.* (2007) citaron que en el proestro y estro predominan las células superficiales. En tanto que en el metaestro y diestro lo hacen las basales, superando el 80% aunque las parabasales e intermedias fueron abundantes, alcanzando una frecuencia de 70%. Esto difiere con el presente estudio, ya que aquí las células parabasales no superaron el 10% y las intermedias profundas tuvieron una frecuencia promedio máxima de 23%. Resultados similares se observaron en ovejas autóctonas de Asia, en las cuales las células parabasales e intermedias no superaron el 28% en ninguna fase del ciclo (Zohara *et al.*, 2014).

En ovejas de pelo, Ovando *et al.* (2013) observaron que las células superficiales predominaron en el estro y que las intermedias lo hicieron en el diestro, pero como éstas no se discriminaron entre intermedias superficiales y profundas, la comparación con los resultados del presente trabajo se dificulta.

En algunas ovejas del presente trabajo las células superficiales se presentaron en pequeña cantidad en todas las fase del ciclo, similar a lo observado por Correia *et al.*, (2010) en cabras. Los mismos también observaron que, las células intermedias fueron significativamente superiores a los demás tipos celulares en todas las fases del ciclo. Los autores mencionan la dificultad en la interpretación de los resultados de la citología vaginal en cabras.

El predominio de las células intermedias superficiales y superficiales en el presente trabajo coincide con el realizado por Widiyono *et al.* (2011) en cabras, donde la

composición de la citología vaginal exfoliativa no mostró cambios específicos en las hembras evaluadas, existiendo predominio de células intermedias y superficiales (> al 60%) durante todos los estadios del ciclo estral. Esto podría estar relacionado con las características del ciclo estral de las ovejas y cabras, en las que existen dos o tres folículos dominantes en cada ciclo. El estradiol proveniente de estos folículos podría explicar el predominio de estos dos tipos celulares, tal como se sugirió en vacas (Rezende, 2006).

Los neutrófilos se observaron en 9 de las 10 ovejas analizadas (Figura 4.3. C y D). En 4 animales el momento en el que éstos fueron abundantes coincidió con el predominio de células intermedias profundas y superficiales. En los demás animales, los neutrófilos fueron moderados a abundantes en diferentes días del ciclo, y esto fue indistinto al predominio celular. En algunos casos sucedió con abundancia de células intermedias superficiales y en otros casos con abundancia de superficiales.

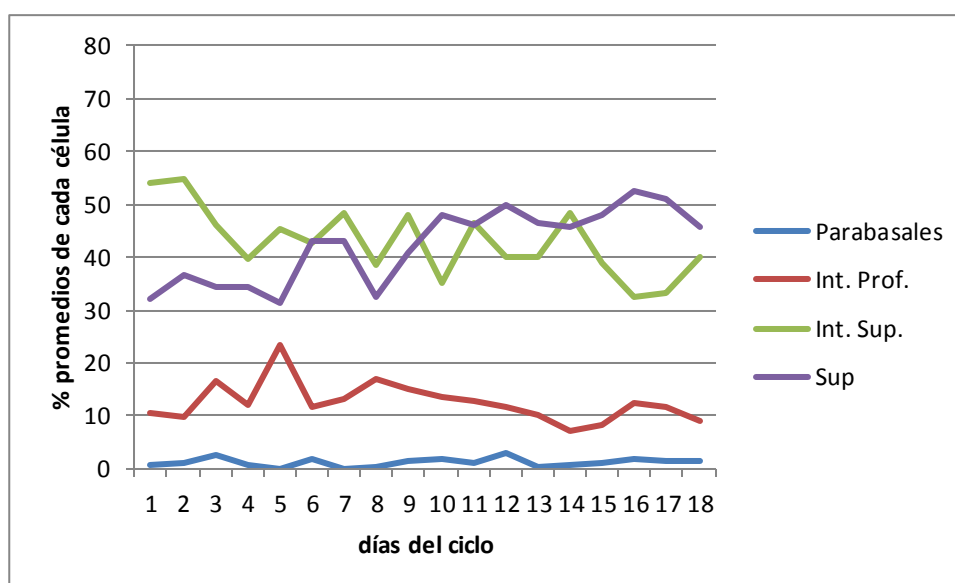


Figura 4.1. Frecuencias promedio de cada tipo celular del epitelio de la vagina a lo largo del ciclo estral en borregas Santa Inês.

Tabla 4.2. Frecuencias promedio y desvío estándar (DS) de los diferentes tipos celulares del epitelio vaginal a lo largo del ciclo estral de borrega Santa Inês.

	Parabasal		Intermedia Profunda		Intermedia Superficial		Superficial	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Día 1	0,84	1,96	10,6	8,77	54,1	28,1	32	28,5
Día 2	1,16	3,03	9,6	13,5	54,7	28,6	36,8	26,5
Día 3	2,45	6,32	16,44	15,13	46	24	34,25	22,04
Día 4	0,68	1,16	11,9	10,87	39,6	23,43	34,5	23,66
Día 5	0	0	23,5	18,2	45,3	20,1	31,2	20,2
Día 6	1,79	2,76	11,5	9,8	42,8	20,1	43,2	29,3
Día 7	0	0	13	11,9	48,5	29	42,9	34,1
Día 8	0,2	0,56	16,8	14,5	38,6	20,1	32,5	15,9
Día 9	1,39	3,83	14,88	12,63	48	20,02	40,77	31,44
Día 10	1,77	3,17	13,6	18,19	35,1	23,93	47,9	23,66
Día 11	1,11	2,5	12,8	21,6	46,4	27,5	46,2	32,5
Día 12	2,83	4,9	11,62	13,99	40,1	24,58	49,72	29,62
Día 13	0,27	0,85	10,26	9,5	40,18	37,84	46,36	36,16
Día 14	0,74	1,56	7,2	8,72	48,41	23,32	45,55	26,63
Día 15	1	2,7	8,4	12,42	38,75	29,22	48,01	35,6
Día 16	1,73	2,67	12,4	15,14	32,5	21,44	52,5	31,92
Día 17	1,43	2,46	11,7	12,2	33,2	20,02	51	24,5
Día 18	1,3	2,74	9	10,4	40	17,9	45,7	22,4

En cuanto a la morfometría de las células analizadas, los resultados coinciden parcialmente con el trabajo de Rosciani *et al.* (2006) con la excepción que en el presente ensayo el diámetro del citoplasma de las células intermedias superficiales, fue mayor que el de las superficiales A.

En las ovejas Santa Inês de este estudio se observó mayor diámetro de citoplasma en las células intermedias que el observado por Ovando *et al.* (2013) aunque esto puede deberse a que los autores no clasificaron a las células intermediarias en dos tipos.

El núcleo de las células superficiales fue de menor diámetro que aquellos de las células superficiales descritas por Ovando *et al.* (2013).

Los diámetros de citoplasma y núcleo de todos los tipos celulares observados en el presente trabajo fueron mayores que los descritos por Pacheco (2017) en alpacas.

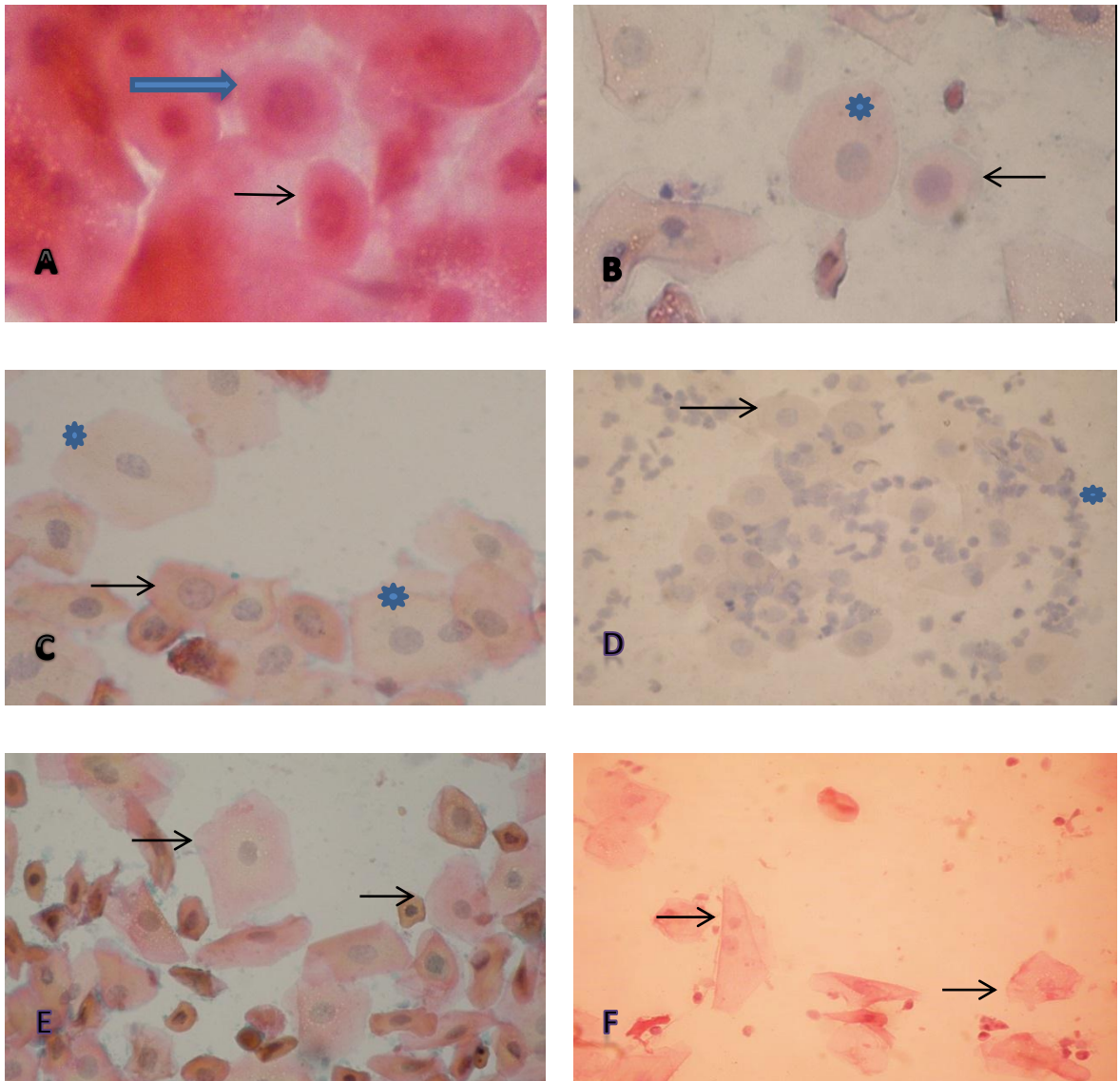


Figura 4.2. Citología vaginal de borregas Santa Inês. A: Células parabasales ( →) B: Célula parabasal ( →) e intermedia profunda ( \*). C: Células intermedia profunda ( →) e intermedias superficiales (\*). D: Células intermedias profundas ( →) y abundantes neutrófilos (\*). E y F: Células intermedias superficiales ( →). Papanicolaou. 40 X.



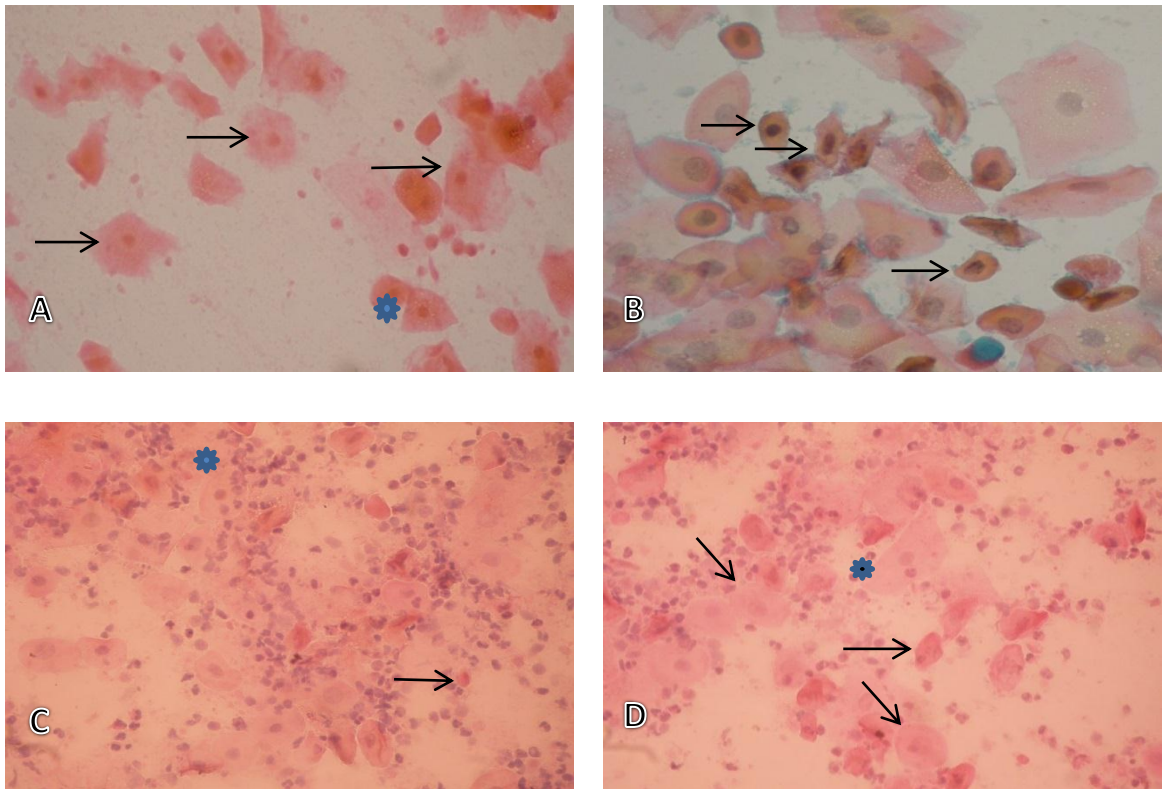


Figura 4.3. Citología Vaginal de borregas Santa Inês. A: Célula superficial subtipo A ( →) y subtipo B (\*). B: Células superficiales subtipo B (→). C y D: Se observa predominio de neutrófilos y diferentes tipos celulares, superficiales A (\*), B (→), intermedias profundas (↘). Papanicolaou. 40 X

## CONCLUSIONES

En el análisis de la citología vaginal de ovejas Santa Inês en el subtrópico argentino, fue posible reconocer cuatro tipos celulares diferentes con 2 subtipos de células superficiales. No fue posible determinar la fase del ciclo estral a través del análisis de las frecuencias de los tipos celulares.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmadi M. y Nazifi S. 2006. Evaluation of reproductive status with cervical and uterine cytology in fat-tailed sheep. *Comparative Clinical Pathology* 15: 161-164.
- Brown P. 1944. Physiological and histological changes in the vagina of the of the cow during the estrual cycle. *American Journal of Veterinary Research* 5(15):99-112.
- Correia F.; Ferraz D.; Araújo S.; Marques V.; Morales T.; de Lima J.; Oliveira M.; Alves de Sousa W.; Lima J. y da Rocha J. 2010. Identificação da ciclicidade em cabras leiteiras da Raça Saanen através da citologia vaginal no Município de Venturosa. X Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensao, Recife, Brasil.
- De Castro T.; Menchaca A. y Rubianes E. 2015. Fisiología Reproductiva y control del desarrollo folicular en ovejas y cabras. En: *Fisiología y Tecnologías reproductivas en pequeños ruminates*. Fundación URAUy- Instituto de reproducción animal Uruguay 90 pp.
- Fernández Figueras M. y Puig L. 2002. Claves para el diagnóstico dermatológico. Toxicodermias. *Piel* 17(2): 73-80.
- Flamini M.; Barbeito G. y Portianski E. 2016. Características de la citología exfoliativa en hembras gestantes y no gestantes de *lagostomus maximus*. *Science Morphology* 18(1): 10-19.
- Hussin A. 2006. The vaginal exfoliative cytology of Awassi ewes during post-parturient period. *Iraqi Journal of Veterinary Medicine* 30(2):130-137.
- Linde-Forseberg C. Artificial insemination with fresh, chilled extended and frozen-thawed semen in the dog. *Seminary Veterinary Medical Surgery (Small Animal)* 10(1):48-58.
- Macedo Porto R.; Vasconcelos T.; Ferreira F.; Moreira J. y Torres de Souza J. 2007. Perfil citológico vaginal de ovelhas da raça Santa Inês no acompanhamento do ciclo estral. *Medicina Veterinaria* 8 (3): 521-527.
- Ola S.; Sanni A. y Egbunike G. 2006. Exfoliative vaginal cytology during the oestrus cycle of West African Dwarf goats. *Reproduction Nutrition Development* 46: 87-95.
- Olhagaray Hoyos R. 2004. Comparación de cuatro protocolos de sincronización de celo en vacas Holstein Ovsynch, CIDR-B, PGF2 $\alpha$  dosis reducida, natural. Tesis de Grado. Universidad Autónoma Gabriel René Moreno, Santa Cruz de la Sierra, Bolivia 44 pp.
- Ovando N.; Orihuela A.; Flores F. y Aguirre V. 2013. Citología y análisis morfométrico de las células del epitelio vaginal durante el ciclo estral en ovejas de pelo (*Ovis aries*). *International Journal Morphology* 31(3): 888-893.

- Pacheco J. 2017. Caracterización de la citología exfoliativa vaginal en Alpacas (*Vicugna pacos*). Revista Investigación Veterinaria 28(4): 886-893.
- Raposo R. y Silva L. 1999. Comparação qualitativa de diferentes técnicas de coloração para citología vaginal de cabras da raça Saanen. Ciência Animal 9 (2): 81-85.
- Raposo R.; Silva L.; Lobo R. y Freitas V. 2000. Comparação da citología vaginal de cabras cíclicas e gestantes da raça Saanen. Revista Científica Produção Animal 2(1): 12-15.
- Rezende L. 2006. Perfil citológico vaginal e dinâmica folicular durante o ciclo estral em novhila Nelore. Tesis de Maestría. Universidade Federal de Goiás. Goiás, Brasil 47 pp.
- Rosciani A.; Merlo W. y Macció O. 2006. Citodiagnóstico en pequeños animales. Editorial Universitaria de la Universidad Nacional del Nordeste. Corrientes Argentina 66 pp.
- Sanger V.; Engle P. y Bell D. 1958. The vaginal cytology of the ewe during the estrous cycle. American Journal of Veterinary Research 19:283-287.
- Schutte, A. 1967a. Canine vaginal cytology-I. Technique and cytological morphology. Journal of Small Animal Practice 18:301-306.
- Schute A. 1967b. Canine vaginal cytology II- Cycly changes. Journal of Small Animal Practice 8:307-311.
- Tamalatzí Cahuantzi M. 2013. La citoquímica aplicada para la determinación de fases del ciclo reproductivo en perras. Trabajo Final de Graduación. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Torreón, México 43 pp.
- Toniollo G.; Monreal A.; Laura I.; Salazar W. y Delfini A. 2005. Citología vaginal em Cabras Alpinas com CIDR® e eCG. Archivos de Zootecnia 54 (208): 634-637.
- Widiyono I.; Putri P.; Sarmin Astuti P. y Airin C. 2011. Serum estradiol and progesterone concentration, vulval appearance, and exfoliative vaginal cytology during estrous cycle in Biglon goats. Journal Veteriner 12(4): 263-268.
- Zohara B.; Azizunnesa; Islam F.; Alam G. y Bari F. 2014. Exfoliative vaginal cytology and serum progesterone during the estrous cycle of Indigenous ewes in Bangladesh. Journal of Embryo Transfer 29(2): 183-188.

## CONCLUSIONES GENERALES

El comportamiento reproductivo de borregas Ideal y Santa Inês fue diferente. Las hembras de la raza Ideal presentaron una estación de anestro marcada, en tanto que las borregas de raza tropical ciclaron durante otoño, invierno y primavera, aunque algunas presentaron un anestro breve durante el período de estudio. Esto resulta interesante porque la introducción de la raza Santa Inês a regiones subtropicales y templadas aprovechando esta característica reproductiva de poliestrica continua podría afianzar el desarrollo de programas de reproducción con el objetivo de desestacionalizar la oferta de carne ovina.

Las ovejas de las dos razas analizadas en el presente trabajo respondieron de manera diferente al protocolo de sincronización empleando cinco o siete días de permanencia de la esponja intravaginal. Las ovejas de raza Santa Inês presentaron mayor porcentaje de preñez utilizando el protocolo de cinco días, en cambio, en las hembras de raza Ideal no se observó diferencia significativa entre tratamientos.

En las ovejas Santa Inês dosis de 200 y 300 UI de eCG no afectaron los porcentajes de celo y gestación demostrando que es posible reducir la dosis de esta hormona con la obtención de resultados similares.

El intervalo sincronización-celo y la distribución de la presentación del celo sí se vieron afectadas por la dosis de eCG. Con el uso de 300 UI el intervalo sincronización-celo fue menor y la distribución del celo se concentró en las primeras 48 horas pos tratamiento. La dosis de 300 UI de eCG no incrementó la ocurrencia de gestaciones gemelares.

En el estudio de los tipos celulares de la mucosa vaginal a través de citología vaginal se observaron abundantes células de cuatro tipos diferentes, parabasales, intermedias profundas, intermedias superficiales y superficiales de dos subtipos, A y B. Las modificaciones que ocurrieron en las frecuencias de cada tipo celular a lo largo del ciclo no fueron uniformes por lo que no fue posible determinar la fase del ciclo estral únicamente con el estudio citológico.

## Consideraciones a futuro

La presente tesis se enmarca en el objetivo general del grupo de trabajo “Ovinos para carne”, que tiene como objetivo general promover, en primer instancia el consumo de carne ovina como alternativa a la bovina y en segunda instancia promover el empleo de la raza Santa Inês, con el objetivo particular de aprovechar sus características reproductivas, de rusticidad y de calidad de carne (posiblemente menor cantidad de grasa). Estas dos últimas aún restan por evaluar con estudios propios.

El manejo de la alimentación (manejo del pastoreo, posible suplementación alimentaria) necesario para lograr 2 partos en 3 años en la región subtropical argentina, así como la relación costo beneficio son también el objetivo de trabajos futuros.

A fin de fortalecer nuestro trabajo, sería óptimo incrementar el número de repeticiones en estudios futuros, sobre todo en el caso del análisis de ciclicidad.

Una futura línea de estudio será evaluar si la ausencia de estacionalidad se mantiene en las hembras media sangre. En sistemas de producción de carne la raza Santa Inês se emplea en cruzamientos con razas de aptitud carnicera para mejorar la conformación de la canal incrementando la masa muscular.

Dada la practicidad para realizar el estudio citológico vaginal en ovejas, es necesario continuar con nuevos ensayos con diferentes esquemas de toma de muestras, ajustando la técnica de coloración y analizando en conjunto las modificaciones hormonales y el desarrollo de ondas foliculares a través de ultrasonografía para poder interpretar las modificaciones que ocurren durante el ciclo estral

## Anexo 2: Cálculos Estadísticos

### Capítulo 2 “Ciclicidad en ovejas Santa Inês e Ideal en el subtrópico argentino”\*

#### Análisis de Chi cuadrado para ciclicidad

Nueva: 19/3/2019 - 10:04:33

#### Tablas de contingencia

Frecuencias: frecuencias

Criterio de Estratificación: Estación

#### Tabla Marginal

Frecuencias absolutas

En columnas: Est. Repr.

Raza	cíclica	no cíclica	Total
ID	110	190	300
SI	200	100	300
Total	310	290	600

Estadísticos para la tabla marginal

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	54,06	1	<0,0001
Chi Cuadrado MV-G2	54,91	1	<0,0001
Irwin-Fisher bilateal..	-0,30		<0,0001
Coef.Conting.Cramer	0,21		
Coef.Conting.Pearson	0,29		
Coeficiente Phi	-0,30		

### Cocientes de chance (odds ratio) y riesgos relativos

<u>Estadístico</u>	<u>Estim</u>	<u>LI 95%</u>	<u>LS 95%</u>
Odds Ratio 1/2	0,29	0,21	0,40
Odds Ratio 2/1	3,45	2,47	4,83

### Estadísticos corregidos por efecto de estrato

*Prueba de Cochran-Mantel-Haenszel*

<u>Estadístico</u>	<u>gl</u>	<u>p</u>
60,37	1	<0,0001

### Cocientes de chance (odds ratio) de Mantel-Haenszel

<u>Estadístico</u>	<u>Estim</u>	<u>LI 95%</u>	<u>LS 95%</u>
MH Odds Ratio(1/2)	0,28	0,22	0,36
MH Odds Ratio(2/1)	3,57	2,77	4,61

### ANOVA PESO CORPORAL CON ESTADO REPRODUCTIVO

Nueva: 19/3/2019 - 15:06:19

### Análisis de la varianza

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R<sup>2</sup></u>	<u>R<sup>2</sup>Aj</u>	<u>CV</u>
PV prom	12	0,00	0,00	6,08

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	0,00	1	0,00	0,00	0,9894
Est. Repr.	0,00	1	0,00	0,00	0,9894
Error	45,18	10	4,52		
Total	45,18	11			

### ANOVA PESO CORPORAL CON RAZA

Nueva: 19/3/2019 - 15:14:43

#### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
PV prom	12	0,00	0,00	6,08

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	0,03	1	0,03	0,01	0,9366
Raza	0,03	1	0,03	0,01	0,9366
Error	45,15	10	4,52		
Total	45,18	11			



## ANOVA PESO CORPORAL CON ESTACIÓN

Nueva: 19/3/2019 - 15:16:51

### **Análisis de la varianza**

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R<sup>2</sup></u>	<u>R<sup>2</sup>Aj</u>	<u>CV</u>
PV prom	12	0,31	0,16	5,32

### **Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)**

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>Valor p</u>
Modelo	14,14	2	7,07	2,05	0,1846
Estación	14,14	2	7,07	2,05	0,1846
Error	31,04	9	3,45		
Total	45,18	11			

## Capítulo 3

### **ENSAYO SINCRONIZACIÓN 5 Y 7 DIAS DE ESPONJA**

Nueva: 16/5/2019 - 14:36:07

### **Tablas de contingencia**

*Frecuencias: Est. Repr.*

*Criterio de Estratificación: Raza*

## Tabla Marginal

*Frecuencias absolutas*

*En columnas:*

<u>tto</u>	<u>FA</u>	<u>Total</u>
5 días	71	71
5 días	67	67
7 días	124	124
<u>Total</u>	<u>262</u>	<u>262</u>

*Estadísticos para la tabla marginal*

<u>Estadístico</u>	<u>Valor</u>	<u>gl</u>	<u>p</u>
Chi Cuadrado Pearson	23,45	2	<0,0001
Chi Cuadrado MV-G2	22,28	2	<0,0001
Coef.Conting.Cramer	0,30		
<u>Coef.Conting.Pearson</u>	<u>0,29</u>		

## Estadísticos corregidos por efecto de estrato

*Prueba de Cochran-Mantel-Haenszel*

<u>Estadístico</u>	<u>gl</u>	<u>p</u>
<u>0,00</u>	<u>2</u>	<u>&gt;0,9999</u>

## Chi 2 de ovejas de raza Santa Inês

Nueva: 16/5/2019 - 14:39:51

### Tablas de contingencia

*Frecuencias: Est. Repr.*

*Frecuencias absolutas*

*En columnas:*

<u>Tto</u>	<u>FA</u>	<u>Total</u>
5 días	71	71
7 días	47	47
<u>Total</u>	<u>119</u>	<u>119</u>

<u>Estadístico</u>	<u>Valor</u>	<u>gl</u>	<u>p</u>
Chi Cuadrado Pearson	4,87	1	0,0273
Chi Cuadrado MV-G2	4,91	1	0,0267
Coef.Conting.Cramer	0,20		
<u>Coef.Conting.Pearson</u>	<u>0,20</u>		

## Chi 2 de ovejas de raza Ideal

Nueva: 16/5/2019 - 14:48:10

### **Tablas de contingencia**

*Frecuencias: Est. Repr.*

*Frecuencias absolutas*

*En columnas:*

<u>Tto</u>	<u>FA</u>	<u>Total</u>
5 días	67	67
7 días	77	77
<u>Total</u>	<u>144</u>	<u>144</u>

<u>Estadístico</u>	<u>Valor</u>	<u>gl</u>	<u>p</u>
Chi Cuadrado Pearson	0,74	1	0,3883
Chi Cuadrado MV-G2	0,74	1	0,3881
Coef.Conting.Cramer	0,07		
<u>Coef.Conting.Pearson</u>	<u>0,07</u>		

## ENSAYO CON 200 Y 300 UI DE ECG

Nueva: 16/5/2019 - 09:19:07

### Chi cuadrado para porcentaje de hembras en celo

#### Tablas de contingencia

*Frecuencias: Celo*

*Frecuencias absolutas*

*En columnas:*

<u>Tratamiento</u>	<u>FA</u>	<u>Total</u>
200 UI	85	85
300 UI	68	68
<u>Total</u>	<u>153</u>	<u>153</u>

<u>Estadístico</u>	<u>Valor</u>	<u>gl</u>	<u>p</u>
Chi Cuadrado Pearson	1,96	1	0,1612
Chi Cuadrado MV-G2	1,97	1	0,1608
Coef.Conting.Cramer	0,11		
<u>Coef.Conting.Pearson</u>	<u>0,11</u>		

### Análisis de la varianza Intervalo Sincronización-Celo

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R<sup>2</sup></u>	<u>R<sup>2</sup>Aj</u>	<u>CV</u>
<u>Intervalo al celo (h</u>	<u>42</u>	<u>0,15</u>	<u>0,13</u>	<u>23,83</u>

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	962,84	1	962,84	7,03	0,0114
UI eCG	962,84	1	962,84	7,03	0,0114
Error	5477,78	40	136,94		
Total	6440,61	41			

### Chi cuadrado para porcentaje de hembras preñadas

#### Tablas de contingencia

Frecuencias: % preñadas

Frecuencias absolutas

En columnas: UI ecg

	200,00	300,00	Total
	78	79	156
Total	78	79	156

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	0,01	1	0,9426
Chi Cuadrado MV-G2	0,01	1	0,9426
Coef.Conting.Cramer	0,01		
Coef.Conting.Pearson	0,01		