

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE VETERINARIA**

**Efecto de la eCG administrada luego de la inseminación sobre el  
desarrollo y actividad del cuerpo lúteo en ovinos**

**“por”**

**Enrique CASTELLS  
Leonardo FROS**

TESIS DE GRADO presentada como uno de  
los requisitos para obtener el título de Doctor  
en Ciencias Veterinarias

Orientación: Producción Animal

MODALIDAD: Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2016**

## PÁGINA DE APROBACIÓN

Presidente de mesa:

.....

Dr. Danilo Fila

Segundo miembro:

.....

Dr. Alejo Menchaca

Tercer miembro:

.....

Dr. Rafael Aragunde

Cuarto miembro:

.....

Dra. Camila García Pintos

Fecha:

14/06/2016

Autores:

Enrique Castells Devincenzi

.....

Leonardo Fros Duarte

.....

## **AGRADECIMIENTOS**

A nuestro tutor, Dr. Alejo Menchaca. Por la enseñanza brindada y la confianza para darnos la oportunidad de realizar este trabajo.

A nuestra Co-tutora, Dra. Camila García Pintos. Por el tiempo, dedicación y enseñanza en la realización ensayo experimental, así como la colaboración en la corrección del trabajo escrito.

Al Dr. Richard Núñez. Por el Material brindado, y colaboración en el trabajo escrito.

A todo el personal del Instituto de Reproducción Animal (IRAUy), por el apoyo constante.

A nuestras familias por el apoyo incondicional, paciencia y esfuerzo que han hecho a lo largo de toda la carrera.

A Lu y Mily por el apoyo, ayuda y estímulo diario para alcanzar nuestras metas.

A nuestros amigos de siempre que han estado presentes, dando siempre el apoyo necesario para seguir adelante.

A los compañeros y amigos de la facultad. Que de una forma u otra siempre han estado colaborando.

A la Facultad de Veterinaria, UdelaR.

Al personal de la Biblioteca de la Facultad de Veterinaria por su ayuda en la corrección de la Bibliografía citada.

A la Fundación IRAUy, por la financiación del proyecto.

## TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN .....	2
AGRADECIMIENTOS .....	3
LISTA DE GRÁFICOS.....	6
1. RESUMEN .....	7
2. SUMMARY .....	8
3. INTRODUCCIÓN.....	9
3.1 Producción ovina en Uruguay .....	9
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	10
4.1 Control del ciclo estral en ovinos.....	10
4.2 Luteólisis .....	13
4.3 Reconocimiento materno de la preñez.....	15
4.4 Uso de eCG en ovinos .....	16
5. HIPÓTESIS .....	18
6. OBJETIVOS .....	18
6.1 Objetivo General .....	18
6.2 Objetivos Específicos.....	18
7. MATERIALES Y MÉTODOS .....	19
7.1 Animales, manejo e instalaciones .....	19
7.2 Determinación de la Condición Corporal.....	19
7.3 Grupos experimentales .....	20
7.4 Inseminación artificial.....	20
7.5 Ultrasonografía ovárica .....	21
7.6 Sangrado, procesamiento y determinaciones hormonales .....	22
7.7 Análisis estadístico.....	23

8. RESULTADOS .....	24
8.1 Concentraciones séricas de progesterona .....	24
8.2 Área luteal .....	26
9. DISCUSIÓN .....	28
10. CONCLUSIÓN .....	29
11. BIBLIOGRAFÍA .....	30

## LISTA DE GRÁFICOS Y FIGURAS

Figura 1. Diseño experimental del ensayo.....	20
Gráfico 1. Concentración de Progesterona sérica.....	25
Gráfico 2. Evolución del Área Luteal.....	27

## 1. RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la administración de Gonadotrofina Coriónica equina (eCG) al Día 5 y 10 luego de la Inseminación Artificial a Tiempo Fijo (IATF) en ovejas Corriedale. Los animales fueron sincronizados usando un tratamiento con progesterona durante seis días mediante la inserción de un dispositivo intravaginal con 0,3g de progesterona (DICO®) asociado a una dosis intramuscular (IM) de cloprostenol sódico (análogo de Prostaglandina F<sub>2α</sub>, Ciclase® DL), y una dosis IM de 300 UI de eCG (Novormon®) al momento del retiro del dispositivo. A las 52 horas de retirados los dispositivos se realizó una inseminación intrauterina a tiempo fijo, tomando como Día 0 para el ensayo el día de la IATF. Las ovejas fueron agrupadas según condición corporal para ser asignadas aleatoriamente a los siguientes grupos experimentales: tratamiento con 400UI de eCG al Día 5 (n=10), 400UI de eCG al Día 10 (n=10) y sin tratamiento, Grupo Control (n=10). A partir de la IATF se extrajo una muestra de sangre diariamente para medir las concentraciones séricas de progesterona y se realizó ultrasonografía transrectal, con el fin de cuantificar y medir el diámetro de las estructuras luteales hasta el Día 30 en las ovejas gestantes, y hasta la ovulación en las no gestantes. Los resultados mostraron que hubo una diferencia significativa en las concentraciones séricas de progesterona y el área luteal para las ovejas tratadas al Día 10, en relación al Grupo Control. No se observó diferencias significativas en ninguno de los dos parámetros en el grupo al cual se administró la eCG al Día 5.

Como conclusión, la administración de eCG 10 días luego de la IATF tiene efectos positivos en el tamaño y función del cuerpo lúteo, ya que induce un mayor desarrollo de esta estructura con el consecuente aumento en las concentraciones séricas de progesterona.

## 2. SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the effect of the administration of equine Chorionic Gonadotropin (eCG) on Days 5 and 10 after Fixed-timed Artificial Insemination (FTAI) in adult Corriedale ewes. Animals were synchronized administering a 6 days progesterone releasing intravaginal (PRID) device (0.3g progesterone, DICO®), one intramuscular dose of PGF2 $\alpha$  analogue (Ciclose® DL), and an intramuscular dose of 300 UI of eCG (Novormon®) administered at the time of device removal. Fixed-time intrauterine insemination was performed 52 hours after device removal and the day of FTAI was defined as Day “0” of the experiment. After insemination, ewes were grouped by body condition score to be randomly assigned for either no treatment (n=10) or administration of 400 UI of eCG on Day 5 (n=10) or 400 UI of eCG on Day 10 (n=10). Daily blood samples were collected to measure blood progesterone concentration, and daily ovarian examinations by ultrasonography were carried out to quantify and measure diameter of luteal structures Individual data was registered for each animal every day. In pregnant ewes it was done since Day “0” up to Day 30 after FTAI, and in non-pregnant ewes since Day “0” until ovulation day. Results showed there was a significant difference on progesterone concentrations and luteum area for ewes treated with eCG on Day 10 related to Control Group. There were no significant differences in none of both parameters when ewes were treated with eCG on Day 5.

In conclusion, administration of eCG 10 days after the FTAI has a positive effects on the size and function of the corpus luteum, as it induces to greater development of this structure with the consequent increase in serum concentrations of progesterone.



### **3. INTRODUCCIÓN**

#### **3.1 Producción ovina en Uruguay**

La evolución del stock ovino en nuestro país en las últimas décadas muestra una variación importante. Desde 1980 a 1991 se pasó de 20 a 26 millones de cabezas lanares (M.G.A.P., 1980-1991). Según cifras de DI.CO.SE. el stock ovino en el año 1991 era de 25,9 millones de lanares que estaba compuesto por 415 mil carneros, 10,6 millones de ovejas de cría, 1,5 millones de ovejas de consumo, 3,3 millones de corderas diente de leche, 1,2 millones de borregas de 2 y 4 dientes, 2,7 millones de corderos diente de leche, 5,4 millones de capones y medio millón de corderos al pie. Luego, acompañando la crisis lanera mundial que se inició en la década de los 90 (S.U.L., 2008), desde el año 1992 el stock ovino sufre una caída brusca llegando a 7,4 millones de cabezas en 2014 (M.G.A.P., 1992-2015) de las cuales el 53,3% corresponde a ovejas de cría, 5% a borregas de 2 a 4 dientes (sin encarnerar), 13,3% a borregas diente de leche, 11,1% a borregos diente de leche, y el resto del stock está conformado por carneros, capones, ovejas de descarte, y corderos y corderas (M.G.A.P., 2015).

Históricamente, Uruguay se ha caracterizado por tener una tasa reproductiva ovina baja, acompañada de una alta mortalidad neonatal. Obteniendo así promedios nacionales de señalada en el entorno del 59% entre los años 1996 y 2004, que luego mejoró alcanzando 73% de promedio en los siguientes años (Salgado, 2013).

La producción ovina en Uruguay es desarrollada principalmente en suelos de basalto, pertenecientes a los departamentos de Artigas, Salto, Tacuarembó, Paysandú y Durazno (M.G.A.P., 2015).

## **4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **4.1 Control del ciclo estral en ovinos**

El ciclo estral se define como los días comprendidos entre dos celos consecutivos, donde ocurre una serie de eventos que se repiten sucesivamente. Este patrón cíclico se inicia en la pubertad y se prolonga durante toda la vida, pudiéndose observar interrupciones de los ciclos (anestros) por causas fisiológicas o patológicas (Ungerfeld, 2002).

En la oveja, tiene una duración aproximada de 17 días (variando entre 15 y 19). Se divide en dos períodos, una fase luteal, que se extiende desde el Día 2 o 3 del ciclo estral hasta el día de la luteólisis (Día 13 o 14); y una fase folicular, que va desde la luteólisis hasta el Día 2 del ciclo, considerando el estro como Día 0 (Rubianes, 2000). La fase folicular comienza con la regresión del cuerpo lúteo (CL), que conlleva una disminución en la producción de progesterona, aumenta la frecuencia de los pulsos de hormona luteinizante (LH), elevando los niveles basales de la misma hasta llegar al pico preovulatorio que desencadena la ovulación (Thiery y Martin, 1991). La fase luteal está dividida en metaestro (desde que termina la expresión de los signos del celo hasta la formación de un CL activo) y diestro (con presencia de CL activo), culminando con la luteólisis. La fase folicular está dividida en proestro (desde que comienza la luteólisis, hasta el inicio del estro) y finalmente el estro (Ungerfeld, 2002).

El ciclo estral está regulado principalmente por cuatro órganos que son el hipotálamo, la hipófisis, el ovario y el útero. Dichos órganos se comunican entre sí mediante señales endócrinas, principalmente determinadas por diferentes hormonas: hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) secretada por el hipotálamo, LH y hormona folículo estimulante (FSH) ambas secretadas por la hipófisis; estradiol, inhibina y progesterona de origen ovárico, y prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ) secretada por el útero (Ungerfeld, 2002).

El estro se define como el momento en el cual la hembra acepta la monta por parte del macho; en la oveja tiene una duración aproximada de 24 horas. El estrógeno es la hormona predominante en ese período, secretada por el folículo preovulatorio (Ungerfeld, 2002).

La progesterona ejerce un efecto negativo sobre el “Eje Hipotálamo, Hipófisis, Ovario”. Cuando se produce la luteólisis hay una disminución en la concentración de progesterona sérica, por lo tanto, comienzan a incrementar los pulsos de LH y a elevar sus niveles basales que generan un proceso de retroalimentación positiva entre GnRH, LH y Estrógenos, finalmente se produce una descarga masiva de LH produciendo así el llamado “pico de LH” (Ungerfeld, 2002). Dicho pico induce la ovulación del o los folículos preovulatorios, que también conduce a la luteinización de la estructura remanente o cuerpo hemorrágico, con la subsecuente formación del CL. Esta estructura es una glándula transitoria que se encuentra presente normalmente sólo durante una fase del ciclo estral y la gestación. Hay un cambio estructural y funcional en las células tecales y células de la granulosa, aumenta su peso a medida que se va vascularizando y tiene como función principal la secreción de progesterona (Rubianes, 2000). El potencial esteroideogénico y la respuesta a la LH por parte de las células luteales van en progreso durante el desarrollo luteal (Niswender y col., 2000).

Los cambios estructurales que sufren las células de la granulosa y de la teca mencionados anteriormente, dan lugar a dos tipos de células del CL: las células luteales grandes, derivadas de las células de la granulosa y las células luteales pequeñas, derivadas de las células de la teca. Las células luteales grandes aumentan al doble su tamaño, permaneciendo su número constante, no responden a la LH y son la principal fuente de producción de progesterona basal (Niswender y col., 2000). Las células luteales pequeñas en cambio mantienen su sensibilidad a la LH con un aumento en la producción de progesterona luego de la acción de esta hormona (Baird, 1992). Estas células pequeñas aumentan 5 veces su número desde el Día 4 al Día 16 del ciclo estral en la oveja (Niswender y col., 2000). También, se ve un aumento de aproximadamente 5 veces en los receptores a LH, desde el Día 9 al Día 12 del ciclo estral (Niswender y col., 2000).

La progesterona ejerce varios efectos sobre el ciclo:

- Actúa como *priming* sobre los centros comportamentales del cerebro, favoreciendo el comportamiento del estro inducido por las altas concentraciones de estrógenos durante la fase folicular.
- Modula el desarrollo folicular para que luego de la ovulación inducida por el siguiente pico de LH, el CL formado tenga dimensiones normales.
- Inhibe la secreción de PGF2 $\alpha$  por parte de la mucosa uterina durante los primeros días de la fase luteal.
- Ejerce una función frenadora en la liberación pulsátil de la GnRH por lo que se inhibe la secreción tónica de la LH (Rubianes, 2000).

Hacia el Día 11 o 12 del ciclo, comienza una retroalimentación positiva entre la oxitocina (liberada por el CL) y la PGF2 $\alpha$  endometrial, que tiene como consecuencia la lisis del CL, generando una caída en los niveles de progesterona sérica. Los estrógenos tienen un rol fundamental en este mecanismo, ya que son los que controlan la cantidad de receptores para oxitocina en las células del endometrio (Rubianes, 2000).

La oveja es poliéstrica estacional de día corto, por lo tanto, existe un anestro estacional, período en el cual la retroalimentación entre hipotálamo, hipófisis y ovarios es principalmente negativa, y no se produce la cascada desencadenante de la ovulación. La reaparición de la ciclicidad está controlada por el fotoperiodo. Durante las estaciones de día corto aumenta la liberación de melatonina, hormona producida por la glándula pineal durante las horas de oscuridad. Esta variación en la liberación de melatonina provoca una estimulación o inhibición en la activación del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal. En el caso de los ovinos, un aumento en las concentraciones de melatonina desencadena una activación de este eje (Rubianes, 2000).

## 4.2 Luteólisis

La luteólisis se define como la lisis o desaparición estructural del CL (Niswender y col., 2000). La vida del mismo depende del balance entre factores luteotróficos (estimulan el funcionamiento normal del CL) y factores luteolíticos (desencadenantes de la lisis del CL). La LH es el factor luteotrófico más importante ya que mediante su “pico” determina la formación del CL, además contribuye al mantenimiento del mismo mediante sus pulsos. Otro factor luteotrófico que tiene un rol importante en algunas especies, como cerda y oveja, es la prolactina. La  $PGF2\alpha$  es la sustancia luteolítica más importante en la mayoría de las especies (Ungerfeld, 2002).

Si no hay fecundación, o existe una falla en el reconocimiento materno de la preñez, hacia el Día 12 del ciclo se produce la luteólisis (Ungerfeld, 2002). En la luteólisis normal se producen dos acontecimientos estrechamente relacionados, la pérdida de la capacidad de sintetizar y secretar progesterona, seguida de la lisis progresiva de las células que componen el CL (Niswender y col., 2000).

La  $PGF2\alpha$  se produce en el endometrio uterino, el que fue estimulado por la progesterona durante el diestro, y luego responde a los estrógenos secretados por un folículo en desarrollo. Además, la progesterona estimula al endometrio a que aumente sus reservas de fosfolípidos, principal fuente de ácido araquidónico, precursor de las prostaglandinas, por lo que estaría facilitando la luteólisis (Ungerfeld, 2002).

El útero libera  $PGF2\alpha$  de manera pulsátil secretando de tres a cuatro pulsos por día al final del ciclo y son necesarios al menos 5 pulsos para desencadenar la luteólisis. A cada pulso de  $PGF2\alpha$  secretado por el endometrio, el CL responde secretando oxitocina mientras transcurre la luteólisis generando así un proceso de retroalimentación positiva, el cual está inhibido durante las primeras etapas del ciclo estral. Esto es consecuencia de la suspensión de la formación de receptores endometriales a la oxitocina por acción de la progesterona (Ungerfeld, 2002). Cuando la progesterona deja de actuar y aumenta la concentración de los estrógenos secretados por el folículo dominante, estos

últimos inducen un aumento de los receptores uterinos a la oxitocina y así se desencadena el mecanismo de retroalimentación positiva entre la oxitocina luteal y la PGF2 $\alpha$  uterina. Debido a que durante la fase luteal el CL no ha recibido ningún estímulo para secretar oxitocina por parte de la PGF2 $\alpha$  uterina, el primer estímulo desencadenante de la luteólisis es la oxitocina hipofisaria, que estimula los receptores endometriales a secretar PGF2 $\alpha$  generando así la retroalimentación positiva que lleva a la lisis del CL (Ungerfeld, 2002).

La PGF2 $\alpha$  proveniente del útero entra a la arteria ovárica directamente desde la vena útero-ovárica mediante un mecanismo de pasaje a contracorriente a través de las anastomosis arterio-venosa de esa región. De esta manera no pasa a la circulación sistémica, donde sería enzimáticamente inactivada en los pulmones (Niswender y col., 2000).

De acuerdo a lo descrito por Niswender y col., (2000) los principales mecanismos por los cuales la PGF2 $\alpha$  provoca la disfunción y lisis de las células luteales son:

- Reducción del flujo sanguíneo hacia el CL, lo que puede causar una regresión de las células luteales por privación de nutrientes y fallas en la síntesis de progesterona, a causa de una disminución en el aporte de sustratos necesarios para la esteroidogénesis.
- Las células lúteas primero pierden su capacidad esteroidogénica y luego se reducen en número y tamaño.
- El primer grupo de células en sufrir cambios morfológicamente drásticos son las del endotelio de los capilares de los CL. Hay una regulación a la baja de los receptores de las hormonas luteotróficas.

Por todo lo expuesto en esta sección, es evidente que la progesterona juega un rol central en el mantenimiento de la actividad del CL al evitar en cierta forma el origen del mecanismo luteolítico. Por esta razón resulta interesante considerar a esta hormona para plantear estrategias que permitan mantener la actividad luteal y favorecer la gestación.

### 4.3 Reconocimiento materno de la preñez

Existe una serie de cambios endócrinos que deben producirse para permitir el desarrollo de la gestación. Luego de la fecundación, comienza un período crítico denominado “reconocimiento materno de la preñez”, el cual requiere de señales por parte del *conceptus* hacia el endometrio en pro de evitar la luteólisis y el descenso de los niveles de progesterona (Thatcher y Staples, 1994). De no llevarse a cabo dichas señales comienza la luteólisis y no se produce la implantación del embrión (Senger, 2005).

Según Bazer y Spencer (1997), la liberación pulsátil luteolítica de PGF<sub>2</sub>α es inhibida por una proteína secretada por el trofoectodermo mediante la supresión de la transcripción de genes para receptores de estrógeno y oxitocina, denominada interferón tau (IFN-T). En la misma línea de supervivencia embrionaria, hay una asociación positiva con la progesterona luego de la ovulación. Al incrementar la concentración de esta hormona, a partir del período ovulatorio, aumenta la probabilidad de supervivencia embrionaria (Ashworth y col., 1989).

El IFN-T se produce en ovejas gestantes de los 11 a los 23 días luego del estro, con la máxima producción del mismo entre los días 14 y 16 (Niswender y col., 2000).

El IFN-T inhibe la luteólisis debido a que:

- Estabiliza y aumenta progresivamente los receptores de progesterona.
- Impide la síntesis de receptores a estrógenos en el endometrio.
- Impide la síntesis de receptores endometriales a oxitocina, inhibiendo de esta forma la síntesis de PGF<sub>2</sub>α por parte del endometrio (Niswender y col., 2000).

El efecto antiluteolítico del IFN-T es dependiente de la progesterona y sus receptores. En otras palabras, cuanto más elevadas sean las concentraciones de progesterona en sangre, mayor será el desarrollo de *conceptus*, la producción de IFN-T y la probabilidad que se produzca el reconocimiento de la gestación

(Mann y Lamming, 2001). De acuerdo a lo mencionado anteriormente, cualquier estrategia dirigida a mejorar la actividad luteal podría favorecer la producción de IFN-T y el éxito de la gestación.

#### **4.4 Uso de eCG en ovinos**

Las gonadotrofinas cumplen un rol fundamental en la estimulación de las gónadas tal como lo indica su nombre. Existen dos tipos: las gonadotrofinas hipofisarias (LH y FSH) y las gonadotrofinas coriónicas (Gonadotrofina Coriónica Humana (hCG) y Gonadotrofina Coriónica Equina (eCG) (Ungerfeld, 2002).

La eCG fue descubierta hace más de 80 años, como un factor que se encuentra en la circulación de la yegua gestante durante el primer tercio de la gestación (Revisado por Murphy, 2012).

En la yegua induce la formación de cuerpos lúteos accesorios para mejorar el reconocimiento y mantenimiento de la gestación temprana. Existen numerosas aplicaciones para la eCG en otras especies domésticas, incluyendo la inducción a la pubertad, la reducción de anestros postpartos, la superovulación y más recientemente, la mejora de la fertilidad (Revisado por Murphy, 2012).

La eCG es una hormona glicoproteica con un alto contenido (45%) de carbohidratos (Humphrey y col., 1979), siendo el ácido siálico el que se encuentra en mayor proporción (Martinuk y col., 1991). El ácido siálico cumple una función importante en la regulación de la actividad biológica de las hormonas glicoproteicas, ya que su presencia permite que estas hormonas persistan mayor tiempo en la circulación después de su secreción o administración. Como resultado, tiene una larga vida media en sangre, que en la vaca es de aproximadamente 40 horas, y se encuentra todavía presente en el suero de 10 a 16 días después de la administración (Martinuk y col., 1991).

Está constituida por dos subunidades, alfa y beta, la primera tiene una secuencia de aminoácidos igual a la e-LH-alfa (Hafez 1989) y muy parecida a la e-FSH-alfa



(Pierce y Parsons 1981). La estructura de la sub unidad beta es exacta a la e-LH-beta (Bousfield y col., 1987).

En la yegua la hormona eCG comienza a ser detectada a nivel sanguíneo en el entorno al día 32 de gestación (Nett y col. 1975), hasta alrededor del día 139 (Kasper y col., 1987). Esta hormona es secretada a través del trofoblasto en contacto con el endometrio materno (Allen y Moor 1972; Hafez 1989). Una vez detectada a nivel sanguíneo se comprueba el incremento de los niveles de progesterona (Bergfelt y col., 1989). Diversos estudios han analizado los efectos de la eCG en la gestación de la yegua; hay controversia en la existencia de respuesta en los receptores de FSH, ya que hay autores que afirman que esta hormona no es reconocida por éstos, (Steward y Allen 1979; Steward y Allen 1981) y otros plantean que existe un desarrollo folicular con múltiples ovulaciones y la consecuente formación de cuerpos lúteos accesorios, que favorecen la preñez (Hafez 1989). Lo que sí se puede afirmar es su efecto LH, (Moore y Ward 1980) cuando se corroboran cambios en número y peso de estructuras luteales, así como también mayores concentraciones de progesterona relacionadas a concentraciones de eCG (Nett y Pickett 1979; Squires y col., 1979).

Se observó que su administración en otras especies, produce efectos biológicos similares a los producidos por LH y FSH, (Roser y col., 1986) ya que se une a sus respectivos receptores de LH y FSH *in vitro* (Licht y col., 1979). De hecho, es utilizada para inducir desarrollo folicular, en tratamientos superovulatorios en ovinos (Rubianes y col., 1995).

Por lo mencionado en cuanto al rol de la progesterona en las pérdidas embrionarias tempranas, se podría recurrir a la eCG para estudiar su potencial efecto luteotrófico con el fin de mejorar la actividad luteal y evitar dichas pérdidas.

## **5. HIPÓTESIS**

La administración de eCG, 5 o 10 días post-inseminación en la oveja, estimula la función del cuerpo lúteo y la producción de cuerpos lúteos accesorios, aumentando así las concentraciones séricas de progesterona.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1 Objetivo General**

Evaluar el efecto de la eCG administrada luego de la inseminación sobre la concentración de progesterona y el área luteal los primeros 30 días de gestación.

### **6.2 Objetivos Específicos**

Evaluar el efecto de la eCG sobre:

- Las concentraciones séricas de progesterona en los primeros 30 días luego de la inseminación para las ovejas preñadas.
- El tamaño y desarrollo diario del cuerpo lúteo y la formación de cuerpos lúteos accesorios.

## **7. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **7.1 Animales, manejo e instalaciones**

El experimento se realizó en los meses de Marzo y Abril en el Instituto de Reproducción Animal Uruguay (IRAUy), ubicado en Camino Cruz del Sur 2250, Jacksonville, Montevideo, Uruguay.

Se utilizaron 30 ovejas Corriedale multíparas de más de 4 años de edad cuya condición corporal promedio era de  $3,3\pm 0,5$  (escala 0 a 5). Los animales se mantuvieron sobre campo nativo y se suplementaron diariamente con fardo de alfalfa y ración balanceada (2000 y 300 g/animal/día en promedio, respectivamente), con agua para beber *ad libitum*.

Quince días antes de comenzar el experimento las ovejas recibieron un tratamiento antiparasitario y tuvieron un período de adaptación al manejo. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética en el Uso de Animales de la Fundación IRAUy certificado por la Comisión Nacional de Experimentación Animal de Uruguay.

### **7.2 Determinación de la Condición Corporal**

La condición corporal (CC) es una medida subjetiva del estado físico y nutricional de los animales. La escala utilizada oscila entre 0 y 5 (0 emaciada y 5 obesa), descrita por Russel y col., (1969). Se vio una evolución en la CC promedio; ésta pasó de  $2.89\pm 0.56$  15 días previos al inicio ensayo a  $3.3\pm 0.50$  el día de la IATF. Esta última evaluación fue usada para asignarle a cada oveja un grupo experimental.

### 7.3 Grupos experimentales

El diseño experimental consistió en realizar una sincronización e inseminación de los animales. Luego de realizada la Inseminación Artificial a Tiempo Fijo (IATF), se dividieron en diez bloques de acuerdo a la CC individual; y posteriormente fueron asignados de forma aleatoria en tres grupos experimentales.

- Grupo 1: administración 400 UI de eCG intramuscular (IM) al día 5 (n=10).
- Grupo 2: administración 400 UI de eCG IM al día 10 (n= 10).
- Grupo Control: sin administración de eCG (n=10).

Figura 1. Diseño experimental del ensayo



### 7.4 Inseminación artificial

La sincronización de la ovulación consistió en la utilización de dispositivos intravaginales de silicona inerte, impregnado con 0,3g de progesterona natural de liberación controlada (DICO®, Syntex, Buenos Aires, Argentina) durante seis días. Al retirar los dispositivos, fueron administradas 300UI IM de eCG (Novormon®, Syntex, Buenos Aires, Argentina) y 125µg IM de clorprostenol sódico (análogo de PGF2α con Ciclase® DL, Syntex, Buenos Aires, Argentina).

Las ovejas se mantuvieron en ayuno sólido durante las 24 horas previas a la inseminación y en ayuno líquido durante las últimas 12 horas.

A las 52 horas del retiro del dispositivo se realizó IATF, este procedimiento fue efectuado por vía intrauterina mediante laparoscopia (Karl Storz Hopkins, Tuttlingen, Germany), con semen fresco colectado por vagina artificial, de un carnero previamente evaluado por motilidad y morfología espermática, utilizando 100 millones de espermatozoides por oveja (500 millones de espermatozoides/mL) diluidos en leche descremada ultra-pasteurizada. Luego de la dilución el semen se mantuvo a 30°C y fue utilizado dentro de la primera hora de colectado.

Se colocaron en una camilla especial para esta técnica con una inclinación de 45° en posición decúbito dorsal. A continuación, se realizaron dos pequeñas incisiones para facilitar el ingreso de los *trocars*, luego a través de uno de ellos se colocó el laparoscopio y por el otro la pipeta de inseminación. En la exploración se ubicaron los cuernos del útero y con la pipeta de inseminación se aplicó en cada cuerno la mitad de la dosis de semen antes mencionada.

## **7.5 Ultrasonografía ovárica**

A lo largo del experimento se realizó un monitoreo diario por ultrasonografía para evaluar y registrar el desarrollo, la evolución y la ubicación relativa de las estructuras luteales en el ovario. El mismo fue llevado a cabo por ultrasonografía transrectal con un ecógrafo modelo Well-D 9618V, de procedencia China, con sonda lineal 7.5MHz. El procedimiento fue ejecutado por el mismo operador; en ovejas gestantes fue durante los 30 días siguientes a la inseminación, y en ovejas no gestantes fue hasta la siguiente ovulación. El examen de ovario fue grabado en video con dos archivos por oveja por día (un video para cada ovario) para una mejor apreciación y posterior interpretación de los datos recabados.

Las ovejas fueron inmovilizadas mediante la utilización de un cepo dentro de un galpón y un brete de dimensiones 4 x 3 m. El área del CL fue calculada utilizando como referencias el promedio entre los diámetros menor y mayor, de acuerdo a lo reportado por Kastelic y col., (1990).

Con el fin de entrenar al personal y acostumbrar a los animales a las maniobras realizadas, el examen ultrasonográfico comenzó 15 días antes del inicio de la sincronización, hasta finalizar el experimento. En los días transcurridos entre el inicio del tratamiento de sincronización y la IATF no se realizó ultrasonografía para evitar alguna situación de estrés durante la sincronización de la ovulación.

## **7.6 Sangrado, procesamiento y determinaciones hormonales**

En el mismo período en que se realizó la ultrasonografía a las ovejas gestantes y no gestantes (30 días y hasta la ovulación, respectivamente), dos personas fueron encargadas de extraer 10mL de sangre punción de vena yugular de cada animal, en ayuno. Las muestras fueron colocadas en tubos rotulados con la fecha e identificación de cada animal. Dentro de los 60 minutos post extracción, las muestras fueron centrifugadas a 3000 RPM durante 20 minutos para separar el suero y colocarlo en tubos Eppendorf y así mantenerlas congeladas a -20°C.

Las concentraciones séricas de progesterona fueron determinadas mediante la técnica de radioinmunoanálisis (RIA) (Sirois y Fortune, 1990), en el Laboratorio de Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay. La misma se llevó a cabo por duplicado mediante RIA en fase sólida, utilizando kits de DPC específicos (Diagnostic Products Corporation, Los Ángeles, CA, USA).

La sensibilidad del ensayo fue de 0,1ng/ml y el coeficiente de variación intraensayo fue de 7,5%, 5,5% y 7,7%, para los valores bajo ( $1,0 \pm 0,5$ ng / ml), medio ( $2,2 \pm 0,2$ ng/ml) y alto ( $8,2 \pm 0,5$ ng/ml) del control, respectivamente. Los coeficientes interensayo fueron 9,9%, 12,3% y 9,8% para los valores bajo, medio y alto del control, respectivamente.

## **7.7 Análisis estadístico**

Las dos variables analizadas: área luteal y concentraciones séricas de progesterona, se compararon mediante procedimientos mixtos (StataCorp, 2013). El modelo mixto incluye tratamiento, Día y su interacción.

## **8. RESULTADOS**

Como introducción interpretativa para los resultados cabe destacar que antes de la inseminación y como fue mencionado anteriormente, se formaron tres grupos con diez ovejas en cada uno; nueve de cada grupo ovularon, y de las 30 inseminadas se preñaron siete ovejas del Grupo Control, cuatro ovejas del grupo tratado con eCG al Día 5 y cinco pertenecientes al grupo tratado al Día 10. A continuación, se presentan los datos y resultados conforme a las ovejas preñadas.

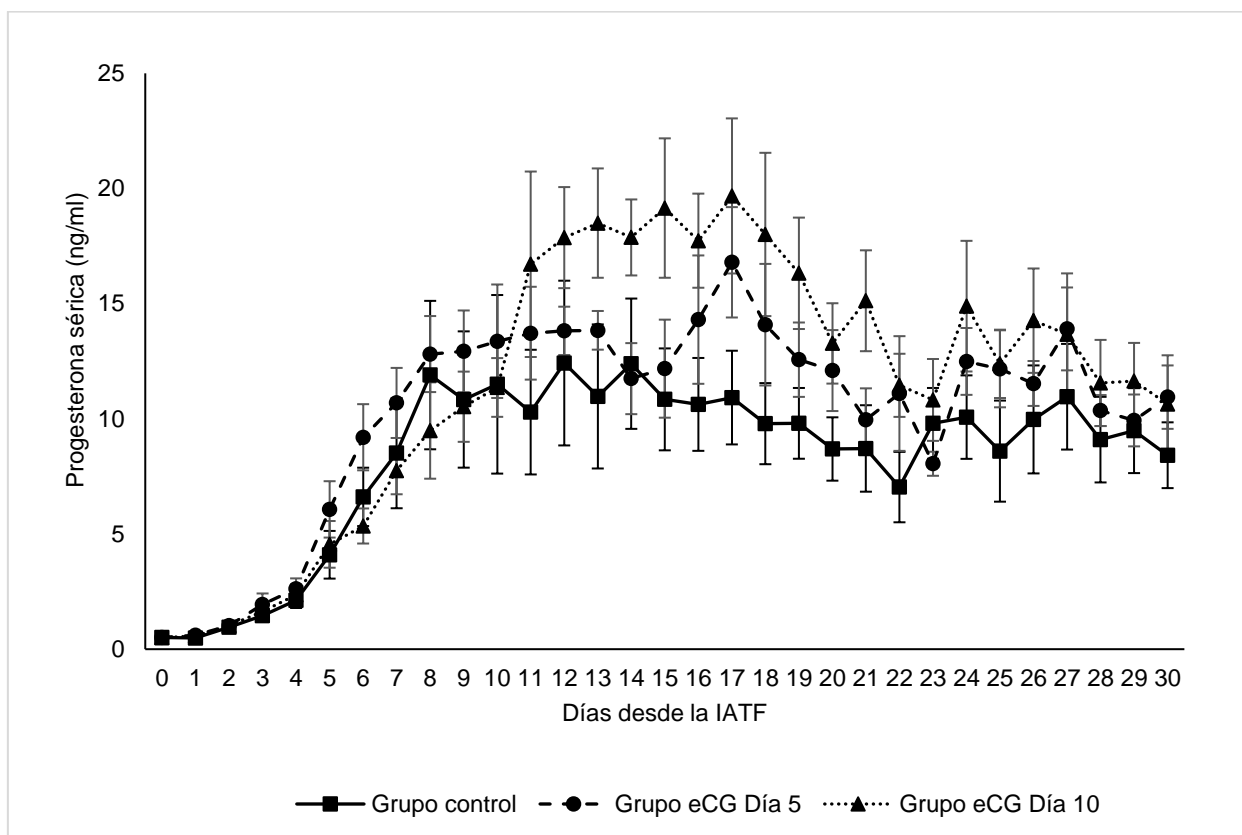
### **8.1 Concentraciones séricas de progesterona.**

Las concentraciones séricas de progesterona fueron influenciadas por el tratamiento, el Día y su interacción ( $P < 0.05$ ). En los tres grupos experimentales con el progreso de la fase luteal, luego de la ovulación, se observó un aumento gradual de las concentraciones de progesterona sérica.

En el grupo al cual se le administró eCG al Día 5, no se observó ningún efecto significativo en las concentraciones de progesterona en comparación al Grupo Control ( $P > 0.05$ ). En cambio, si se encontró una diferencia significativa en las concentraciones de progesterona en el grupo en el que se administró eCG al Día 10 en comparación con el Grupo Control ( $P < 0.05$ ). Dichas diferencias fueron encontradas entre los días 11 y 19 ( $P < 0.05$ ) en las ovejas gestantes (Gráfica 1).



Gráfica 1. Concentración de Progesterona sérica



En esta gráfica se muestra el promedio y el error estándar de la concentración sérica de progesterona de ovejas gestantes tratadas con 400UI IM de eCG al Día 5 (n=4), al Día 10 (n=5) del ensayo y el Grupo Control (n=7). Se encontraron diferencias significativas entre el grupo eCG Día 10 y el Grupo Control entre los Día 11 y 19 ( $P < 0.05$ ). No se encontró efecto en el grupo eCG Día 5.

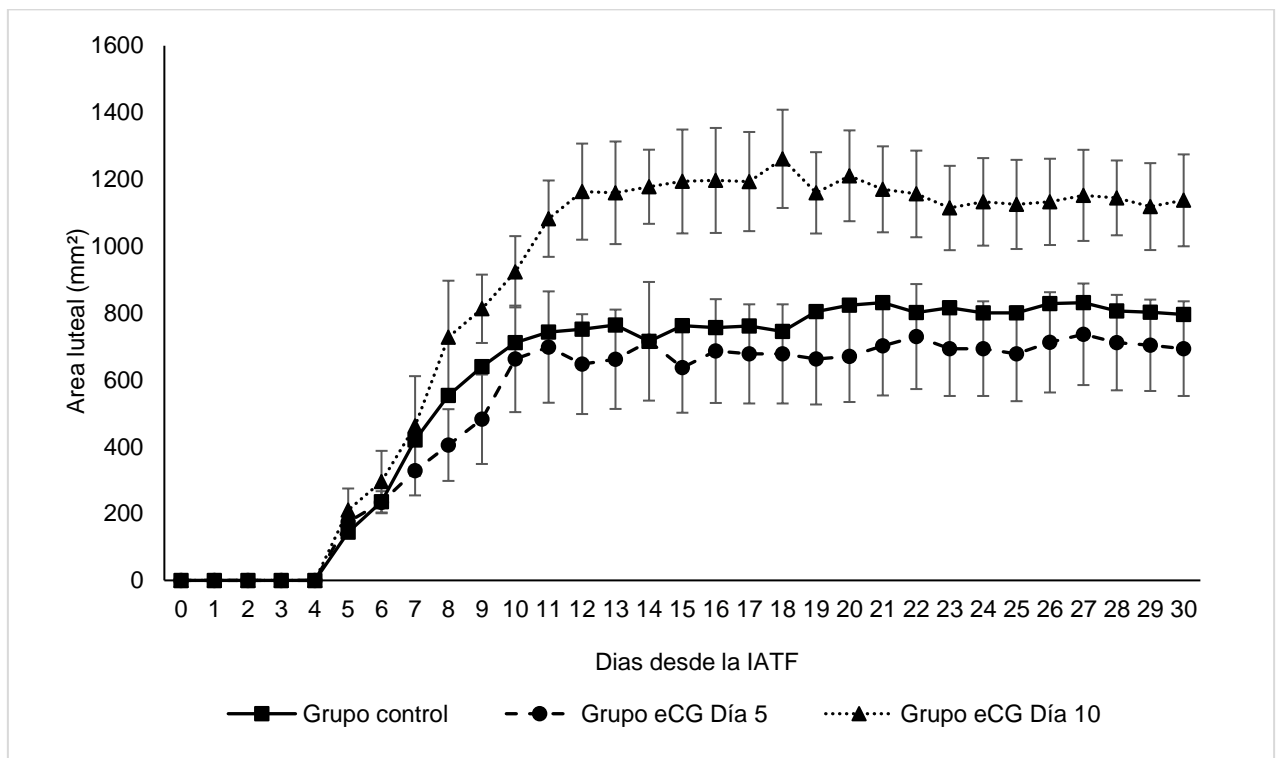
## 8.2 Área luteal

Área luteal fue influenciada por el tratamiento, el día y su interacción ( $P < 0.05$ ). No se observó una diferencia significativa en el área luteal de las ovejas que fueron tratadas con eCG al Día 5 luego de la IATF, en comparación con las del Grupo Control ( $P > 0.05$ ). Se observó diferencia en el área luteal en las ovejas tratadas con eCG al día 10, en comparación con las del grupo control ( $P < 0.05$ ).

Esta variable fue significativamente mayor entre los días 11 y 30 en ovejas gestantes en el tratamiento con eCG al día 10, en relación al Grupo Control ( $P < 0.05$ ). Los resultados se muestran a continuación en la Gráfica 2.

En ninguno de los 3 grupos experimentales se detectó la presencia de cuerpos lúteos accesorios.

Gráfica 2. Evolución del Área Luteal



En esta gráfica se muestra el promedio y el error estándar del área luteal de ovejas gestantes tratadas con 400UI IM de eCG al Día 5 (n=4) y al día 10 (n=5) del ensayo, así como el Grupo Control (n=7). Se encontraron diferencias significativas entre Grupo Control y grupo Día 10 entre los Días 11 al 30 ( $P < 0.05$ ). No se encontró diferencia para el grupo Día 5.

## 9. DISCUSIÓN

Los datos recabados en este ensayo demostraron que la administración de eCG luego de la ovulación tuvo un efecto positivo sobre el área del CL, que a su vez determinó un aumento en la concentración de progesterona sérica, cuando se administraron 400UI IM de eCG diez días luego de la IATF. No se observó el mismo efecto cuando se hizo el mismo tratamiento 5 días después de la inseminación.

El aumento del área luteal y las concentraciones de progesterona, luego de la administración de la eCG podría ser en respuesta a la capacidad de esta hormona de unirse a los receptores de LH en las células del CL, ejerciendo el efecto luteotrófico de la misma (Revisado por Murphy, 2012). De forma interesante, este efecto luteotrófico se observó cuando se administró la eCG en al Día 10, aunque no fuese así, como se mencionó anteriormente en el grupo tratado al Día 5. Igualmente, este estudio no nos brindó la información necesaria como para explicar esta diferencia en la respuesta a los diferentes tratamientos; no obstante, es probable que la explicación esté dada por la sensibilidad que presentan los diferentes tipos de células luteales a las sustancias luteotróficas.

Como se mencionó en la revisión bibliográfica, las células luteales grandes son la principal fuente de progesterona en la primera etapa de la fase luteal, no tienen la capacidad de responder a un aumento de las sustancias luteotróficas (Niswender y col., 2000), por lo que probablemente no serían capaces de responder a la eCG. Esta respuesta a la LH sí es observada en etapas posteriores de la fase luteal, donde aumenta el número de las células luteales pequeñas (Baird, 1992), así como los receptores a las sustancias luteotróficas (Niswender y col., 2000). Teniendo en cuenta lo recién mencionado, se podría pensar que el aumento en las concentraciones séricas de progesterona, como respuesta a la administración de eCG en al Día 10 y no en al Día 5 luego de la inseminación, podría estar relacionado con el número de células sensibles y la cantidad de receptores a las sustancias luteotróficas en esa etapa del ciclo estral.

La información que nos aporta el presente estudio sobre el efecto luteotrófico de la eCG deja en evidencia que cuando la hormona es administrada al Día 10 después de la inseminación, puede generar resultados prometedores con respecto al soporte lúteo. Su administración puede brindar dicho soporte, el cual favorece de manera importante tanto a las etapas tempranas de la preñez como al desarrollo embrionario.

Asimismo, la información que generó este trabajo conlleva a la posibilidad de realizar nuevos trabajos sobre reconocimiento materno y mantenimiento de la preñez en ovejas.

## **10. CONCLUSIÓN**

La administración de 400UI de eCG 10 días luego de la IATF (justo antes del período crítico de gestación), tiene efectos positivos en el tamaño y función del CL, ya que induce un mayor desarrollo en el área de esta estructura con el consecuente aumento en las concentraciones séricas de progesterona. No se observó ningún efecto en el desarrollo de cuerpos lúteos accesorios.

Surge como posible alternativa, la administración de eCG 10 días luego de la inseminación para favorecer el reconocimiento materno y el mantenimiento de la gestación. Si bien en este ensayo los resultados son prometedores, únicamente dan respaldo a una nueva idea que no fue anteriormente evaluada, sobre el uso de la eCG luego de la inseminación en ovejas. Con este antecedente es posible plantear trabajos a futuro para llegar a la decisión de incorporar este tratamiento, o no, en programas de IATF en ovinos.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. Allen, W.R., Moor, R.M., (1972). The origin of the equine endometrial cups: I. Production of PMSG by fetal trophoblast cells. *Journal of Reproduction and Fertility*. 29: 313-316.
2. Ashworth C., Sales D., Wilmut I., (1989). Evidence of an association between the survival of embryos and the periovulatory plasma progesterone concentration in the ewe. *Journal of Reproduction and Fertility*. 87: 23-32.
3. Baird, D.T., (1992). Luteotrophic control of the corpus luteum. *Animal Reproduction Science* 28: 95-102.
4. Bazer F., Spencer T., (1997). Interferon Tau: A Novel Pregnancy Recognition Signal. *American Journal of Reproductive Immunology* 37: 412-420.
5. Bergfelt, D.R., Pierson, R.A., Ginther, O.J., (1989). Resurgence of the primary corpus luteum during pregnancy in the mare. *Animal Reproduction Science*. 21: 261-270.
6. Bousfield, G., Lui, W.K., Sugino, H., Ward, D., (1987). Structural studies on equine glycoprotein hormones. Amino acid sequence of equine lutropin b-subunit. *Journal of Biology and Chemistry*. 262: 8610-8620.
7. Hafez, E.S.E., (1989). Reproducción e inseminación artificial en animales. South Carolina, Ed. Interamericana-Mc Graw-Hill, p. 45.
8. Humphrey, W.D., Murphy, B.D., Rieger, D., Mapletoft, R.J., Manns, J.G., Fretz, P.B., (1979). Effects of FSH/LH ratio of PMSG on ovulatory responses. *Theriogenology* 11: p. 101.

9. Kasper, K.C., Fashandi, S., Le, T., Marr, G., (1987). Dipstick test for pregnancy (PMSG) and estrus (LH) in mares. *Journal of Reproduction and Fertility*. (suppl.) 35: 717-718.
10. Kastelic, J.P., Bergfelt, D.R., Ginther, O.J., (1990). Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. *Theriogenology*. 33 (6): 1269-1278.
11. Licht, P., Bonna Gallo, A., Aggawal, B.B., Farmer, S.W., Castelino, J.B., Papkoff, H., (1979). Biological and binding activities of equine pituitary gonadotrophins and pregnant mare serum gonadotrophin. *Journal of Endocrinology*. 83: 311-322.
12. Martinuk, S., Manning, A., Black, W., Murphy, B., (1991). Effects of Carbohydrates on the Pharmacokinetics and Biological Activity of Equine Chorionic Gonadotropin In Vivo. *Biology of Reproduction*. 45: 598-604.
13. Mann G., Lamming G., (2001). Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Journals of Reproduction and Fertility*. 121: 175-180.
14. Moore Jr., W., Ward, D., (1980). Pregnant Mare Gonadotropin: an *in vitro* biological characterization of the lutropin-folltropin dual activity. *Journal of Biology and Chemistry*. 255: 6930-6936.
15. Murphy, B.D., (2012). Equine chorionic gonadotropin: an enigmatic but essential tool. *Animal Reproduction*. 9 (3): 233-230.
16. Nett, T.M., Pickett, B.W., (1979). Effect of diethylstilboestrol on the relationship between LH, PMSG and progesterone during pregnancy in the mare. *Journal of Reproduction and Fertility*. (suppl.). 27: 465-470.

17. Niswender, G.D., Juengel, J.L., Silva, P.J., Rollyson, M.K., McIntosh, E.W., (2000). Mechanisms controlling the function and life span of the *corpus luteum*. *Physiological Reviews*. 80(1): 1-29.
18. Pierce, J., Parsons, T., (1981). Glycoprotein hormones: structure and function. *Annual Review of Biochemistry*. 50: 465-495.
19. Roser, J., Carrick, F., Papkoff, H., (1986). Properties of equine luteinizing hormone alpha subunit alone and in combination with various beta subunits. *Biology of Reproduction*. 35: 493-500.
20. Rubianes, E., (2000). Nociones básicas de fisiología en cabras y ovejas. En: Sampaio Baruselli, P., Hoffmann Madureira, E. *Controle Farmacológico Do Ciclo Estral Em Ruminantes*. San Pablo, Universidade de Sao Paulo, p. 255-282.
21. Rubianes, E., Ibarra, D., Ungerfeld, R., de Castro, T., Carbajal, B., (1995). Superovulatory response in anestrous ewes is affected by the presence of a large follicle. *Theriogenology* 43: 465-472.
22. Russel, A.J., Doney, J.M., Gunn, R.G., (1969). Subjective assessment of body fat in live sheep. *Journal of Agricultural Science*. 72: 451-454.
23. Salgado, C., (2013). Ateneo de la Investigación y Desarrollo de la Producción Ovina. 30 y 31 de mayo, Cerro Colorado, SUL, p. 30.
24. Senger, P.L., (2005). Early embryogenesis and maternal recognition of pregnancy. En: Senger, P.L. *Pathways to Pregnancy and Parturition*. Washington. Ed. Current Conceptions, inc. p. 284-303.
25. Sirois, J., Fortune, J.E., (1990). Lengthening the Bovine Estrus Cycle with Low Levels of Exogenous Progesterone: A Model for Studying Ovarian Follicular Dominance. *Endocrinology*. 127(2): 916-925.



26. Squires, E.L., Stevens, W.B., Pickett, B.W., Nett, T.M., (1979). Role of Pregnant Mare Serum Gonadotropin in luteal function of pregnant mares. *American Journal of Veterinary Research*. 40: 899-891.
27. StataCorp, (2013). *Stata Statistical Software: Release 13*. StataCorp LP, College Station, TX.
28. Stewart, F, Allen, W.R., 1979. The briding of FSH, LH and PMSG to equine gonadal. Tissues. *Journal of Reproduction and Fertility*. 27:431-440.
29. Stewart, F, Allen, W.R., 1981. Biological functions and receptor binding activites of equine chorionic gonadotrophins. *Journal of Reproduction and Fertility*. 62:527-536.
30. S.U.L., (2008). Plan estratégico Nacional del rubro ovino. Diagnóstico estratégico sectorial. Disponible en: [http://www.sul.org.uy/plan\\_estrategico/Plan\\_estrategico\\_2do\\_taller\\_diagnostico\\_nacional.pdf](http://www.sul.org.uy/plan_estrategico/Plan_estrategico_2do_taller_diagnostico_nacional.pdf). Fecha de consulta: 28 de Marzo, 2016.
31. Thatcher, W., Staples C. R., (1994). Embryo Health and Mortality in Sheep and Cattle. *Journal of Animal Science*. (suppl.) 1994, 72: 16-30.
32. Thiery J, Martin G. (1991). Neurophysiological control of the secretion of: gonadotrophin releasing hormone and luteinizing hormone in the sheep. *Reproduction, Fertility and Development*. 3: 137-173.
33. Ungerfeld, R. (2002). Control endocrino del ciclo estral. En: Ungerfeld, R. *Reproducción en los animales domésticos*. Montevideo, Melibea, p. 39-53.
34. Uruguay. M.G.A.P.-DI.CO.SE., (1980). Declaración Jurada año 1980, total nacional. Division técnica. Montevideo.
35. Uruguay. M.G.A.P.-DI.CO.SE., (1991). Declaración Jurada año 1991, total nacional. Division técnica. Montevideo.

36. Uruguay. M.G.A.P.-DI.CO.SE., (1992). Declaración Jurada año 1992, total nacional. Division técnica. Montevideo.

37. Uruguay. M.G.A.P.-DI.E.A., (2015). Anuario Estadístico Agropecuario 2015. Disponible en:  
<http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,diea,diea-anuario-2015,O,es,0,>. Fecha de consulta: 25 de Marzo, 2016.