

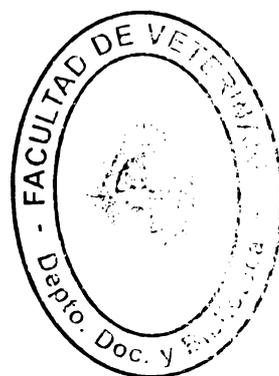
**UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**RESPUESTA OVULATORIA Y EMBRIONARIA EN CABRAS SUPEROVULADAS  
CON EL PROTOCOLO DÍA 0 COMPARADO CON UN PROTOCOLO TRADICIONAL**

**“por”**

**Marcela VILARIÑO PEREDA**



**TESIS DE GRADO presentada como uno de  
los requisitos para obtener el título de  
Doctor en Ciencias Veterinarias (orientación  
Tecnología de Alimentos)**

**MODALIDAD Ensayo Experimental**

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2008**

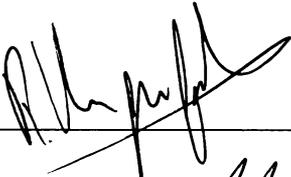
091 TG  
Respuesta ovula  
Vilariño, M



FV27742

## PAGINA DE APROBACION

TESIS DE GRADO aprobada por:

Presidente de Mesa:  R. Ungerfeld

Segundo Miembro (Tutor):  - A. MENCHACA

Tercer Miembro:  - CAROLINA FIOI

Fecha: 26 de Mayo - 2008

Autor:  Marcela Vilarino

## AGRADECIMIENTOS

A Alejo Menchaca, mi tutor, quien me enseñó un camino dentro de la veterinaria y me ayuda a transitarlo. Es difícil expresar en palabras mi reconocimiento.

A Edgardo Rubianes, quién en gran medida hizo posible este trabajo y desde que lo conozco me ha apoyado.

A Milton Pintos, funcionario del Laboratorio de Fisiología de la Reproducción, su participación fue fundamental para llevar a cabo este trabajo y muchos más.

A Rodolfo Ungerfeld, Alejandra Ramos, Silvana Gonzalez y Solana Gonzalez, integrantes del Laboratorio de Fisiología de la Reproducción, quienes aportaron muchas horas de colaboración para que esta tesis sea posible.

A Andrea Pinczak y Martina Crispo, su apoyo técnico fue fundamental en este trabajo y personalmente me dejó y me sigue dejando mucho.

A Pepe Piaggio, por su colaboración en la estadística de esta tesis.

A Inés Pereda, Pepe Vilariño y Rodrigo Vilariño, mi familia, personas increíbles que me acompañan continuamente y que no tengo palabras para agradecerles todo lo que me gustaría.

A mis abuelos, María y Manuel, un pilar fundamental de mi familia.

A Sebastián Baña, mi compañero de camino, su apoyo siempre es incondicional.

A María Puppo, mi amiga-hermana, innumerables experiencias juntas que crecen con el tiempo.

A todos mis amigos y al resto de mi familia que siempre están participando de mi vida y me hacen sentir una privilegiada por tenerlos cerca.

A el Laboratorio ION, por su colaboración a través de la donación de antibióticos.

El apoyo financiero de esta tesis provino de diferentes fuentes: Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) de la Universidad de la República, del Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas (PEDECIBA), Establecimientos Caprinos “La Chacra”, “Sierra Vista” y “Bohemia” y del Laboratorio ICPbio de Nueva Zelanda.

Esta tesis fue un trabajo realizado en el Laboratorio de Fisiología de la Reproducción de la Facultad de Veterinaria, donde el apoyo colectivo de todos los integrantes del Laboratorio fue fundamental para que se pueda llevar a cabo.

## TABLA DE CONTENIDO

PAGINA DE APROBACION.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.....	IV
1. <u>RESUMEN</u> .....	1
2. <u>SUMMARY</u> .....	2
3. <u>INTRODUCCION</u> .....	3
4. <u>REVISION BIBLIOGRAFICA</u> .....	4
4.1. LA PRODUCCION CAPRINA.....	4
4.2. FISIOLOGIA REPRODUCTIVA EN LA CABRA.....	5
4.2.1. <u>Estacionalidad Reproductiva</u> .....	5
4.2.2. <u>Fisiología del ciclo estral</u> .....	6
4.3. <u>DESARROLLO FOLICULAR</u> .....	7
4.3.1. <u>Desarrollo folicular en ondas</u> .....	7
4.3.2. <u>Dominancia folicular</u> .....	8
4.3.3. <u>Control endócrino del desarrollo folicular</u> .....	9
4.4. <u>SINCRONIZACION DE LA OVULACION E INSEMINACION ARTIFICIAL</u> .....	11
4.4.1. <u>Sincronización de la ovulación</u> .....	11
4.4.2. <u>Inseminación artificial intrauterina</u> .....	13
4.5. <u>SUPEROVULACION Y TRANSFERENCIA DE EMBRIONES</u> .....	13
4.5.1. <u>Antecedentes</u> .....	13
4.5.2. <u>Factores que afectan la respuesta superovulatoria</u> .....	14
4.5.3. <u>Hormonas utilizadas</u> .....	15
4.5.4. <u>Tratamientos Tradicionales</u> .....	16
4.5.5. <u>Tratamientos Alternativos</u> .....	17
5. <u>OBJETIVO</u> .....	18
6. <u>MATERIALES Y METODOS</u> .....	19
6.1. ANIMALES Y MANEJO.....	19
6.2. GRUPOS EXPERIMENTALES.....	19
6.2.1. <u>Protocolo Día 0</u> .....	19
6.2.2. <u>Protocolo Tradicional</u> .....	20
6.3. <u>ULTRASONOGRAFIA TRANSRECTAL</u> .....	21
6.4. <u>INSEMINACION ARTIFICIAL</u> .....	22
6.5. <u>RESPUESTA OVARICA</u> .....	22
6.6. <u>COLECTA EMBRIONARIA</u> .....	22
6.7. <u>BUSQUEDA Y CLASIFICACION DE EMBRIONES</u> .....	22
6.8. <u>ANALISIS ESTADISTICO</u> .....	24
7. <u>RESULTADOS</u> .....	25
7.1. <u>ESTATUS OVARICO PREVIO AL TRATAMIENTO CON PROGESTERONA</u> .....	25
7.2. <u>EMERGENCIA DE LA ONDA 1 INDUCIDA CON EL TRATAMIENTO CORTO</u> .....	25
7.3. <u>ESTATUS FOLICULAR AL INICIO DEL TRATAMIENTO CON FSH</u> .....	26
7.4. <u>RESPUESTA OVULATORIA Y EMBRIONARIA</u> .....	28
7.4.1. <u>Respuesta sobre el total de las cabras</u> .....	28
7.4.2. <u>Respuesta sobre las cabras en las que se colectaron embriones</u> .....	29

8. <u>DISCUSION</u> .....	30
9. <u>CONCLUSIONES</u> .....	33
10. <u>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</u> .....	34

## LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1.....	21
Figura 2.....	21
Figura 3.....	23
Figura 4.....	27
Tabla 1.....	25
Tabla 2.....	26
Tabla 3.....	27
Tabla 4.....	28
Tabla 5.....	28
Tabla 6.....	29

## LISTA DE ABREVIATURAS

MOET: *multiovulation and embryo transfer*  
TE: transferencia de embriones  
FSH: hormona folículo estimulante  
LH: hormona luteinizante  
GnRH: hormona liberadora de gonadotropina  
IA: inseminación artificial  
CLRP: cuerpo lúteo de regresión prematura  
CL: cuerpo lúteo  
PGF2 $\alpha$ : prostaglandina F 2 $\alpha$   
IATF: inseminación artificial a tiempo fijo  
eCG: gonadotropina coriónica equina

## 1. RESUMEN

(-FA)

El objetivo del presente trabajo de tesis fue evaluar el Protocolo de superovulación Día 0 y compararlo con un Protocolo Tradicional en cabras lecheras tanto durante la estación reproductiva como durante la estación de anestro. El Protocolo Día 0 (n=47) consistió en un tratamiento corto con progesterona para sincronizar la ovulación (CIDR-G, 5 días + eCG + PGF2 $\alpha$ ) y luego se inició el tratamiento con FSH (6 dosis decrecientes cada 12 horas) a tiempo fijo, 84 luego del retiro del dispositivo con progesterona. Se administraron dos medias dosis de un análogo de PGF2 $\alpha$  junto con las dos últimas dosis de FSH. El Protocolo Tradicional (n=47) consistió en la administración de progesterona por 11 días asociado a la administración de FSH a partir de las 60 horas previas al retiro del dispositivo con progesterona. Al momento de administrar la primera dosis de FSH se administró una dosis de un análogo de PGF2 $\alpha$ . En ambos protocolos al momento de administrar la primera dosis de FSH se determinó la presencia/ausencia de un folículo grande ( $\geq 5$  mm) mediante la técnica de ultrasonografía. A las 12 horas de la última FSH se administró una dosis de un análogo de GnRH, y al día siguiente 16 y 26 horas luego de administrada la dosis de GnRH se realizó la inseminación artificial con semen congelado vía intrauterina por medio de laparoscopia. La respuesta ovárica fue establecida por laparoscopia a los 6,5 días de la inseminación, donde se determinó la cantidad de cuerpos lúteos (CL) previo a la colecta embrionaria. Las cabras que tenían CL de regresión prematura no fueron colectadas y se consideró que no respondieron al tratamiento.

El tratamiento con FSH en el Protocolo Día 0 fue iniciado en ausencia de un folículo dominante en 16/23 (70%) y 19/24 (79%) de las cabras durante la estación reproductiva y el anestro estacional, respectivamente. Mientras que en el Protocolo Tradicional solo 3/19 (16%) y 2/28 (7%) no presentaban un folículo dominante durante la estación reproductiva y durante el anestro estacional, respectivamente ( $P < 0,01$ ). El número de cabras con más de dos CL fue mayor para el Protocolo Día 0 que para el Protocolo Tradicional (20/23, 87% y 8/19, 42%; respectivamente) durante la estación reproductiva ( $P < 0,01$ ). Sin embargo durante la estación de anestro no se encontraron diferencias significativas. Hubo una tendencia estadística a aumentar el número de embriones grado 1&2 cuando se utilizó el Protocolo Día 0 tanto durante la estación reproductiva ( $4,1 \pm 0,8$  y  $2,0 \pm 0,5$ , respectivamente;  $P = 0,09$ ) como durante la estación de anestro ( $5,6 \pm 1,1$  y  $3,7 \pm 0,6$ , respectivamente;  $P = 0,07$ ). La proporción de embriones grado 1&2 sobre embriones colectados fue mayor para el Protocolo Día 0 que para el Protocolo Tradicional durante la estación reproductiva (81/126, 64% vs 16/35, 46%;  $P < 0,05$ ) y durante el anestro estacional (118/203, 58% vs 92/204, 45%;  $P < 0,05$ ).

A través de estos resultados se observa la eficacia del Protocolo Día 0 en iniciar el tratamiento superovulatorio en ausencia de un folículo dominante, y como consecuencia lograr un mejor resultado tanto en la proporción de cabras con respuesta superovulatoria como en la calidad de los embriones colectados.

## 2. SUMMARY

The objective of this experiment was to evaluate the effectiveness of a new superovulatory protocol (Day 0 Protocol) compared with a Traditional Protocol in daily goats during breeding season and non-breeding season. Day 0 Protocol (n=47) consisted in a pre-treatment using a short-term protocol with progesterone (CIDR-G 5 days + eCG + PGF2 $\alpha$ ) to synchronize the ovulation and the emergence of the first follicular wave. FSH treatment (6 decreasing doses given twice daily) was administered at fixed time from 84 hours after the end of progesterone exposure. Two half-doses of PGF2 $\alpha$  analogue were given concurrent with the fifth and sixth FSH doses. Traditional protocol (n=47) consisted in progesterone exposure for 11 days associated with FSH treatment (6 decreasing doses given twice daily) initiated 60 hours previous CIDR-G withdrawal. A dose of PGF2 $\alpha$  analogue was given concurrent with the first FSH dose. In both protocols, the presence/absence of a large follicle ( $\geq 5$ mm) at the time of first FSH dose was assessed by ultrasonography. A GnRH dose was administered 12 hours from the last dose of FSH. Timed artificial insemination was done by laparoscopy with frozen-thawed semen performed at 16 and 26 hours after GnRH administration. Ovulatory response was evaluated by laparoscopy 6,5 days after AI and the number of corpora lutea (CL) was recorded. Goats with early regression of corpora lutea (ERCL) were considered as non-responding females and embryo recovery was not done.

Treatment with FSH in Day 0 Protocol was initiated in absence of a large follicle in 16/23 (70%) and in 19/24 (79%) of the goats during breeding season and non-breeding season, respectively. While only 3/19 (16%) and 2/28 (7%) did not present a dominant follicle during breeding season and non-breeding season, respectively ( $P < 0,01$ ). During breeding season it was a higher number of goats with superovulatory response for the Day 0 Protocol than for the Traditional Protocol (20/23, 87% and 8/19, 42%; respectively,  $P < 0,01$ ). However, non significant differences were founded during non-breeding season. Grade 1&2 embryos showed a statistical tendency to be higher for the Day 0 Protocol than for the Traditional Protocol (breeding season:  $4,1 \pm 0,8$  and  $2,0 \pm 0,5$ ,  $P = 0,09$ ; non-breeding season:  $5,6 \pm 1,1$  and  $3,7 \pm 0,6$ ,  $P = 0,07$ ). Day 0 Protocol increased the number grade 1 and 2/recovered embryos compared with Traditional Protocol (breeding season: 81/126, 64% and 16/35, 46%,  $P < 0,05$ ; non-breeding season: 118/203, 58% and 92/204, 45%,  $P < 0,05$ ).

In summary, the results show the effectiveness of Day 0 Protocol to initiate superovulatory treatment in the absence of a large follicle, and compared with Traditional Protocol, this new protocol induced a higher proportion of responding females, higher ovarian response and a better embryo yield.

### **3. INTRODUCCION**

Las técnicas de reproducción asistida en la producción caprina han tenido un importante desarrollo en los últimos 30 años. Probablemente las dos técnicas con más impacto a nivel mundial en esta especie son la sincronización del estro y la inseminación artificial debido a su bajo costo y su fácil aplicación. Por su parte, la ovulación múltiple y transferencia de embriones (multiovulation and embryo transfer, MOET) no ha tenido en la producción caprina, a diferencia de los bovinos, un desarrollo importante debido a su alto costo, al requerimiento de procedimientos quirúrgicos para la recolección y transferencia de embriones y a la gran variabilidad en los resultados obtenidos (Cognie y col., 2003). Recientemente se ha demostrado que esta variabilidad en la respuesta ovulatoria se atribuye principalmente a la población folicular ovárica que existe al momento de iniciar el tratamiento superovulatorio (González de Bulnes y col., 2004). Este factor en los tratamientos tradicionales no está considerado debido a que dichos tratamientos fueron diseñados hace más de 20 años.

Los tratamientos de superovulación tienen como objetivo producir la mayor cantidad de ovulaciones y obtener el máximo de embriones viables. Una de las opciones para mejorar la eficiencia en programas de Transferencia de Embriones (TE) es incrementar los resultados con los tratamientos de superovulación. Como se describió anteriormente, la respuesta a un tratamiento de superovulación depende de la actividad ovárica previa a la aplicación de dichos tratamientos (Cognie, 1999). Con el uso de la ultrasonografía para el seguimiento ovárico diario ha sido posible determinar que el crecimiento folicular en la cabra ocurre en ondas (Ginther y col., 1994; de Castro y col., 1999; González de Bulnes y col., 1999). El patrón predominante en cabras con ciclo de duración normal (19 a 22 días) es de 3 o 4 ondas foliculares, observándose también ciclos con 2 o 5 ondas. Cada onda folicular se define como la emergencia o el reclutamiento de un grupo de folículos pequeños (2-4 mm), entre los cuales se selecciona uno que es el dominante (5 mm), y que continúa creciendo mientras los otros (subordinados) regresan.

Estudios realizados en bovinos permitieron concluir que la existencia de un folículo dominante al inicio del tratamiento reduce la respuesta ovulatoria (Adams, 1994). Trabajos recientes realizados en caprinos (Menchaca y col., 2002) llegaron a similares resultados. Luego de estos estudios se plantearon nuevos protocolos dirigidos a asegurar la ausencia de un folículo dominante al iniciar el tratamiento con FSH (hormona folículo estimulante). En pequeños rumiantes el método más efectivo fue la utilización de la primera onda del ciclo interovulatorio, es decir la onda folicular que se inicia justo luego de la ovulación. Un protocolo alternativo propuesto recientemente (Protocolo Día 0; Rubianes y Menchaca, 2003) inicia la administración de FSH cuando la ovulación es detectada por ultrasonografía (Día 0: día de la ovulación) y por lo tanto en ausencia de un folículo grande o dominante.

Corresponde señalar que los protocolos tradicionales no tienen en cuenta estos conceptos sobre dinámica folicular. Estos tratamientos consisten en la administración de FSH luego de 11-12 días de exposición a progestinas, sin conocer el estatus folicular que existe al momento de iniciar el tratamiento con FSH (Cognie, 1999).

## 4. REVISION BIBLIOGRAFICA



### 4.1. LA PRODUCCION CAPRINA

La cabra fue el primer animal domesticado 7000 años a.C. (Arbiza, 1986). Esta especie tuvo presencia relevante en todos los aspectos de las sociedades antiguas (religión, economía, nutrición, etc). Estos animales se utilizan en todo el mundo por su leche, carne, piel o pelo con un grado de intensificación muy variable. La mayor parte de las cabras censadas se ubican en los países en vías de desarrollo y se utilizan principalmente para la producción de carne (FAO, 1985). Sin embargo, en los países con un nivel de vida más elevado la explotación caprina se orienta a la producción de leche y quesos.

El género *Capra* incluye varias especies de mamíferos artiodáctilos de comportamiento gregario que suelen conocerse comúnmente como cabras. Su lugar de origen es el centro-oeste de Asia y desde aquí se fueron expandiendo a Europa y Africa. La *Capra aegagrus hircus* es la cabra doméstica que habita nuestra región y pertenece a la familia Bovidae y al orden Artiodactyla.

La población caprina mundial supera los 807 millones encontrándose China, India y Pakistán como primeros productores. Dentro de Europa los principales productores de cabras son España, Francia, Grecia e Italia. La población caprina en América está estimada en 39 millones de cabezas, de las cuales el 57% esta localizado en América Latina (FAO, 2008).

En Uruguay la especie caprina se utiliza para la producción de leche y quesos. Este subproducto le da a la leche un valor agregado muy alto. Las cabras lecheras pueden ser explotadas de forma intensiva, no obstante la producción por lo general es en rebaños semi-intensivos con pastoreo durante el día y encierro durante la noche. Desde la década del 80 se comenzó a importar cabras de razas lecheras (Anglo Nubian, Pardo Alpina, Saanen, y Toggenburg) con el objetivo de criarlas puras o cruzarlas con las cabras criollas para mejorar la producción.

## **4.2. FISILOGIA REPRODUCTIVA EN LA CABRA**

### **4.2.1. Estacionalidad Reproductiva**

La especie caprina presenta una actividad reproductiva poliéstrica estacional, regulada principalmente por las horas de luz. Asimismo, la duración de la estación reproductiva es afectada también por factores genéticos y ambientales. La exposición a la luz regula la liberación de melatonina, hormona que se libera durante la noche. Al disminuir las horas de luz de cada día, aumenta la liberación de melatonina, que estimula la liberación de GnRH (hormona liberadora de gonadotropina) del hipotálamo. Cambios en la liberación de GnRH provocan cambios correspondientes en la secreción de LH (hormona luteinizante), que son responsables de la presencia o ausencia de ovulación en las hembras (Blaszczyk y col., 2004). En nuestra latitud (30-35° LS) las razas Pardo Alpina, Saanen y Toggenburg presentan actividad sexual desde febrero-marzo hasta septiembre-octubre mientras que la raza Anglo Nubian inicia su actividad durante el mes de diciembre-enero (Menchaca, 2002). En áreas tropicales, la raza Creole de Brasil, Venezuela y Zimbabwe, tienen la capacidad de reproducirse durante todo el año (revisado por Freitas y col., 2004). A pesar de esto se ha reportado que presentan prolongados períodos de anestro como resultado de deficiencias nutricionales.

La estacionalidad reproductiva afecta la producción de leche a lo largo del año, lo que se transforma en una limitante productiva. Con el objetivo de lograr una producción de leche constante los tratamientos de sincronización de celo y el efecto macho han cobrado una mayor importancia en los últimos tiempos. Los tratamientos hormonales para inducir el celo y la ovulación serán descritos mas adelante. El efecto macho consiste en la introducción súbita de machos con el objetivo de inducir la ovulación en hembras que se encuentran en anestro (Martin y col., 2004). Este mecanismo de bioestimulación se logra a través del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal, estímulo que genera un incremento en la pulsatilidad de GnRH que determina un aumento en la liberación de LH, y así se induce el desarrollo folicular ovulatorio. En los ovinos son características las ovulaciones sin estro al inicio de la actividad sexual, esto es atribuido a la ausencia de un período previo de exposición a progesterona. En cambio en la cabra la necesidad de exposición previa a la progesterona no es tan marcada, lo que provoca una mayor inducción de celos junto con la primera ovulación (Chemineau, 1983).

Los machos caprinos de razas lecheras presentan actividad sexual durante todo el año, a pesar de estar influenciados por factores similares a los que afectan a las hembras. Esto determina que la calidad seminal y la libido se ven afectadas durante el período de anestro (Delgadillo y col., 1999). Si bien existen fenómenos como la alimentación (fundamentalmente en latitudes subtropicales) que regulan la actividad reproductiva en estas especies, tanto en machos como en hembras, esta actividad está dirigida por un ritmo endógeno que es sincronizado por el fotoperíodo (Martin y col., 1999). La calidad espermática está afectada por la estacionalidad, encontrándose mayor motilidad espermática durante la estación reproductiva (Delgadillo y col., 1991). Sin embargo en Uruguay es posible utilizar machos durante todo el año ya que la calidad seminal si bien se ve afectada, permite realizar la IA (inseminación artificial) y lograr tasas de preñez aceptables (A Menchaca, 2008, comunicación personal) no representando una limitante importante.

#### **4.2.2. Fisiología del ciclo estral**

El ciclo estral de la cabra tiene una duración de 21 días (rango: 19 a 23 días). Existe una asociación entre los altos niveles séricos de progesterona durante la fase temprana del ciclo y el recambio folicular que podría explicar esta variación (Menchaca y Rubianes, 2001). Por otro lado es frecuente en la cabra la aparición de ciclos cortos con una duración de 5 a 9 días. Estos se dan con mayor frecuencia al inicio o al final de la estación reproductiva, al inicio de la pubertad y luego del anestro posparto (Rivera y col., 2003). En rumiantes, la presencia de estos ciclos cortos es causada por la existencia de cuerpos lúteos de regresión prematura (CLRP) y/o la presencia de folículos luteinizados (Hunter, 1991).

El ciclo estral de la cabra se clasifica en dos fases: luteal y folicular. La fase luteal se extiende desde el día 0 (día 0: ovulación) hasta el día 16-18 y la fase folicular desde el día 16-18 (momento en que ocurre la luteolisis) hasta la ovulación. El estro tiene una duración de 36 horas (rango 18-48 horas) y la ovulación ocurre 30-36 horas del inicio del estro.

La fase luteal comienza con la ovulación, las células de la teca y de la granulosa del folículo ovulado comienzan a luteinizarse. Después de la ovulación el espacio ocupado previamente por el folículo es invadido por fibroblastos, células endoteliales, células de la teca interna y de la granulosa. Durante esta etapa de fase luteal temprana (antiguamente llamada metaestro) hay una elevada frecuencia de pulsatilidad de LH, que incrementa el número y actividad de células luteales. A medida que se va formando el cuerpo lúteo (CL) los niveles séricos de progesterona se incrementan. En el día 4 o 5 después de la ovulación las concentraciones de progesterona en sangre superan valores de 1ng/ml y aumentan hasta el día 16-18 momento en que ocurre la luteolisis. La progesterona suprime la pulsatilidad de GnRH inhibiendo la pulsatilidad de LH. La LH es la responsable del crecimiento de los folículos luego de que alcanzan un determinado diámetro. La inhibición de la secreción de LH por la progesterona induce la regresión de los folículos mayores a 5 mm, lo que permite la emergencia de una nueva onda de crecimiento folicular. Mediante este mecanismo la alta concentración de progesterona favorece el recambio folicular y por lo tanto la ovulación de un ovocito “joven” y más fértil demostrado en vacas (Savio y col., 1993) y ovejas (Johnson y col., 1996).

Por otra parte, la progesterona suprime la secreción endometrial de prostaglandina F 2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ) debido a su efecto inhibitorio sobre los receptores uterinos de oxitocina y estradiol que son los responsables de desencadenar la liberación de PGF2 $\alpha$ . Luego del período necesario de exposición a progesterona (día 15 a 17 del ciclo), si no existe un reconocimiento materno-fetal se desencadena el mecanismo luteolítico. La oxitocina hipofisaria desencadena la liberación de PGF2 $\alpha$  que incrementa la secreción de oxitocina por parte del CL, esta actúa en el endometrio incrementando la pulsatilidad de PGF2 $\alpha$  que produce la luteólisis. La fase luteal termina debido a la disminución de los niveles séricos de progesterona. Este fenómeno da lugar al inicio de la fase folicular.

La onda folicular ovulatoria emerge entre el día 11 y 14 del ciclo en la cabra (de Castro y col., 1999). Luego del reclutamiento de varios folículos pequeños (<4mm), al menos uno es seleccionado para continuar el crecimiento. Este folículo, luego de ocurrida la luteólisis es responsable de la secreción de estrógeno que determina el comportamiento estral y también

genera una retroalimentación positiva a nivel central con un incremento en la pulsatilidad de LH. Esto determina que el folículo continúe su crecimiento liberando mayor cantidad de estrógeno que induce un pico de GnRH generando el pico de LH. El pico de LH ocurre entre las 8 y 18 horas de iniciado el estro. Luego de 18-24 horas del pico de LH se produce la ovulación de los folículos que alcanzaron un diámetro mayor a 5mm.

### **4.3. DESARROLLO FOLICULAR**

#### **4.3.1. Desarrollo folicular en ondas**

La ultrasonografía transrectal fue utilizada para el estudio de los ovarios de rumiantes por primera vez en vacas (Pierson y Ginther, 1984; Sirois y Fortune, 1988). Posteriormente, fue adoptada como técnica de elección para el estudio del desarrollo folicular en esta especie. Con el desarrollo de esta técnica se pudo elucidar que las vacas tienen un crecimiento folicular en ondas y que éste se produce en tres fases (reclutamiento, selección y dominancia) (Lucy y col., 1992). Recién en la última década se desarrolló la técnica de ultrasonografía para el estudio de ovarios en ovinos y caprinos, que permitió determinar que estas especies presentan al igual que las vacas, un crecimiento folicular en ondas. Este crecimiento se pudo observar tanto en las cabras (Ginther y Kot, 1994; de Castro y col., 1999) como en las ovejas (Ginther y col., 1995). También fue demostrado durante la estación de anestro (Bartlewsky y col., 1998) en ovejas y durante la gestación temprana en ovejas (Bartlewsky y col., 2000) y cabras (Pinczak y col., 2001). Previo a esto, todos los estudios que se publicaban sobre foliculogénesis en pequeños rumiantes eran estáticos, es decir enfocados al estudio de poblaciones foliculares en un momento determinado y no al estudio de la dinámica folicular. A partir de estos estudios se determinó que el ovario de ovejas adultas contiene entre 12.000 y 86.000 folículos primordiales y entre 100 y 400 folículos en crecimiento, de los cuales solo 10 a 40 son visibles en la superficie del ovario (Cahill y Mauleon, 1980, citado por Rubianes, 2000).

El patrón de desarrollo folicular en ondas fue demostrado para algunos animales domésticos durante los últimos años como la cabra (Ginther y Kot; 1994), la vaca (Pierson y Ginther, 1984), la yegua (Palmer y Driancourt, 1980) y la oveja (Schrick y col., 1993). Las ondas foliculares comienzan con una etapa de reclutamiento, donde solo los folículos gonadotropina dependientes son reclutados. El número de folículos reclutados es muy variable entre las especies, y puede ir desde 50 en las cerdas hasta 5-10 en las vacas (Driancourt, 2001). Todos estos folículos son potencialmente capaces de ovular, aunque posteriormente a esta etapa de reclutamiento se produce un proceso de selección donde el folículo dominante continúa creciendo y los restantes se vuelven subordinados y comienzan el proceso de atresia. En todas las especies el folículo que se selecciona es el primero que desarrolla receptores de LH en las células de la granulosa. Estos tres conceptos: reclutamiento, selección y dominancia son los que definen el desarrollo folicular.

En la cabra una onda folicular se define como la emergencia de un grupo de folículos antrales pequeños (3 mm) de los cuales uno o más alcanza un diámetro  $\geq 5$ mm. El número de ondas foliculares varía entre 2 a 5 siendo mas frecuente la existencia de cuatro ondas durante el ciclo de la cabra (Ginther y Kot, 1994; de Castro y col., 1999).

Las características más importantes del crecimiento folicular en ondas en la cabra fueron recientemente descritas por Rubianes y Menchaca (2003). Entre ellas se destacan: en cada onda se presenta por lo menos un folículo que alcanza un diámetro  $\geq 5$ mm; el folículo más grande de cada onda crece durante 5-7 días, con una tasa de crecimiento de  $\sim 1$  mm/día; el diámetro máximo alcanzado por el folículo mayor de una onda difiere entre las ondas; a medida que avanza la fase lútea y las concentraciones de progesterona sérica aumentan, el diámetro máximo alcanzado por el folículo más grande es menor, se favorece el recambio folicular y los intervalos entre ondas son más cortos; durante la fase luteal media-tardía se ha propuesto que los folículos que no crecen más de 4 mm no serían parte del fenómeno de ondas sugiriendo que representan un pool dinámico basal; en la mayoría de los casos los folículos que ovulan son aquellos que tenían mayor diámetro en el momento de la luteolisis; cuando ocurren ovulaciones de más de un folículo; estos por lo general provienen de la misma onda folicular y ovulan en un rango generalmente menor a las 12 horas.

#### **4.3.2. Dominancia folicular**

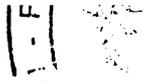
Como ya fue descrito, la emergencia de un grupo de folículos pequeños, es seguida de la selección de un folículo dominante (Ginther y col., 1997). Como consecuencia del efecto inhibitorio del folículo que continúa su crecimiento y se transforma en dominante, los folículos subordinados cesan su crecimiento a los pocos días de la emergencia de la onda. La regresión del folículo dominante está asociada con la emergencia de una nueva onda folicular. Este mecanismo se conoce como dominancia folicular (Driancourt, 2001).

Los primeros trabajos reportados sobre dominancia folicular en la oveja, que surgen luego de la aparición de la ultrasonografía como técnica exploratoria no invasiva, sugerían que la dominancia es débil o no está presente durante la fase luteal del ciclo estral (Ravindra y col., 1994). Sin embargo, trabajos recientes han demostrado que en la oveja, al igual que en la vaca, también existe dominancia folicular (Rubianes y col., 1996). Como ya fue descrito luego de la emergencia de una onda folicular, se selecciona un folículo dominante que se vuelve independiente de la FSH para su crecimiento y pasa a depender de la LH. Este folículo a medida que aumenta su tamaño, aumenta su producción de estradiol, androstenediona e inhibina que son los responsables de inhibir la secreción de FSH y por lo tanto el crecimiento de otros folículos (Campbell y col., 1995).

En cabras también se demostró la existencia de dominancia folicular, principalmente durante la primera onda folicular (Menchaca y col., 2002) y la onda ovulatoria (de Castro y col., 1999). Luego de que el folículo dominante alcanza su máximo diámetro cesa su dominancia funcional y la producción de estradiol comenzando la atresia del folículo y dando lugar a la emergencia de una nueva onda folicular.

Tanto en la oveja como en la cabra en ocasiones ocurre la selección de 2 a 3 folículos que continúan su crecimiento lo que ha dado lugar al concepto de codominancia folicular (Rubianes y Menchaca; 2003). El fenómeno de codominancia puede ser explicado porque existe un mayor número de folículos capaces de responder a las gonadotropinas y continuar su desarrollo, o porque existe una mayor oportunidad de que la FSH actúe sobre estos folículos (Scaramuzzi y col., 1993).

### **4.3.3. Control endócrino del desarrollo folicular**



El desarrollo folicular está controlado por la actividad de las hormonas de origen hipofisario (LH y FSH), folicular (estradiol) y del CL (progesterona).

#### *FSH*

La FSH es una glicoproteína formada por una subunidad alfa y una beta sintetizada por la hipófisis anterior. Esta hormona estimula el crecimiento de los folículos en el ovario y junto con la LH estimulan la síntesis de estradiol de los folículos en desarrollo. Las células de la granulosa poseen receptores para FSH y producen además de estradiol, inhibina que actúa junto con el estradiol inhibiendo la liberación de FSH por parte de la hipófisis.

En la vaca, la emergencia de una nueva onda folicular esta precedida por un aumento en la concentración plasmática de FSH y la selección del folículo dominante es seguida por una disminución de FSH (Adams y col., 1992). También en la oveja la emergencia de las ondas foliculares está precedida por las variaciones en las concentraciones séricas de FSH (Bartlewsky y col., 1999; Viñoles y col., 1999). La posterior disminución en la concentración de FSH esta asociada a un incremento en la producción de estradiol por parte del folículo dominante (Viñoles y col., 2002). Sin embargo, se ha observado que en la mitad del ciclo estral algunas ondas no son precedidas por un aumento de FSH (Viñoles y col., 2002), y también que algunas fluctuaciones de esta hormona no están relacionadas con el inicio de una nueva onda folicular (Ginther y col., 1995). En la cabra no hay trabajos que estudien la relación entre la dinámica folicular y las concentraciones de FSH.

#### *LH*

La LH es una glicoproteína formada por una subunidad alfa y otra beta sintetizada en la hipófisis anterior. Esta hormona actúa de dos maneras: a) mediante el pico preovulatorio desencadenando una serie de eventos incluyendo reacciones enzimáticas que terminan en la ruptura de la pared folicular y en la ovulación (induciendo la activación del ovocito para que continúe con la meiosis); y b) mediante su secreción pulsátil que actúa previo a la ovulación, luego de la ovulación estimulando la formación del CL, y en la fase de crecimiento del folículo dominante estimulando su desarrollo. Las células de la teca interna poseen receptores para LH y por su estímulo producen andrógenos que pasan a través de la membrana basal a las células de la granulosa y mediante su aromatización por acción de la FSH se transforman en estrógenos. Las células de la granulosa del folículo dominante también desarrollan receptores de LH los que le permite crecer en bajas concentraciones de FSH y finalmente responder al pico preovulatorio.

#### *Progesterona*

La Progesterona es una hormona esteroidea que se sintetiza a partir del colesterol. El colesterol es un esteroide de 27 carbonos que se convierte en pregnenolona y ésta se convierte en progesterona que posee 21 carbonos. A su vez, la progesterona puede convertirse en andrógenos. En rumiantes, la progesterona es secretada por las células del CL, por la placenta y por las glándulas adrenales, y es transportada a la sangre por una globulina. La regulación de la secreción de esta hormona

está dada fundamentalmente por la LH y la PGF2 $\alpha$ . La función de la progesterona es preparar al endometrio para la implantación del embrión y el mantenimiento de la preñez, mediante el incremento en el número de glándulas secretorias endometriales y la inhibición de la motilidad del miometrio. A su vez, provoca el desarrollo del tejido secretorio de las glándulas mamarias.

Recientemente, con el desarrollo de la ultrasonografía transrectal, se han podido combinar el radioinmunoanálisis junto con esta última técnica para el estudio del ciclo estral (González de Bulnes y col., 1999). Los altos niveles de progesterona tienen un efecto inhibitorio sobre la pulsatilidad de LH tanto en la vaca, como en la oveja y en la cabra. En la cabra, se ha observado que las ondas foliculares que se desarrollan bajo grandes concentraciones de progesterona tienen folículos de menor tamaño, a diferencia de aquellos que se desarrollan cuando las concentraciones de progesterona son bajas (Ginther y col., 1994). Los niveles de progesterona se correlacionan negativamente con el tamaño folicular y está demostrado que niveles altos de progesterona inducen el recambio folicular en la vaca (Adams y col., 1992) y en la oveja (Rubianes y col., 1996). Por otro lado, los niveles subluteales de progesterona provocan la persistencia del folículo dominante que desencadena la ovulación de un folículo con fertilidad disminuida (Revah y Butler, 1996). Recientemente, también se ha demostrado en la cabra que la progesterona tiene un papel fundamental en el recambio folicular. Trabajos realizados por Menchaca y Rubianes (2002) mostraron que la administración de altos niveles de progesterona durante la fase luteal temprana, afecta el desarrollo del folículo dominante de la onda 1, y adelantan la emergencia de la onda 2.

### *Estrógenos*

El principal estrógeno que se secreta en el ovario es el 17 $\beta$ -estradiol, también estrona y estriol son secretados en concentraciones menores. Las células de la teca de los folículos antrales tienen receptores de LH y las células de la granulosa de FSH. La LH induce la producción de andrógenos por parte de las células tecales que difunden hacia las células de la granulosa. Estos andrógenos son los precursores de los estrógenos bajo el estímulo de la FSH. En la medida que el folículo dominante crece, la FSH induce la formación de LH en las células de la granulosa para producir mayor cantidad de andrógenos que resultan en mayor cantidad de estrógenos producidos por el folículo dominante.

El ciclo estral es una cadena de eventos donde el hipotálamo, la hipófisis, los ovarios y el útero interaccionan para coordinar la función reproductiva. El estradiol, así como la progesterona, tienen un rol fundamental en el control de este mecanismo. El control endócrino que realizan los estrógenos sobre el ciclo estral está determinado por la unión de estas hormonas a sus receptores (ER $\alpha$  y ER $\beta$ ) que se ubican en diferentes sitios del tracto reproductivo.

La fase folicular del ciclo estral en rumiantes comienza con la luteólisis, donde la disminución de la concentración de progesterona hace que desaparezca la retroalimentación negativa sobre la secreción de LH y la hipófisis comienza a secretar un pulso de LH cada 60 minutos (revisado por Bó, 2007). El incremento en los pulsos de LH estimula el desarrollo del folículo dominante, que a su vez incrementa la secreción de estrógenos (principalmente 17 $\beta$ -estradiol). Los niveles de estradiol aumentan desde la regresión luteal hasta el inicio del celo y este aumento en la secreción de estradiol es el responsable del comportamiento estral de las hembras y de la inducción del pico

preovulatorio de LH. Para desencadenar este pico preovulatorio el estradiol aumenta la sensibilidad hipofisaria al estímulo de la GnRH, aumenta el número de receptores de GnRH en las células hipofisarias, se estimula la síntesis de gonadotropinas, aumenta el efecto “preparador” de la GnRH (la GnRH incrementa la respuesta hipofisaria a exposiciones sucesivas de esta hormona), se establece un mecanismo a nivel hipotalámico que termina en una descarga de GnRH que induce el pico preovulatorio de gonadotropinas (revisado por Bó, 2007). El pico preovulatorio de LH produce un aumento del riego sanguíneo en el ovario, se disocia el cúmulus oophurus y se reinicia el proceso de meiosis del ovocito que se encontraba en profase I. Se produce un aumento y cambio en la secreción de esteroides que se manifiesta con un aumento en la secreción de progesterona a partir de la ovulación.

El estradiol también interviene en el mecanismo luteolítico al interactuar con sus receptores endometriales e inducir la síntesis de receptores para oxitocina. Luego la oxitocina circulante se une a los receptores, activa la fosfolipasa A, libera ácido araquidónico, y esto lleva a la producción de PGF2 $\alpha$ . Como ya fue descrito la PGF2 $\alpha$  estimula la liberación de oxitocina por parte del CL, y esta oxitocina luteal induce una mayor secreción de PGF2 $\alpha$  por el endometrio y se establece una retroalimentación positiva que determina la lisis del CL.

En conclusión, las grandes funciones del estradiol en el ciclo estral son intervenir en la manifestación estral (actúa a nivel del sistema nervioso central), en la liberación del pico preovulatorio de LH (actúa a nivel hipotálamo-hipofisario) y en la luteólisis (aumenta los receptores de oxitocina).

#### **4.4. SINCRONIZACION DE LA OVULACION E INSEMINACION ARTIFICIAL**

La sincronización de celo y la IA son dos técnicas extensamente difundidas en pequeños rumiantes que permiten optimizar el uso del material genético de individuos superiores. Una técnica de sincronización de celo debe inducir una respuesta estral fértil y sincronizada. Más recientemente la sincronización de la ovulación permitió desarrollar la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF), de esta manera se logra prescindir de la detección de celo así como mejorar ampliamente el manejo reproductivo.

##### **4.4.1. Sincronización de la ovulación**

En la mayoría de los tratamientos desarrollados se logra inducir y sincronizar los celos, aunque el grado de sincronización y la fertilidad lograda no son del todo satisfactorios. En los últimos años la manifestación estral ha dejado de cobrar importancia y los estudios se han focalizado en sincronizar la ovulación y mejorar la fertilidad obtenida. Para ello se ha trabajado en mejorar los tratamientos tradicionales en base a progestágenos y prostaglandina, con el objetivo de sincronizar las ovulaciones y evitar así la detección de celo.

## *Tratamientos Tradicionales con Progesterona*

Los tratamientos tradicionales consisten en el uso de dispositivos intravaginales de progestágenos (progesterona y sus análogos). Los progestágenos tienen un papel inhibitorio sobre la actividad del eje hipotálamo-hipofisario, de esta manera es que la fase folicular se ve bloqueada y luego de retirar los dispositivos se desencadena y resulta en el estro y la ovulación.

La duración de los tratamientos tradicionales fue variando debido a que al principio se pretendía simular la vida media del cuerpo lúteo. Por lo tanto el dispositivo de progesterona se mantenía en la vagina durante 14-15 días en ovejas y 17-19 días en cabras. Más adelante, la duración de los tratamientos se redujo a 11-12 días en caprinos y se asoció una dosis de PGF2 $\alpha$  previo al retiro del dispositivo (Corteel y col., 1988). Cuando los tratamientos se desarrollan durante el anestro estacional es necesario asociar la progesterona a una gonadotropina al momento de retirar el dispositivo, y la más utilizada es la gonadotropina coriónica equina (eCG). Ésta hormona también es utilizada durante la estación reproductiva debido a que permite concentrar aún más las ovulaciones.

La inserción de los dispositivos de progesterona induce un incremento en las concentraciones plasmáticas de progesterona que se mantienen elevadas durante los primeros 3-4 días, para luego de 6-7 días alcanzar concentraciones subluteales (~ 1ng/ml) al final del tratamiento (Rubianes y col., 1998). Los bajos niveles de progesterona al final del tratamiento afectan la fertilidad debido al efecto sobre el transporte espermático (Evans y Armstrong, 1984) y sobre el desarrollo folicular (Menchaca y Rubianes, 2001). Esta es una de las principales causas que ha llevado a que estos tratamientos largos sean cuestionados en los últimos años.

## *Tratamientos Cortos*

Si bien los resultados en la sincronización de celos con tratamientos tradicionales son aceptables, existen evidencias de que los niveles subluteales de progesterona promueven el crecimiento y la persistencia del folículo de mayor diámetro. Esto provoca la ovulación de folículos “envejecidos” cuando se utilizan tratamientos de 12 a 14 días (Viñoles y col., 2001). La progesterona afecta de manera negativa la secreción pulsátil de LH y el crecimiento terminal de los folículos antrales es inducido por una mayor frecuencia en la pulsatilidad de esta hormona. Es por esto que cuando existen niveles bajos de progesterona plasmática se incrementa la pulsatilidad de LH, y por lo tanto aumenta de tamaño el folículo de mayor diámetro. Frente a esta situación, en condiciones fisiológicas al disminuir las concentraciones de progesterona se establece una retroalimentación positiva entre el estradiol y la GnRH-LH desencadenándose el pico preovulatorio de LH y la ovulación. Existen situaciones (por ejemplo, con el uso de tratamientos largos) donde la progesterona se mantiene en niveles subluteales y por lo tanto se incrementa la pulsatilidad de LH pero el pico preovulatorio está inhibido. En consecuencia, el folículo persiste y prolonga su tiempo de vida. Como resultado ocurre la ovulación de folículos “envejecidos” que predisponen a una menor fertilidad.

Como respuesta a estos conocimientos se han desarrollado tratamientos de corta duración con solo 5-7 días de administración de progestágenos (Tratamientos Cortos). Estos tratamientos se han asociado con PGF2 $\alpha$  al momento de insertar el dispositivo y con eCG al momento del retiro.

Existen diferentes trabajos que han validado este nuevo protocolo tanto durante la estación reproductiva como durante la estación de anestro (Menchaca y col., 2007). Estos trabajos, determinaron la respuesta endócrina, luteal, folicular y ovulatoria provocada por los tratamientos cortos, y de esta manera es que se pudo determinar con exactitud el momento de la ovulación e inseminar sin la detección de celo. En cabras, el momento óptimo para realizar la IATF por vía cervical es a las 54 horas de retirado el dispositivo logrando tasas de preñez superiores al 60% (Menchaca y col., 2007).

#### **4.4.2. Inseminación artificial intrauterina**

En la cabra y en la oveja, la inseminación artificial presenta la dificultad de atravesar el cervix con la cánula de inseminación para alcanzar la luz uterina. Esto ocurre debido a un menor tamaño corporal en comparación con otras especies como las vacas y a la anatomía del cervix (Kershaw y col., 2005). En la cabra, se puede lograr una mayor penetración que en la oveja y esto mejora significativamente los resultados en los programas de inseminación artificial (Evans y Maxwell, 1990).

Diferentes estrategias fueron desarrolladas con el objetivo de superar la barrera que representa el cervix en estas especies, siendo la laparoscopia la alternativa mas eficaz. Ésta permite el abordaje del útero y la deposición del semen directamente en la luz de los cuernos. Cuando se utiliza semen congelado en las cabras superovuladas es necesaria la inseminación intrauterina que generalmente se realiza por laparoscopia. Los tratamientos de superovulación disminuyen el transporte espermático en el tracto reproductivo, por lo tanto la deposición del semen en el útero incrementa notablemente la tasa de fertilización (Evans y Armstrong, 1984). La técnica de IA por laparoscopia consiste en colocar al animal en posición decúbito dorsal con el tren posterior elevado con una inclinación de 45°. Luego se realizan dos punciones en la región ventral del abdomen, a 8-10 cm de la línea media y a 5 cm hacia craneal de la glándula mamaria. El laparoscopio se introduce por la punción del lado izquierdo, y el inyector de semen se coloca por la punción del lado derecho, provisto de una aguja con la cual se punciona el cuerno uterino para depositar el semen.

### **4.5. SUPEROVULACION Y TRANSFERENCIA DE EMBRIONES**

#### **4.5.1. Antecedentes**

La TE es aplicada en diferentes programas de multiplicación de genética en pequeños rumiantes debido a que permite -a partir de un núcleo reducido de reproductores- maximizar la producción de nuevos individuos en un periodo corto de tiempo. Los primeros trabajos de transferencia de embriones en ovinos y caprinos fueron realizados hace mas de 60 años (Warwick y Berry, 1949, citado por Armstrong y Evans, 1983). A partir de entonces, se han logrado muchos avances en todas las tecnologías reproductivas utilizadas en pequeños rumiantes, principalmente desde la década de los 80. El desarrollo de MOET fue bastante lento debido a la variabilidad en la respuesta ovárica a los tratamientos de superovulación, el bajo porcentaje de fertilidad asociado a la alta respuesta ovulatoria y a la alta incidencia de CLRP (Cognié, 1999).

Un programa de MOET con resultados satisfactorios puede considerarse en 10 cuerpos lúteos por donante, 7 embriones colectados, 5 embriones transferibles y un 50-60% de sobrevivencia embrionaria luego de la transferencia a las receptoras (Baldassarre y Karatzas, 2004). En vacas las cifras registradas durante el 2005 de embriones transferidos (producidos *in vivo*) son 612.178, de los cuales el 20,5% fue transferido en América del Sur, el 50% en América del Norte, el 15% en Europa y el 18,9% en Asia (IETS, 2006). De acuerdo a este reporte de la IETS, en cabras y ovejas más de 7000 y 25000 embriones, respectivamente, fueron transferidos durante el 2005 en todo el mundo.

#### **4.5.2. Factores que afectan la respuesta superovulatoria**

Los tratamientos superovulatorios inducen el crecimiento de un alto número de folículos en detrimento de la calidad de los mismos. En ovejas los folículos que ovulan luego de un tratamiento superovulatorio alcanzan un menor tamaño comparado con aquellos que no fueron estimulados (Driancourt, 2001). La mayoría de los estudios de superovulación tienen como objetivo mejorar la respuesta ovulatoria y embrionaria y disminuir la variabilidad en los resultados. Esta variabilidad es atribuida tanto a factores extrínsecos (gonadotropinas, protocolo de superovulación, etc) como a factores intrínsecos al animal (estatus reproductivo, edad, raza, estado nutricional, el individuo) (González de Bulnes y col., 2004).

##### *Factores extrínsecos*

Para la realización de un programa MOET es necesario un tratamiento de superovulación con gonadotropinas. La primera gonadotropina utilizada para los protocolos de superovulación fue la eCG. Esta hormona se administra en una única dosis uno o dos días antes de retirar el dispositivo con progesterona. La eCG tiene una larga vida media, y esto resulta en una alta incidencia de folículos anovulatorios asociada a niveles elevados de estradiol producidos por éstos. El estrógeno producido por estos folículos anovulatorios alteraría el transporte de los gametos disminuyendo así la tasa de fertilización (Evans y Armstrong, 1984). Posteriormente, se comparó el uso de eCG con FSH (Armstrong y col., 1983) y se encontró que la FSH mejora significativamente los resultados en la ovulación y fertilización, así como en la calidad de los embriones obtenidos. Actualmente, las hormonas más utilizadas en los tratamientos de superovulación son extractos de pituitaria de cerdo (pFSH) o de oveja (oFSH).

Si bien es posible la recuperación de embriones por lavaje uterino transcervical, la forma quirúrgica por laparotomía es la más utilizada. Esta técnica tiene como inconvenientes el riesgo quirúrgico y la limitada repetibilidad sobre las hembras. La exteriorización del tracto reproductivo muchas veces genera adherencias que producen una disminución en la colecta embrionaria luego de sucesivas cirugías (Torres y col., 1987).

##### *Factores intrínsecos*

Los principales factores intrínsecos que afectan la respuesta superovulatoria están relacionados con la raza, con la edad, con la nutrición y con el estatus reproductivo (González de Bulnes y col., 2004). Los mejores resultados en la respuesta superovulatoria son encontrados aproximadamente a los seis años de edad (Torres y col., 1987). Aparentemente no existe una

asociación entre la nutrición y la respuesta superovulatoria que afecte la tasa ovulatoria. No obstante, la deficiencia nutricional puede comprometer la viabilidad del ovocito, el desarrollo embrionario, y el desarrollo luteal (González de Bulnes y col., 2004). A su vez existen reportes que indican que cuando los animales son alimentados *ad libitum*, disminuye la respuesta ovulatoria y la calidad ovocitaria y embrionaria (Lozano y col., 2003).

Con el desarrollo de la ultrasonografía transrectal en pequeños rumiantes se ha podido elucidar que una mayor respuesta a los tratamientos con FSH exógena esta asociada a una mayor cantidad de folículos pequeños (2 a 3 mm de diámetro) presentes en el ovario al inicio del tratamiento superovulatorio. Por otra parte la cantidad de folículos grandes esta inversamente relacionada con el número de embriones transferibles (Menchaca y col., 2002). La presencia de un folículo grande al inicio del tratamiento con FSH determina menor reclutamiento folicular, disminución en la respuesta ovulatoria y calidad luteal, y menor cantidad de embriones transferibles (Rubianes y col., 1997; Menchaca y col., 2002). A partir de estos conocimientos, se han desarrollado diferentes estrategias para incrementar el número de folículos pequeños y para asegurar la ausencia de un folículo grande al inicio del tratamiento con FSH.

#### **4.5.3. Hormonas utilizadas**

A continuación se describen las principales hormonas utilizadas en los tratamientos superovulatorios y sus efectos más relevantes.

##### *Progestágenos*

Los progestágenos mas utilizados son la medroxiprogesterona (MAP) y fluorogestona (FGA) en dosis de 60 y 30-40 mg, respectivamente. Éstos se administran en esponjas de poliuretano que presentan algunas desventajas como adherencia de las mismas a la pared vaginal, vaginitis con producción de flujo, etc. Como alternativa se desarrollaron dispositivos de silicona impregnados con progesterona natural (CIDR-G) que no presentan los inconvenientes anteriormente citados. Sin embargo, ambas clases de dispositivos han logrado resultados similares tanto en caprinos (Romano, 2004) como en ovinos (Ungerfeld y Rubianes, 2002).

##### *Prostaglandinas*

Son secretadas por casi todos los tejidos corporales como derivados del ácido araquidónico. Las prostaglandinas son ácidos grasos no saturados de 20 carbonos. La mayoría de ellas actúan en el sitio donde son producidas, no obstante pueden ser transportadas en sangre para actuar en un tejido blanco, lejos del tejido de producción. Las prostaglandinas más relacionadas con la reproducción son la PGF<sub>2α</sub> y la PGE<sub>2</sub>. La PGF<sub>2α</sub> tiene propiedades luteolíticas en los animales domésticos. En la oveja, la PGF<sub>2α</sub> provoca regresión del CL a partir del tercer día luego de la ovulación (Rubianes y col., 2003) y en cabras existen antecedentes que indicarían que el CL es sensible a la PGF<sub>2α</sub> también en etapas tempranas de su desarrollo (Serna y col., 1978).

Además de la función luteolítica, la PGF<sub>2α</sub> regula varios procesos fisiológicos como la contracción del músculo liso en aparato reproductor y el transporte espermático. No obstante, su función luteolítica fue la que impulsó el desarrollo de análogos sintéticos para el control del ciclo

estral de los animales domésticos. Los análogos sintéticos mas utilizados son el Cloprostenol (dextrógiro y racémico), el Delprostenate, y el Dinoprost que es un análogo natural.

#### *Hormona liberadora de gonadotropina*

La GnRH es un decapeptido producido en el hipotálamo que induce la síntesis y liberación de la LH y de la FSH por parte de la hipófisis. Se han sintetizado dos tipos de análogos de GnRH para el manejo del ciclo estral: los antagonistas, que se unen al receptor en la hipófisis pero no inducen la liberación de LH y FSH y bloquean la acción de la hormona natural; y los agonistas que inducen la liberación de FSH y LH. En los tratamientos superovulatorios la GnRH es utilizada para inducir la ovulación luego de la administración de FSH.

#### *Gonadotropina coriónica equina*

La eCG es una glicoproteína con subunidades alfa y beta similares a las de la FSH y LH pero con mayor contenido de carbohidratos, fundamentalmente ácido siálico, que es el que causa la larga vida media. Esta gonadotropina es secretada por el corion equino, a través de las cúpulas endometriales que se forman el día 40 de gestación y se mantienen hasta el día 85. La eCG tiene efectos tanto FSH como LH y se obtiene del suero sanguíneo de yeguas preñadas para su uso en otras especies.

#### *Hormona Folículo Estimulante*

La FSH es comercializada como hormona para inducir la superovulación, y lo que mas se utiliza en ovejas y en cabras son extractos de pituitaria de cerdo (Folltropin<sup>®</sup>, Bioniche, Ontario, Canada o Pluset<sup>®</sup>, Calier, España) o de ovino (Ovagen<sup>®</sup>, ICP, Auckland, Nueva Zelanda).

#### **4.5.4. Tratamientos Tradicionales**

Los protocolos tradicionales de superovulación surgen en la década de los 80 y consisten en un tratamiento con progesterona de 11 días y FSH desde 48-60 horas antes de finalizar dicho tratamiento. Al momento de administrar la primera dosis de FSH se administra una dosis de un análogo de PGF2 $\alpha$ . Este tratamiento induce un incremento en las concentraciones de progesterona durante las primeras 48 horas luego de la inserción del dispositivo que luego comienzan a disminuir alcanzando bajas concentraciones al final del tratamiento (durante la superovulación con FSH). Como fue descrito para los tratamientos de sincronización esto no sería conveniente para la calidad ovocitaria e iría en detrimento de la fertilización y el desarrollo embrionario (Greve y col., 1995). La aplicación de un segundo dispositivo de progesterona durante el tratamiento ha mejorado en cierta medida los resultados en ovinos (Thompson y col., 1990).

#### **4.5.5. Tratamientos Alternativos**

La dominancia folicular se da en presencia de un folículo grande (> 5 mm) que ha requerido para su desarrollo tanto FSH como LH endógena. Por lo tanto la disminución en la secreción de FSH y LH previo al inicio del tratamiento con FSH es una buena alternativa para evitar la dominancia folicular y mejorar la respuesta superovulatoria. Para ello, se han comenzado a utilizar agonistas/antagonistas de GnRH antes de comenzar con el tratamiento de FSH (Cognié y col., 2003). La administración de un tratamiento previo con un agonista como la Buserelina durante 15 días, o de 10 días con un antagonista como el Antarelix combinado con un progestágeno suprime la liberación de gonadotropinas endógenas y el desarrollo folicular. De esta manera es que se inhibe la presencia de folículos grandes y aumenta significativamente el número de folículos pequeños (Cognié y col., 2003). No obstante, en cabras no se logra un alto número de embriones transferibles debido a la baja tasa de fertilización (Cognié y col., 2003). Probablemente la menor tasa de fertilización es debido a que los anti-GnRH afectan la unión de los espermatozoides a la zona pelúcida del ovocito.

Otra de las alternativas desarrolladas para mejorar la eficiencia de los tratamientos superovulatorios es el comienzo del tratamiento con FSH al inicio de una onda folicular, es decir en ausencia de un folículo dominante. Una forma eficaz de predecir el inicio de una onda folicular es tomar como referencia el momento en que ocurre la ovulación, ya que coincide con la emergencia de la onda 1. Se ha propuesto el "Protocolo Día 0" que consiste en un tratamiento previo de sincronización de la ovulación, para luego iniciar el protocolo de superovulación (Menchaca y col., 2002). Para la sincronización de la ovulación se utiliza un Tratamiento Corto (Menchaca y col., 2007) y luego se inicia la administración de FSH a tiempo fijo (84 horas luego de retirar del dispositivo intravaginal). Antes de comenzar con la administración de la FSH se administra una dosis de GnRH (36 horas luego de retirar el dispositivo), con el objetivo de concentrar la ovulación (Pierson y col., 2003). La dosis de FSH es repartida en 6-8 dosis decrecientes administradas cada 12 horas. Con las últimas dos dosis de FSH se administran dos medias dosis de PGF2 $\alpha$  y a las 12 horas de la última FSH se administra una dosis de GnRH. El pico de LH ocurre a las 4 horas y la ovulación entre las 18 y 24 horas de administrada la GnRH (Menchaca y col., 2001). De esta manera es posible realizar una IATF y favorecer la aplicación de estos programas en condiciones comerciales.

## 5. OBJETIVO

### *Objetivo general*

El objetivo del siguiente trabajo fue determinar la respuesta ovárica y embrionaria obtenida con el Protocolo Día 0 y compararla con el Protocolo Tradicional.

### *Objetivos particulares*

- 1) Comparar la respuesta ovárica y embrionaria con el Protocolo Día 0 y el Protocolo Tradicional.
- 2) Determinar dicha respuesta tanto durante la estación reproductiva como durante el anestro estacional.

## 6. MATERIALES Y METODOS



### 6.1. ANIMALES Y MANEJO

Los experimentos se realizaron durante el anestro estacional (Octubre-Diciembre) y durante la estación reproductiva (Marzo-Junio) en el Laboratorio de Fisiología de la Reproducción de la Facultad de Veterinaria (Montevideo, Uruguay, 35° LS). Se utilizaron 63 cabras lecheras multíparas de las razas Pardo Alpina y Saanen que estaban en lactación. Se realizaron 94 tratamientos de superovulación comparando el Protocolo Día 0 y el Protocolo Tradicional (32 cabras recibieron un tratamiento y 31 fueron tratadas dos veces). Las cabras tenían una condición corporal de  $3,1 \pm 0,1$  (media  $\pm$  EE, escala 1 a 5) y un peso corporal de  $49,5 \pm 1,2$  kg. Las hembras tuvieron un período de adaptación de aproximadamente 20 días previo al inicio del tratamiento. La alimentación consistió en 2000g de alfalfa de buena calidad y 800g de ración por animal por día. El agua fue administrada *ad libitum*.

### 6.2. GRUPOS EXPERIMENTALES

El diseño experimental se repitió durante la estación reproductiva (Protocolo Día 0, n=23; Protocolo Tradicional, n=19) y durante el anestro estacional (Protocolo Día 0, n=24; Protocolo Tradicional, n=28). Durante la estación reproductiva se utilizó oFSH en todas las cabras y durante el anestro estacional se utilizó oFSH (Protocolo Día 0, n=7; Protocolo Tradicional, n= 8) ó pFSH (Protocolo Día 0, n=17; Protocolo Tradicional, n= 20). A las cabras con respuesta superovulatoria (2 o más CL) se les realizó una laparotomía paramediana para realizar la recuperación embrionaria. Hubo cabras a las que se les realizó una sola recuperación embrionaria "*flushing 1*" (n=32) ó cabras a las que se les realizó dos recuperaciones embrionarias "*flushing 2*" (n=21). Para cada estación los grupos experimentales fueron diseñados de manera balanceada considerando la FSH y el número de *flushing* de cada cabra. En la figura 1 se describen los grupos experimentales.

#### 6.2.1. Protocolo Día 0

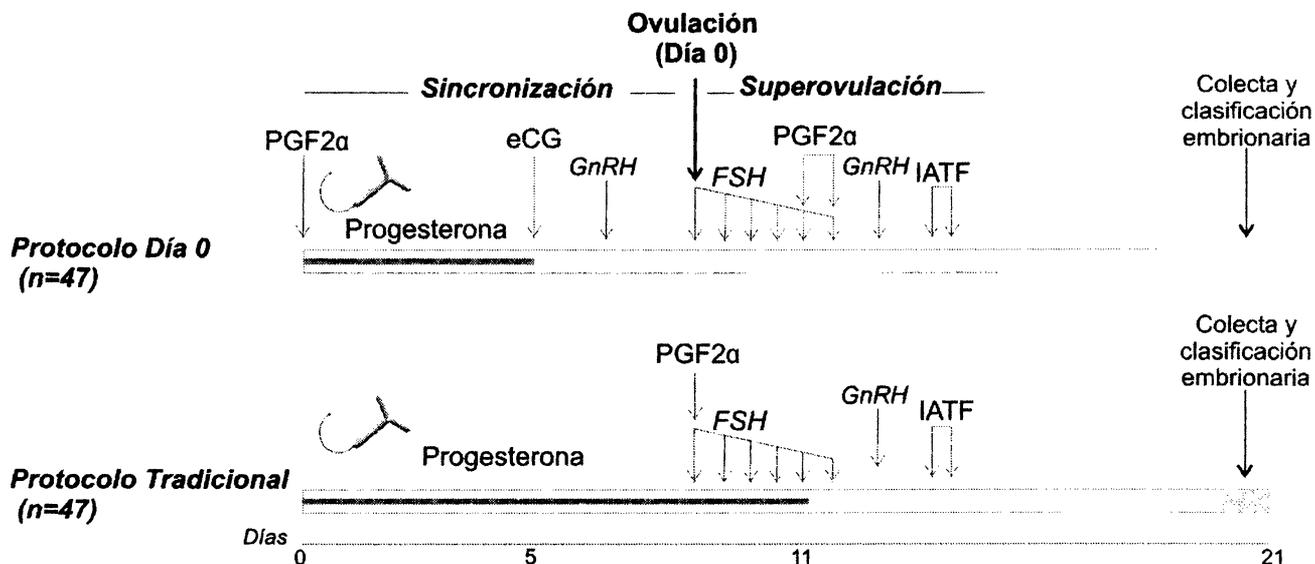
El momento de la ovulación (Día 0) fue sincronizado con un Tratamiento Corto (Menchaca y col., 2007) previo al inicio del tratamiento con FSH. El Tratamiento Corto consistió en la aplicación de un dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR-G, 0,3 g de progesterona, Eazy-Breed, Auckland, Nueva Zelanda) durante cinco días. Al momento de la inserción del CIDR se administró una dosis de un análogo de PGF2 $\alpha$  i.m. (delprostenate 160  $\mu$ g, Glandinex, Universal Lab, Montevideo, Uruguay) y al momento del retiro se administró 200 UI de eCG i.m. (Novormon, Syntex, Buenos Aires, Argentina). A las 24 horas del retiro del CIDR-G se administró una dosis de 8  $\mu$ g de un análogo de GnRH i.m. (acetato de busarelina, Receptal, Hoechst, Argentina). Cuando se colocó el CIDR-G se realizó una ecografía para evaluar el estatus folicular. El comportamiento estral fue detectado a través de machos enteros con una frecuencia de dos veces al día durante las 84 horas siguientes al retiro del dispositivo. Los machos permanecían apartados y en el momento de la detección se llevaban al brete donde se encontraban las hembras. Se consideró en estro aquellas cabras que se mantenían quietas frente a los intentos de monta (no se permitía la monta completa). También se tuvo en cuenta el aumento de inquietud y nerviosismo de las hembras, el comportamiento homosexual, elevación y

movimiento del rabo y búsqueda del macho. La ovulación se confirmó mediante la técnica de ultrasonografía transrectal a las 36 horas de retirado el CIDR-G (al momento de administrar la GnRH) y a las 84 horas de retirado el CIDR-G (con la primera dosis de FSH). La ovulación fue definida como la desaparición de un folículo grande entre estas dos veces que se visualizaron los ovarios por ultrasonografía.

El Protocolo Día 0 comenzó con la primera dosis de FSH administrada a las 84 horas de retirar el CIDR-G. Durante la estación reproductiva se utilizó oFSH i.m. (8,8 mg NIADDK oFSH-17, Ovagen, ICPbio, Auckland, Nueva Zelanda, n=23) y durante el anestro estacional se utilizó oFSH (n=7) ó pFSH (200 mg NIH-FSH-P1, Folltropin, Bioniche, Ontario, Canada, n=17). La FSH fue administrada en seis dosis decrecientes (dos veces por día) durante tres días. Con las dos últimas dosis de FSH se administraron dos medias dosis de un análogo de PGF2 $\alpha$  i.m. (80  $\mu$ g cada una). A las 12 horas de la última FSH se administró una dosis i.m. de 8 un análogo de GnRH y al día siguiente 16 y 26 horas luego de administrada la dosis de GnRH se realizó la IA con semen congelado vía intrauterina por medio de laparoscopia.

### **6.2.2. Protocolo Tradicional**

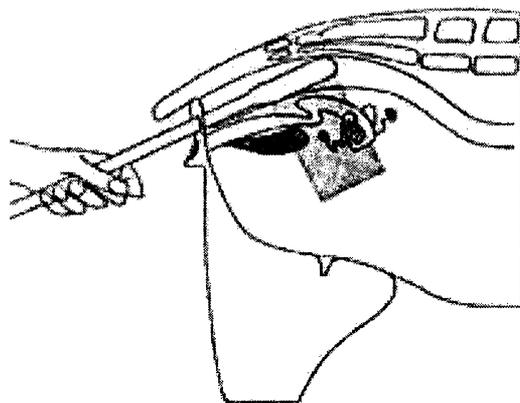
Se utilizó el tratamiento descrito por Armstrong y col. (1983). El protocolo comenzó con la inserción de un CIDR-G, que a los 6 días se cambió por uno nuevo, completando 11 días de administración de progesterona. Al momento de insertar el CIDR-G se realizó una ecografía para evaluar el estatus folicular. A los 9 días de iniciado el tratamiento se comenzó con la administración de FSH i.m. durante tres días repartida en seis dosis decrecientes a intervalos de 12 horas. Durante la estación reproductiva se utilizó oFSH i.m. (n=19) y durante el anestro estacional se utilizó oFSH (n=8) ó pFSH (n=20). Se realizó una ultrasonografía al momento de administrar la primera dosis de FSH. Una dosis de un análogo de PGF2 $\alpha$  fue administrada con la primera dosis de FSH y a las 12 horas de la última FSH se administró una dosis de un análogo de GnRH. Al día siguiente (16 y 26 horas luego de administrada la GnRH) se realizó la IA con semen congelado vía intrauterina por medio de laparoscopia.



**Figura 1.** Esquema representativo del Protocolo Día 0 y el Protocolo Tradicional para la superovulación de cabras. El Protocolo Día 0 se inició con un Tratamiento Corto de sincronización (5 días) y el tratamiento con FSH se inició a las 84 horas del retiro del dispositivo. El Tratamiento Tradicional consistió en la inserción de un CIDR-G durante 11 días y el tratamiento con FSH en dosis decrecientes comienza dos días antes del retiro del dispositivo.

### 6.3. ULTRASONOGRAFIA TRANSRECTAL

Para realizar las ecografías se utilizó un equipo Aloka 500 SSD (Tokyo, Japón) con un transductor lineal de 7,5 MHz. A este se le dio rigidez insertándolo en un caño de PVC de 30 cm cortado longitudinalmente. De ese modo fue posible introducir el transductor en el recto y manipularlo desde el exterior para identificar las estructuras ováricas (ver Figura 2). Los folículos fueron clasificados como pequeños, medianos y grandes (3 a <4mm; 4 a 5mm;  $\geq 5$  mm respectivamente).



**Figura 2.** Ultrasonografía transrectal del tracto reproductor de una oveja. En posición craneal al aparato urinario el transductor se gira en sentido horario y anti-horario para localizar los ovarios. (Modificado de Kähn, 1994).

#### **6.4. INSEMINACION ARTIFICAL**

La inseminación artificial a tiempo fijo se realizó por vía intrauterina por laparoscopia (Karl Store Hopkins, Tuttlingen, Alemania). Las cabras fueron inseminadas a las 16 y a las 26 horas luego de administrada la dosis de GnRH. Se utilizó semen congelado a una dosis de  $100 \times 10^6$  espermatozoides totales por pajuela.

#### **6.5. RESPUESTA OVARICA**

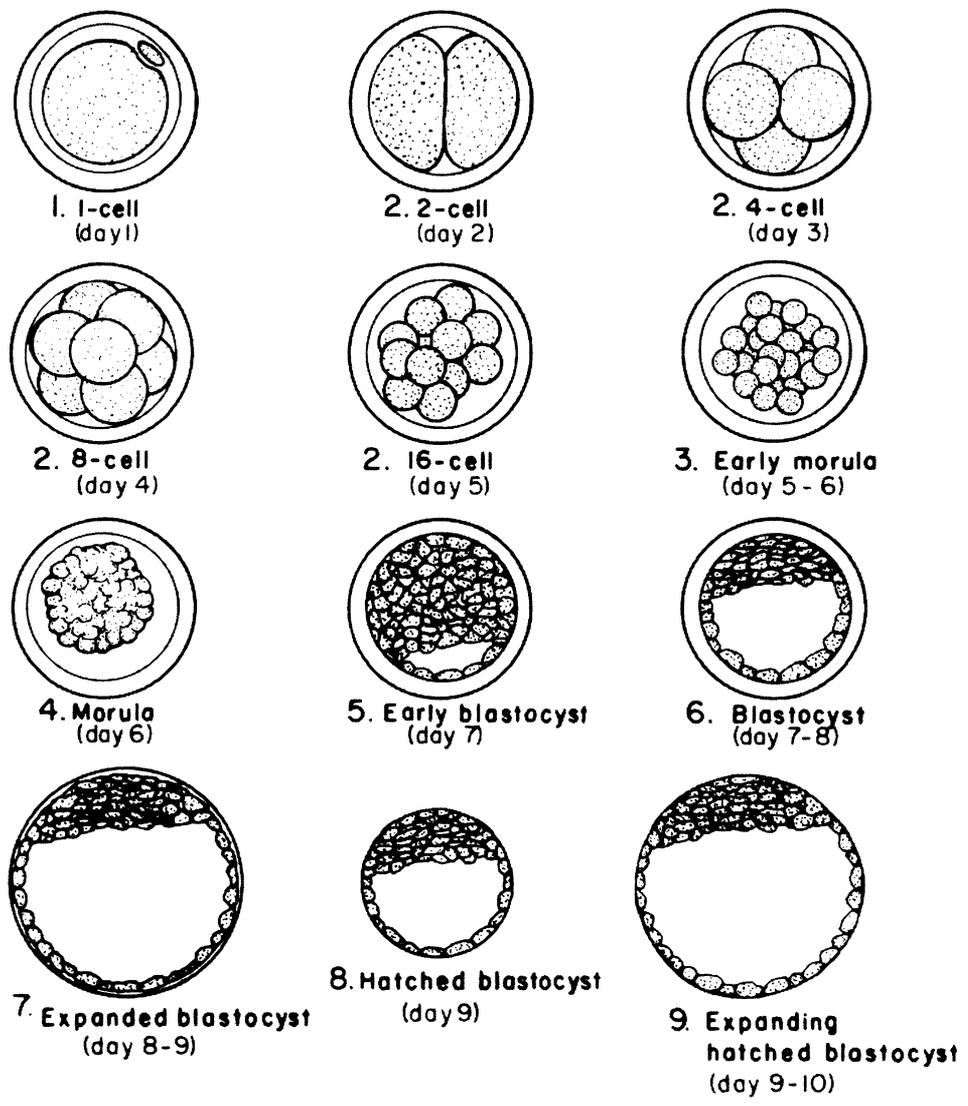
La respuesta ovárica fue evaluada por laparoscopia a los 6,5 días de la inseminación, donde se determinó la cantidad de CL. Los CL fueron clasificados como normales cuando tenían un color rojo intenso y cuando el color era de rosado pálido a blanco se clasificaban como CLRP. Las cabras con más de dos CL normales fueron consideradas como cabras con respuesta y se les realizó la recuperación embrionaria. A las cabras que tenían CLRP no se les realizó la recuperación embrionaria.

#### **6.6. COLECTA EMBRIONARIA**

La recuperación embrionaria se realizó por laparotomía paramediana a los 6,5 días de la inseminación. Las cabras se mantuvieron 24 horas en ayuno sólido y 12 horas en ayuno líquido. Recibieron una sedación previa con una combinación de diazepam (7,5 mg i.v., Unizepan, Unimedical, Montevideo, Uruguay) y ketamina (100 mg i.v., Vetanarcol, König, Buenos Aires, Argentina). Posteriormente, durante la cirugía permanecieron bajo anestesia inhalatoria con halotano (Halothane RP, Rhône-Poulenc, Montevideo, Uruguay). Las hembras fueron colocadas en camillas para laparoscopia con una inclinación de  $45^\circ$  y se rasuró y desinfectó el campo operatorio. Se realizó una incisión (5 cm de longitud) paralela a la línea media y craneal a la ubre que permitió exteriorizar los cuernos uterinos. Cada cuerno uterino fue lavado por separado insertando un catéter de 18G próximo a la unión útero-tubal por el cual se hizo pasar 40 ml de medio de lavado (Complete Flushing Solution, ICP, Auckland, Nueva Zelanda) que fue colectado con una sonda foley 8 o 9 Fr (Rush) insertada en la bifurcación externa del cuerno. Los embriones fueron colectados en una caja de Petri (90 mm).

#### **6.7. BUSQUEDA Y CLASIFICACION DE EMBRIONES**

La búsqueda de los embriones se realizó bajo lupa estereoscópica a 40x y a medida que se identificaron las estructuras se fueron aspirando con una jeringa conectada a un capilar y se colocaron en una caja de petri de 35 mm con PBS, para luego ser clasificadas. Durante este período los embriones permanecieron a temperatura de laboratorio ( $18-25^\circ\text{C}$ ), protegidos de la luz y en condiciones de esterilidad. Los embriones fueron clasificados según su calidad y según su estadio de desarrollo. Para su clasificación se utilizaron los criterios de la International Embryo Transfer Society (IETS, 1998). Según su calidad, los embriones se clasificaron como: Grado 1 (excelente y buena), Grado 2 (regular), Grado 3 (pobres), Grado 4 (degenerados y UFO). Los embriones grado 1, 2 y 3 fueron considerados como embriones transferibles. De acuerdo al estadio de desarrollo se clasificaron como: mórula, morula compacta, blastocisto temprano, blastocisto, blastocisto expandido y blastocisto eclosionado (Figura 3).



**Figura 3.** Esquema de las etapas del desarrollo embrionario temprano. En las TE los embriones son colectados entre los días 6 y 8 del ciclo estral, cuando se encuentran en el estadio de mórula (día 6) o blastocisto (día 7 a 8). (Manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de embriones, 1998, pág. 107).

## 6.8. ANALISIS ESTADISTICO

Los datos fueron analizados por separado para la estación reproductiva y para el anestro estacional ya que las condiciones ambientales no fueron las mismas para ambas situaciones.

El tamaño (mm) del folículo de mayor diámetro al momento de colocar el CIDR y al inicio del tratamiento con FSH fue comparado por análisis de varianza (ANOVA). En el modelo estadístico se incluyó el efecto del tratamiento (Día 0 y Tradicional) y el número de colecta de la cabra (*flushing* 1 o 2). Se utilizó el test de sobrevivencia para comparar el tiempo transcurrido desde el retiro del CIDR al inicio del celo en las cabras del Protocolo Día 0 entre la estación reproductiva y la estación de anestro. La población folicular, el número de cuerpos lúteos y las estructuras embrionarias fueron analizados por el modelo de regresión binomial negativa, debido a la sobredispersión encontrada con el modelo de regresión de Poisson. En el modelo estadístico se incluyó el efecto del Tratamiento (Día 0 y Tradicional), el número de lavado (debido a que fueron medidas repetidas sobre los mismos animales), y la FSH utilizada (oFSH; pFSH). Los datos presentados como frecuencias fueron analizados por el Test exacto de Fisher. Los resultados se presentaron como media  $\pm$  E.E., y las diferencias fueron consideradas significativas cuando  $P < 0,05$ . El análisis estadístico fue realizado con el software Stata 8,0.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. ESTATUS OVARICO PREVIO AL TRATAMIENTO CON PROGESTERONA

No hubo diferencias significativas en la población folicular al comenzar el tratamiento con progesterona entre las cabras del Protocolo Día 0 y el Protocolo Tradicional, tanto durante la estación reproductiva como durante el anestro estacional. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Estatus folicular (media  $\pm$  EE) al inicio de los tratamientos de superovulación (Día 0 y Tradicional) en cabras lecheras durante la estación reproductiva y el anestro estacional.

	Estación Reproductiva			Anestro Estacional		
	Protocolo	Protocolo	<i>P</i>	Protocolo	Protocolo	<i>P</i>
	Día 0 (n=23)	Tradicional (n=19)		Día 0 (n=24)	Tradicional (n=28)	
Estado Folicular al colocar el CIDR						
No. de folículos pequeños (3-4mm)	9,1 $\pm$ 2,3	8,4 $\pm$ 2,0	<i>ns</i>	8,6 $\pm$ 1,4	9,6 $\pm$ 1,4	<i>ns</i>
No. de folículos medianos (4-5mm)	0,4 $\pm$ 0,3	0,8 $\pm$ 0,5	<i>ns</i>	1,4 $\pm$ 0,3	1,0 $\pm$ 0,3	<i>ns</i>
No. de folículos grandes (>5mm)	2,0 $\pm$ 0,5	2,4 $\pm$ 0,5	<i>ns</i>	2,6 $\pm$ 0,3	2,7 $\pm$ 0,3	<i>ns</i>
Diámetro del mayor folículo (mm)	6,0 $\pm$ 0,8	6,8 $\pm$ 0,3	<i>ns</i>	6,2 $\pm$ 0,2	6,3 $\pm$ 0,3	<i>ns</i>

### 7.2. EMERGENCIA DE LA ONDA 1 INDUCIDA CON EL TRATAMIENTO CORTO

La respuesta estral luego de retirar el CIDR-G no fue evaluada en la última replica realizada durante el anestro estacional, por lo tanto el número de cabras evaluadas en este período fue 17. La frecuencia de hembras en estro durante la estación reproductiva y durante el anestro estacional fue de 65,2% (15/23) y 82,4 % (14/17), respectivamente. El intervalo desde el retiro del CIDR-G al inicio del estro fue de 34,4  $\pm$  1,3 horas durante la estación reproductiva y 40,3  $\pm$  2,2 horas durante el anestro.

A las 36 horas de retirar el CIDR-G (en el momento que se administró la dosis de GnRH), se encontró que todas las cabras presentaban folículos grandes tanto en la estación reproductiva como en el anestro estacional. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

A las 84 horas del retiro del CIDR-G, solo el 25,5% (12/47) de las cabras presentaban folículos grandes, confirmando la ovulación inducida por el Tratamiento Corto del 74,5% (35/47) de las cabras tratadas.

Tabla 2. Respuesta ovulatoria (media  $\pm$  EE) del Tratamiento Corto (160  $\mu$ g de un análogo de PGF2 $\alpha$  + CIDR 5 días + 200UI eCG), utilizado para sincronizar la ovulación de las cabras que luego recibieron el Protocolo Día 0.

	Estación Reproductiva (n=23)	Anestro Estacional (n=24)	<i>P</i>
Estado folicular 36 horas luego del retiro del CIDR			
N° de folículos grandes (>5mm)	2,1 $\pm$ 0,2	1,8 $\pm$ 0,3	<i>ns</i>
Diámetro del folículo de mayor tamaño (mm)	6,8 $\pm$ 0,2	6,7 $\pm$ 0,2	<i>ns</i>
Estado folicular 84 horas luego del retiro del CIDR			
N° de folículos grandes (>5mm)	0,5 $\pm$ 0,9	0,3 $\pm$ 0,6	<i>ns</i>
Diámetro del folículo de mayor tamaño (mm)	4,4 $\pm$ 1,2	4,2 $\pm$ 0,8	<i>ns</i>

### 7.3. ESTATUS FOLICULAR AL INICIO DEL TRATAMIENTO CON FSH

En el Protocolo Día 0 se encontró mayor cantidad de folículos pequeños y menor cantidad de folículos grandes en comparación con el Protocolo Tradicional al inicio del tratamiento superovulatorio, tanto durante la estación reproductiva como durante el anestro estacional (Tabla 3 y Figura 4). Sin embargo no hubo diferencias en la cantidad de folículos medianos en la estación reproductiva ni en el anestro estacional. Por otro lado el tamaño del folículo de mayor diámetro fue menor para el Protocolo Día 0 que para el Protocolo Tradicional al momento de comenzar el tratamiento superovulatorio, tanto durante la estación reproductiva como durante la estación de anestro. Como resultado general, el Protocolo Día 0 inició el tratamiento con FSH en ausencia de un folículo dominante en el 70-79% de las cabras mientras que con el Protocolo Tradicional sólo fue en un 16-7%. Los resultados se presentan en la Tabla 3 y en la Figura 4.

Tabla 3. Respuesta folicular (media  $\pm$  EE) al inicio del tratamiento con FSH para el Protocolo Día 0 y Tradicional durante la estación reproductiva y el anestro estacional en cabras lecheras.

	Estación Reproductiva			Anestro Estacional		
	Protocolo Día 0 (n=23)	Protocolo Tradicional (n=19)	<i>P</i>	Protocolo Día 0 (n=24)	Protocolo Tradicional (n=28)	<i>P</i>
Estado Folicular a la 1er dosis de FSH						
Diámetro del mayor folículo (mm)	4,5 $\pm$ 0,3	6,7 $\pm$ 0,4	< 0,01	4,2 $\pm$ 0,3	6,5 $\pm$ 0,3	< 0,01
No. de cabras con ausencia de folículo grande (%)	16/23 (70%)	3/19 (16%)	< 0,01	19/24 (79%)	2/28 (7%)	< 0,01

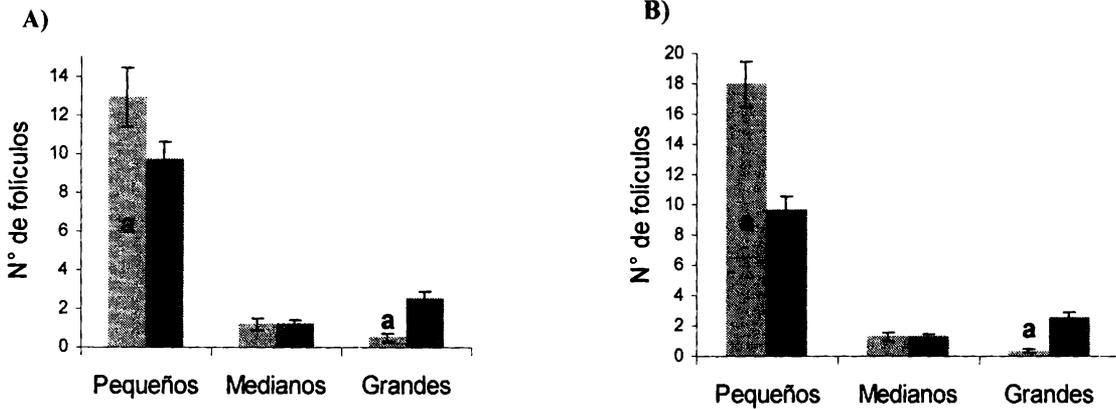


Figura 4. Número (media  $\pm$  EE) de folículos pequeños, medianos y grandes al inicio del tratamiento con FSH para el Protocolo Día 0 (barras claras) y Protocolo Tradicional (barras oscuras) durante A) estación reproductiva y B) anestro estacional en cabras lecheras. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tratamientos ( $P < 0,05$ ).

## 7.4. RESPUESTA OVULATORIA Y EMBRIONARIA

Los resultados son presentados sobre el total de las hembras tratadas y posteriormente sobre las que tuvieron respuesta.

### 7.4.1. Respuesta sobre el total de las cabras

#### *Estación Reproductiva*

Con el protocolo Día 0 se obtuvo una mayor respuesta ovulatoria y embrionaria (Tabla 4). Se encontró que 3/23 (13%) y 11/19 (58%) tuvieron CLRP para el Protocolo Día 0 y Tradicional, respectivamente ( $P < 0,05$ ). No se encontró efecto de la FSH utilizada ni en el número de *flushing* realizado ( $P > 0,05$ ).

**Tabla 4.** Respuesta ovulatoria y embrionaria (media  $\pm$  EE) del total de las cabras tratadas, comparando el Protocolo Día 0 con el Protocolo Tradicional durante la estación reproductiva (media  $\pm$  EE).

Tratamiento	Cabras con $\geq 2$ CL (%)	CL normales	Embriones Colectados	Embriones Transferibles
Día 0 n=23	20/23 (87%)	8,1 $\pm$ 0,8	5,5 $\pm$ 0,8	3,5 $\pm$ 0,7
Tradicional n=19	8/19 (42%)	3,5 $\pm$ 1,0	1,8 $\pm$ 0,6	0,8 $\pm$ 0,3
<i>P</i>	$< 0,001$	$< 0,05$	$< 0,001$	$< 0,05$

#### *Anestro Estacional*

Durante el anestro estacional no se encontraron diferencias significativas en la respuesta al tratamiento, 3/24 (12,5%) y 3/28 (11%) cabras tuvieron CLRP para el Protocolo Día 0 y Tradicional, respectivamente. Al igual que en estación reproductiva, tampoco se encontró efecto de la FSH, ni del número de *flushing* realizado. En la tabla 5 se muestra que no hubo diferencias significativas para ninguna de las variables analizadas.

**Tabla 5.** Respuesta ovulatoria y embrionaria (media  $\pm$  EE) del total de las cabras tratadas, comparando el Protocolo Día 0 con el Protocolo Tradicional durante anestro estacional (media  $\pm$  EE).

Tratamiento	Cabras con $\geq 2$ CL (%)	CL normales	Embriones Colectados	Embriones Transferibles
Día 0 n=24	21/24 (88%)	12,2 $\pm$ 1,7	8,5 $\pm$ 1,6	4,9 $\pm$ 1,0
Tradicional n=28	25/28 (89%)	10,8 $\pm$ 1,3	7,3 $\pm$ 1,0	3,3 $\pm$ 0,6
<i>P</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

#### 7.4.2. Respuesta sobre las cabras en las que se colectaron embriones

Los resultados sobre las cabras que tuvieron respuesta se presentan en la Tabla 6. No se encontró un efecto de la FSH utilizada, ni en el número de *flushing* en ninguna de las variables analizadas. La respuesta ovárica (número de CL normales) no se vio afectada por el tratamiento (Protocolo Día 0 vs Protocolo Tradicional) durante la estación reproductiva, ni tampoco durante la estación de anestro. Si bien se colectaron ~1,9 y ~1,5 embriones (estación reproductiva y anestro estacional, respectivamente) más con el Protocolo Día 0 que con el Tradicional, esta diferencia no fue significativa.

Hubo una tendencia estadística a obtener una mayor cantidad de embriones grado 1 & 2 con el Protocolo Día 0 que con el Protocolo Tradicional durante la estación reproductiva ( $P=0,7$ ) y durante el anestro estacional ( $P=0,9$ ). La cantidad de embriones grado 1 & 2/embriones colectados fue mayor para el protocolo Día 0 que para el Tradicional tanto durante la estación ( $P<0,05$ ) como durante el anestro ( $P<0,01$ ).

**Tabla 6.** Respuesta ovulatoria y embrionaria (media  $\pm$  EE), comparando el Protocolo Día 0 con el Protocolo Tradicional durante la estación reproductiva y el anestro estacional en cabras lecheras.iiii

	Estación Reproductiva			Anestro Estacional		
	Protocolo Día 0 (n=23)	Protocolo Tradicional (n=19)	<i>P</i>	Protocolo Día 0 (n=24)	Protocolo Tradicional (n=28)	<i>P</i>
No. de cuerpos luteos	9,3 $\pm$ 0,5	8,3 $\pm$ 0,8	<i>ns</i>	14 $\pm$ 1,6	12 $\pm$ 1,2	<i>ns</i>
No. estructuras colectadas	6.3 $\pm$ 0.8	4.4 $\pm$ 0,7	<i>ns</i>	9.7 $\pm$ 1.5	8,2 $\pm$ 1,0	<i>ns</i>
Fertilizados/ Colectados (%)	96/126 (76%)	25/35 (74%)	<i>ns</i>	163/203 (80%)	154/204 (75%)	<i>ns</i>
No. embriones transferibles	4,1 $\pm$ 0,8	2,9 $\pm$ 0,6	<i>ns</i>	5,9 $\pm$ 1,1	4,5 $\pm$ 0,6	<i>ns</i>
No. de embriones grado 1&2	4,1 $\pm$ 0,7	2,0 $\pm$ 0,5	$<0,1$	5,6 $\pm$ 1,1	3,7 $\pm$ 0,6	$<0,1$
Grado 1&2/ embriones colectados (%)	81/126 (64%)	16/35 (46%)	$<0,05$	118/203 (58%)	92/204 (45%)	$<0,01$

## **8. DISCUSION**

El Protocolo Día 0 mejoró significativamente el porcentaje de hembras con respuesta superovulatoria (sin CLRP) en comparación con el Protocolo Tradicional durante la estación reproductiva. A su vez en las donantes con respuesta la calidad embrionaria medida como el número de embriones grado 1&2 sobre embriones colectados aumentó significativamente con el Protocolo Día 0. Esta respuesta estuvo asociada a la ausencia de un folículo dominante al inicio del tratamiento con FSH en el Protocolo Día 0 al inducir la emergencia de la onda 1 mediante un Tratamiento Corto.

En el protocolo Día 0 el momento de la ovulación (Día 0) y la emergencia de la onda 1 previo al inicio del tratamiento superovulatorio, fue sincronizado con un Tratamiento Corto descrito en un reporte previo (Menchaca y col., 2007). En el citado estudio el Tratamiento Corto permitió sincronizar la ovulación en el 87% de las cabras a las 60 horas de retirado el CIDR-G. En el presente trabajo una dosis de GnRH fue administrada 36 horas luego del retiro del dispositivo, con el objetivo de sincronizar aún más la ovulación (Pierson y col., 2003). Como resultado se indujo la ovulación en el 75% de las cabras. Esto fue confirmado por ecografía al momento de administrar la GnRH y 48 horas luego (junto con la primera dosis de FSH, a las 84 horas del retiro del CIDR-G). Estos resultados confirman la efectividad de los Tratamientos Cortos asociados a una dosis de GnRH como alternativa para sincronizar la onda 1. En suma, el Tratamiento Corto permitió iniciar el tratamiento superovulatorio a tiempo fijo (84 horas luego del retiro del CIDR-G) asegurando la ausencia de un folículo dominante en la mayoría de las cabras.

Luego del tratamiento con FSH, ambos protocolos de superovulación permitieron una tasa de fertilización aceptable (76-80%). A partir de estos datos se observa la eficacia del Protocolo Día 0 en sincronizar la ovulación. Esto permitió realizar la inseminación a tiempo fijo y ésta resultó en un plausible porcentaje de fertilización de manera similar a lo reportado en el Protocolo Tradicional (Armstrong y col., 1983).

La mayoría de las cabras (70-79 %) que recibieron el Protocolo Día 0 estaban en ausencia de un folículo dominante al inicio del tratamiento superovulatorio, versus el 16% y 7% (estación reproductiva y anestro estacional, respectivamente) de las hembras tratadas con el Protocolo Tradicional. Por lo tanto la ausencia de un folículo dominante estuvo asociada a una mejor respuesta superovulatoria y embrionaria. Estos resultados coinciden con trabajos previos que encuentran un efecto negativo de la presencia de un folículo dominante sobre la respuesta superovulatoria tanto en cabras (Menchaca y col., 2002) como en ovejas (Rubianes y col., 1997) y vacas (Adams y col., 1994). Un trabajo reciente en ovejas superovuladas mostró que la incidencia de folículos anovulatorios estrogénicos afectando la respuesta superovulatoria está relacionada a la presencia de un folículo dominante al inicio del tratamiento con FSH (Veiga-López y col., 2006). A su vez, la respuesta ovulatoria luego de un tratamiento de superovulación está relacionada a la cantidad de folículos pequeños presentes al inicio del tratamiento con FSH (González de Bulnes y col., 2000). En nuestro trabajo se observó una mayor cantidad de folículos pequeños al inicio del tratamiento de superovulación para el Protocolo Día 0 que para el Protocolo Tradicional. Esto demuestra que utilizando el Protocolo Día 0 este factor se puede

controlar, favoreciendo así un mayor reclutamiento de folículos capaces de responder al tratamiento superovulatorio.

Trabajos en ovejas superovuladas con un Protocolo Tradicional (González de Bulnes y col., 2003) han encontrado un efecto inhibitorio sobre la respuesta superovulatoria (menor número de embriones viables) cuando las hembras presentaban un folículo dominante al inicio del tratamiento con FSH durante la estación reproductiva. Sin embargo, durante el anestro estacional, no se vio afectado ninguno de los parámetros superovulatorios evaluados. Estos datos sugieren que la presencia de un folículo dominante al inicio de los tratamientos superovulatorios tiene un efecto más marcado durante la estación reproductiva que durante el anestro estacional. Los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con el citado reporte, debido a que la incidencia de CLRP fue mayor durante la estación reproductiva que durante el anestro estacional.

Los embriones colectados se clasificaron de acuerdo a su estadio de desarrollo y a su calidad. Si bien no se encontraron diferencias estadísticas, el Protocolo Día 0 resultó en la producción de 2 embriones grado 1&2 más que el Protocolo Tradicional tanto durante la estación reproductiva como durante la estación de anestro. Esta tendencia en el incremento de la calidad embrionaria cuando el Protocolo Día 0 es utilizado podría explicarse por un mayor número de folículos que responden a la gonadotropina administrada, que coincide con la presencia de un mayor número de folículos pequeños y la ausencia de un folículo dominante.

La disminución en la cantidad de embriones y en la viabilidad de los mismos cuando el tratamiento con FSH se inicia en presencia de un folículo dominante también estaría relacionada con la formación de CL subnormales (González de Bulnes y col., 2002; Rubianes y col., 1997). Se observó una alta incidencia de cabras con CLRP, que en este caso alcanzó ~ 50% cuando el Protocolo Tradicional se utilizó durante la estación reproductiva. Durante el anestro estacional no se encontró diferencias en la incidencia de cabras con CLRP entre el Protocolo Tradicional y el Protocolo Día 0. Estos resultados coinciden con programas MOET realizados previamente en cabras durante la estación reproductiva (Amstrong y Evans, 1983). En estos trabajos se encontró una baja tasa de colecta embrionaria cuando el lavado se realizó a los 6-8 días de detección del estro y coincidió con un alto porcentaje de hembras con CLRP. Pintado y col. (1998) encontraron una mayor incidencia de CLRP durante la estación reproductiva, que superó el 50% de las cabras tratadas. Si bien durante la estación reproductiva había un mayor número de folículos evaluados al momento de la colecta embrionaria, el total de embriones viables fue mayor en el anestro estacional. Jabbour y col. (1991) encontraron también una mayor incidencia de CLRP durante el otoño que durante la primavera, y sugieren la existencia de un componente nutricional para este fenómeno.

La causa por la cual luego de un tratamiento superovulatorio existe una alta incidencia de CLRP no es clara. Existen reportes que indican que la prostaglandina F 2 $\alpha$  endógena está relacionada a la incidencia de CLRP (Battye y col., 1988). La secreción prematura de prostaglandina F 2 $\alpha$  podría estar asociada a la presencia de altas concentraciones de estradiol durante la fase luteal temprana. Esta hipótesis surge de trabajos en otras especies donde la administración exógena de estrógenos luego de la ovulación culmina en regresión luteal prematura (revisado por Jabbour y col., 1991). La incidencia de CLRP también ha sido asociada a problemas en la nutrición (Jabbour y col., 1991), al uso de eCG en los protocolos de superovulación (altos niveles de

estradiol, debido a la presencia de folículos persistentes) (Saharrea y col., 1998) y posiblemente al estrés (Pintado y col., 1998). Es importante tener en cuenta el delicado equilibrio endocrino necesario para mantener un CL funcional. Una situación de estrés podría tener un importante efecto sobre este equilibrio endócrino y en consecuencia sobre la incidencia de CLRP. En ovejas se ha observado que el estrés calórico reduce la secreción de LH (revisado por Pintado y col., 1996). No se ha encontrado ningún reporte donde se estudie el efecto del estrés sobre la ovulación en cabras. No obstante, es importante tener en cuenta que el manejo intensivo con encierros frecuentes de las cabras durante un programa MOET genera cierto grado de estrés y esto podría estar causando una alteración a nivel endócrino que comprometa el correcto desarrollo del CL.

En términos generales, de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, el estatus folicular al inicio del tratamiento superovulatorio afectaría el desarrollo folicular y por lo tanto la calidad de los embriones colectados y de los cuerpos lúteos. Esta respuesta podría estar influenciada por la estación del año (estación reproductiva o anestro estacional). Estos resultados indican que el Protocolo Día 0 permite obtener una mayor cantidad de cabras con más de dos CL en estación reproductiva, y a su vez una mejor calidad embrionaria que resulta en un mayor número de embriones transferibles por cabra superovulada.

## **9. CONCLUSIONES**

Los resultados del presente trabajo permiten concluir que -comparado al Protocolo Tradicional- el Protocolo Día 0 permite:

- ✓ Aumentar significativamente el número de cabras que responden con la formación de más de dos cuerpos lúteos normales al tratamiento superovulatorio durante la estación reproductiva.
- ✓ Mejorar la calidad de los embriones colectados obteniendo un mayor número de embriones grado 1 & 2/estructuras colectadas, tanto durante la estación reproductiva como en anestro estacional.

## **10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

1. Adams GP. (1994) Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: Implications for synchronization and superstimulation. *Theriogenology*; 41:19-24.
2. Adams GP, Nasser LF, Bo GA, Garcia A, Del Campo MR, Mapletoft RJ. (1994) Superstimulatory response of ovarian follicles of Wave 1 versus Wave 2 in heifers. *Theriogenology*; 42:1103-1113,
3. Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JCH, Ginther OJ. (1992) Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J Reprod Fert*; 94:177-188.
4. Arbiza Aguirre SI. (1986) Estado actual de la cría de cabras en el mundo. En: Arbiza Aguirre SI. *Producción de caprinos*, México DF, AGT, pp.1-45.
5. Armstrong DT, Evans G. (1983) Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. *Theriogenology*; 19:31-42.
6. Armstrong DT, Pfitzner AP, Warnes GM, Ralph MM, Seamark RF. (1983) Endocrine responses of goats after induction of superovulation with PMSG and FSH. *J Reprod Fertil*; 67:395-401.
7. Bartlewsky PM, Beard AP, Rawlings NC. (2000) Ultrasonographic study of ovarian function during early pregnancy and after parturition in the ewe. *Theriogenology*; 53:673-689.
8. Bartlewsky PM, Beard AP, Rawlings NC. (1999) Ovarian function in ewes during the transition from breeding season to anoestrus. *Anim Rep Sci*; 57:51-66.
9. Bartlewsky PM, Beard AP, Cook SJ, Rawlings NC. (1998) Ovarian follicular dynamics during anestrus in ewes. *J Reprod Fertil*; 113:275-285.
10. Baldassarre H, Karatzas CN (2004) Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. *Anim Reprod Sci*; 82-83:255-266.
11. Battye KM, Fairclough RJ, Cameron Awn, Trounson AO. (1988) Evidence for prostaglandin involvement in early luteal regression of the superovulated nanny goat (*Capra hircus*). *J Reprod Fertil*; 84:425-430.
12. Blaszczyk B, Udala J, Gaczarzewicz D. (2004) Changes in estradiol, progesterone, melatonin, prolactin and thyroxine concentrations in blood plasma of goats following induced estrus in and outside the natural breeding season. *Small Rum Res*; 51:209-219.

13. Bó GA (2007) Actualización del control endócrino del ciclo estral bovino. En: Bó GA, Alonso A, Caccia M, Carcedo J, Cutaia L, Moreno D, Martinez M, Baruselli P. *Especialidad en Reproducción Bovina (Fisiología de la Reproducción de la vaca)*, Instituto de Reproducción Animal Córdoba, Córdoba, pp. 39-51.
14. Campbell BK, Scaramuzzi RJ, Webb R. (1995) Control of follicle development and selection in sheep and cattle. *J Reprod Fertil Suppl*; 49:335-350.
15. Chemineau P. (1983) Effect on oestrus and ovulation of exposing Creole goats to the male at three times of the year. *J Reprod Fertil*; 67:65-72.
16. Cognie Y, Baril G, Poulin P, Mermillod P. (2003) Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*; 59:171-188.
17. Cognie Y. (1999) State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology*; 51:105:116.
18. Corteel JM, Lebouef B, Baril G. (1988) Artificial breeding of adults goats and kids induced with hormones to ovulate outside the breeding season. *Small Rum Res*; 1:19-35.
19. de Castro T, Rubianes E, Menchaca A, Rievero A. (1999) Ovarian dynamics, serum estradiol, and progesterone concentrations during the interovulatory interval in goats. *Theriogenology*; 52:399-411.
20. Delgadillo JA, Canedo GA, Chemineau P, Gillaume D, Malpoux B. (1999) Evidence for an annual reproductive rhythm independent of food availability in male creole goats in subtropical northern Mexico. *Theriogenology*; 52:727-737.
21. Delgadillo JA, Leboeuf B, Chemineau P. (1991) Decrease in the seasonality of sexual behaviour and sperm production in bucks by exposure to short photoperiodic cycles. *Theriogenology*; 36:755-770.
22. Driancourt MA. (2001) Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation or reproduction. *Theriogenology*; 55:1211-1239.
23. Evans G, Maxwell WMC. (1990) Inseminación. En: Evans G, Maxwell WMC. *Inseminación artificial de ovejas y cabras*, Zaragoza, Acribia, pp.143-164.
24. Evans G, Armstrong DT. (1984) Reduction of sperm transport in ewes by superovulation treatments. *J Reprod Fertil*; 70:47-53.
25. FAO (2008) Disponible en: <http://www.fao.org/ag/aga/glipha/index.jsp?page=home.html>  
Fecha de consulta: 20/01/2008
26. FAO (1985) Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/009/ah221e/ah221e00.htm>.  
Small ruminant production in the developing countries. Fecha de consulta: 10/02/2008.

27. Freitas VJF, Rondina D, Lopes Júnior, Teixeira DIA, Paula NRO. (2004) Hormonal treatments for the synchronisation of oestrus in dairy goats raised in the tropics. *Reprod Fertil Dev*; 16:415-420.
28. Ginther OJ, Kot K, Kulick LJ, Wiltbank MC (1997) Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. *Theriogenology*; 48:75-87.
29. Ginther OJ, Kot K, Wiltbank MC. (1995) Association between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. *Theriogenology*; 43:689-703.
30. Ginther OJ, Kot K. (1994) Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. *Theriogenology*; 42:987-1001.
31. González de Bulnes A, Baird DT, Campbell BK, Cocero MJ, García-García RM, Inskip EK, López-Sebastián A, McNeilly AS, Santiago-Moreno J, Souza CJH, Veiga-López A. (2004) Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. *Reprod Fertil Dev*; 16:421-435.
32. González de Bulnes A, Garcia-Garcia RM, Santiago-Moreno J, Dominguez V, Lopez-Sebastián, Cocero MJ. (2003) Reproductive season affects inhibitory effects from large follicles on the response to superovulatory FSH treatments in ewes. *Theriogenology*; 60:281-288.
33. González de Bulnes, A.; Santiago-Moreno, J.; Cocero, M.J.; Souza, C.J.H.; Groome, N.P.; García-García, R.M.; López-Sebastián, A.; Baird, D.T. (2002) Measurement on inhibin A predicts the superovulatory response to exogenous FSH in sheep. *Theriogenology*; 57:1263-1272.
34. González de Bulnes A, Santiago-Moreno J, Cocero MJ, Lopez-Sebastian A. (2000) Effects of FSH comercial preparation and follicular status on follicular growth and superovulatory response in Spanish Merino ewes. *Theriogenology*; 54:1055-1064.
35. González de Bulnes A, Santiago-Moreno J, Gómez-Brunet A, Inskip EK, Townsend EC, López Sebastian A (1999) Follicular dynamics during estrous cycle in dairy goats. *Anim Sci*; 68:547-554.
36. Greve T, Callesen H, Hyttel P, Hoier R, Assey R. (1995) The effects of exogenous gonadotrophins on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology*; 43:41-50.
37. Hunter MG. (1991) Characteristics and causes of the inadequate corpus luteum. *J Reprod Fert Suppl*; 43:91-99.

38. IETS (2006) Data Retrieval Committee Annual Report.  
Disponibile en: [http://www.iets.org/pdf/data\\_retrieval/december2006.pdf](http://www.iets.org/pdf/data_retrieval/december2006.pdf)  
Fecha de consulta: 05/04/2008
39. IETS (1998) Manual of the International Embryo Transfer Society. Tercera ed. En: Illinois, Stringfellow DA y Seidel SM, pp. 167-170.
40. Jabbour HN, Ryan JP, Evans G, Maxwell WMC. (1991) Effects of season, GnRH administration and Lupin supplementation on the ovarian and endocrine responses of Merino ewes treated with PMSG and FSH-P to induce superovulation. *Reprod Fertil Dev*; 3:699-707.
41. Johnson SK, Dailey RA, Inskoop EK, Lewis PE. (1996) Effect of peripheral concentrations of progesterone on follicular growth and fertility in ewes. *Domestic Anim Endocrinol*; 13:69-79.
42. Kähn W. (1994) Ultrasonography in sheep and goats. En: *Veterinary Reproductive Ultrasonography*. Hannover, Mosby-Wolfe, pp. 187-210.
43. Kershaw CM, Khalid M, Mc Gowan MR, Ingram K, Leethongdee S, Wax G, Scaramuzzi RJ. (2005) The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. *Theriogenology*; 64:1225-1235.
44. Lozano JM, Lonergan P, Boland MP, O'Callaghan D. (2003) Influence of nutrition on the effectiveness of superovulation programmes in ewes: effect on oocyte quality and post-fertilization development. *Reproduction*; 125:543-553.
45. Lucy MC, Savio JD, Badinga L, De la Sota RL, Thatcher WW (1992) Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J Anim Sci*; 70:3615-3626.
46. Martin GB, Rodger J, Blache D. (2004) Nutritional and environmental effects on reproduction in small ruminants. *Reprod Fertil Dev*; 16:491-501.
47. Martin GB, Tjondronegoro S, Boukhliq R, Blackberry MA, Briegel JR, Blache D, Fisher JA, Adams NR. (1999) Determinants of the annual pattern of reproduction in mature male Merino and Suffolk sheep: modification of endogenous rhythms by photoperiod. *Reprod Fertil Dev*; 11:355-366
48. Menchaca A, Miller V, Salveraglio V, Rubianes E. (2007) Endocrine, luteal and follicular responses after the use of the Short-Term Protocol to synchronise ovulation in goats. *Anim Reprod Sci*; 102:76-87.
49. Menchaca A, Rubianes E. (2002) Relation between progesterone concentrations during the early luteal phase and follicular dynamics in goats. *Theriogenology*; 57:1411-1419

50. Menchaca A, Pinczak A, Rubianes E. (2002) Follicular recruitment and ovulatory response to FSH treatment initiated on Day 0 or Day 3 postovulation in goats. *Theriogenology*; 58:1713-1721.
51. Menchaca A. (2002) Principales aspectos de la fisiología reproductiva en la especie caprina. En: Ungerfeld R. Reproducción en los animales domésticos. Tomo I, Montevideo, Melibea, pp.259-268.
52. Menchaca A, Rubianes E. (2001) Effect of high progesterone concentrations during the early luteal phase on the length of the ovulatory cycle of goats. *Anim Reprod Sci*; 68:69-76.
53. Palmer E, Driancourt MA, (1980) Use of ultrasonic echography in equine gynecology. *Theriogenology*; 13:203-216.
54. Pierson JT, Baldassarre H, Keefer CL, Downey BR. (2003) Influence of GnRH administration on timing of the LH surge and ovulation in dwarf goats. *Theriogenology*; 60:397-406.
55. Pierson RA, Ginther OJ. (1984) Ultrasonography of the bovine ovary. *Theriogenology*; 21:495-504.
56. Pinczak A, Menchaca A, Rubianes E. (2001) Seguimiento ultrasonográfico ovárico y uterino durante la gestación temprana de la cabra. IV Simposio Internacional de Reproducción Animal. Córdoba, Argentina, p. 298 (abstract).
57. Pintado B, Gutierrez-Adán A, Pérez Llano B. (1998) Superovulatory response of Murciana goats to treatments based on PMSG/ANTI-PMSG or combined FSH/PMSG administration. *Theriogenology*; 50:357-364.
58. Pintado B, Gutierrez-Adán A, Pérez B, Garde J. (1996) Influence of the synchronization treatment on the superovulatory response of Murciana goats. *Small Rum Res*; 23:135-141.
59. Ravindra JP, Rawlings NC, Evans ACO, Adams GP. (1994) Ultrasonographic study of ovarian follicular dynamics in ewes during the oestrus cycle. *J Reprod Fertil*; 101:501-509.
60. Revah I, Butler WR (1996) Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. *J Reprod Fertil*; 106:39-47.
61. Rivera GM, Alanis GA, Chaves MA, Ferrero SB, Morello HH. (2003) Seasonality of estrus and ovulation in Creole goats of Argentina. *Small Rum Res*; 48:109-117.

62. Romano JE. (2004) Synchronization of estrus using CIDR, FGA or MAP intravaginal pessaries during the breeding season in Nubian goats. *Small Rum Res*; 55:15-19.
63. Rubianes E, Menchaca A. (2003) The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats. *Anim Reprod Sci*; 78:271-287.
64. Rubianes E, Menchaca A, Carbajal B. (2003) Response of the 1-5 day-aged ovine corpus luteum to prostaglandin F<sub>2α</sub>. *Anim Reprod Sci*; 78:47-55.
65. Rubianes E. (2000) Ondas de desarrollo folicular y respuesta ovárica en la oveja. Tesis de doctorado, PEDECIBA, UdelaR, Montevideo, Uruguay, pp 10-14.
66. Rubianes E, de Castro T, Kmaid S. (1998) Estrous response after a short progesterone priming in seasonally anestrous goats. *Theriogenology*; 49:356 (abstract).
67. Rubianes E, Ungerfeld R, Viñoles C, Rivero A, Adams GP. (1997) Ovarian response to gonadotropin treatment initiated relative to wave emergence in ultrasonographically monitored ewes. *Theriogenology*; 47:1479-1488.
68. Rubianes E, de Castro T, Carbajal B. (1996) Effect of high progesterone levels during the growing phase of the dominant follicle of Wave 1 in ultrasonically monitored ewes. *Can J Anim Sci*; 76:473-475.
69. Saharrea A, Valencia J, Balcazar A, Mejia O, Cerbon JL, Caballero V, Zarco L. (1998) Premature luteal regression in goats superovulated with PMSG: effect of hCG or GnRH administration during the early luteal phase. *Theriogenology*; 50:1039-1052.
70. Savio JD, Thatcher WW, Morris GR, Entwistle K, Drost M, Mattiacci MR. (1993) Effects of induction of low plasma progesterone concentrations with a progesterone-releasing intravaginal device on follicular turnover and fertility in cattle. *J Reprod Fertil*; 98:77-84.
71. Scaramuzzi RJ, Adams NR, Baird DT, Campbell BK, Downing JA, Findlay JK, Henderson KM, Martin GB, McNatty KP, McNeilly AS, Tsonis CG. (1993) A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reprod Fertil Dev*; 5:459-478.
72. Schrick FN, Surface RA, Dailey RA, Townsend EC, Inskeep EK. (1993) Ovarian structures during the estrous cycle and early pregnancy in ewes. *Biol Reprod*; 49:1133-1140.
73. Serna JA, Bousu WTK, Barker CAV. (1978) Sequential administration of cronolone and Prostaglandin F<sub>2α</sub> for estrous synchronization in goats. *Theriogenology*; 9:177-185.
74. Sirois J, Fortune JE. (1988) Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol Reprod*; 39:308-317.

75. Stata Corp 2003. Stata Statistical Software: Release 8.0 College Station, TX: Stata Corporation.
76. Thompson JGE, Simpson AC, James RW, Tervit HR. (1990) The application of progesterone-containing CIDR devices to superovulated ewes. *Theriogenology*; 33:1297-1304.
77. Torres S, Sevellec C. (1987) Repeated superovulation and surgical recovery of embryos in the ewe. *Reprod Nutr Dev*; 27:859:863.
78. Ungerfeld R, Rubianes E. (2002) Short term primings with different progestogen intravaginal devices (MAP, FGA and CIDR) for eCG-estrous induction in anestrus ewes. *Small Rum Res*; 46:63-66.
79. Veiga-López A, González de Bulnes A, Tresguerres JAF, Domínguez V, Ariznavarreta C, Cocero MJ. (2006) Causes, characteristics and consequences of anovulatory follicles in superovulated sheep. *Dom Anim Endocrinol*; 30:76-87.
80. Viñoles C, Forsberg M, Banchero G, Rubianes E. (2002) Ovarian follicular dynamics and endocrine profiles in Polwarth ewes with high and low body condition. *Anim Sci*; 74:539-545.
81. Viñoles C, Forsberg M, Banchero G, Rubianes E. (2001) Effect of long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. *Theriogenology*; 55:993-1004.
82. Viñoles C, Meikle A, Forsberg M, Rubianes E. (1999) The effect of subluteal levels of exogenous progesterone on follicular dynamics and endocrine patterns during the early luteal phase of the ewe. *Theriogenology*; 51:1351-1361.