



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**

**UTILIZACIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO NEUROLÓGICO BETA PARA  
ESTIMULAR EL DESARROLLO FOLICULAR Y LA OVULACIÓN DE OVEJAS EN  
ANESTRO**

por

MOREIRA DINARDI, Maria Micaela  
PIQUERIZ SASSEN, Nicole

TESIS DE GRADO presentada como uno de  
los requisitos para obtener el título de Doctor  
en Ciencias Veterinarias  
Orientación: Producción Animal y Medicina  
Veterinaria

MODALIDAD: Ensayo experimental

**MONTEVIDEO**  
**URUGUAY**  
**2021**

**PÁGINA DE APROBACIÓN**

**Tesis de grado aprobada por:**

**Presidente de tribunal:**

  
\_\_\_\_\_  
**Danilo Fila**

**Segundo miembro (Tutor):**

  
\_\_\_\_\_  
**Juan Pedro Botino**

**Tercer miembro:**

  
\_\_\_\_\_  
**Graciela Pedrana**

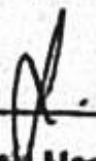
**Cuarto miembro:**

  
\_\_\_\_\_  
**Rodolfo Ungerfeld**

**Fecha**

  
\_\_\_\_\_  
**23/12/21**

**Autores**

  
\_\_\_\_\_  
**Mariana Micaela Moreira Dinardi**

  
\_\_\_\_\_  
**Nicole Prquez Sasen**

## AGRADECIMIENTOS

A nuestro tutor el Dr. Juan Pedro Bottino y a nuestro co-tutor Dr. Rodolfo Ungerfeld, por la dedicación que tuvieron a lo largo del ensayo experimental y en el transcurso de la tesis.

Al personal y autoridades de INIA “Las Brujas” por brindar las instalaciones para la realización del trabajo experimental y ayuda durante el transcurso del mismo.

A nuestros familiares, amigos y compañeros quienes han sido el soporte durante esta carrera, que sin su apoyo y acompañamiento, no habría sido posible.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
RESUMEN	6
SUMMARY	7
1. INTRODUCCIÓN	8
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
2.1. Fisiología reproductiva del ovino	9
2.1.1. Ciclo estral	9
2.1.2. Estacionalidad reproductiva	9
2.1.3. Regulación neuroendocrina del ciclo estral	9
2.1.4. Desarrollo folicular	10
2.1.5. Mecanismo de ovulación	10
3. HIPÓTESIS	14
4. OBJETIVO	14
5. MATERIALES Y MÉTODOS	15
5.1. Obtención del $\beta$ NGF	15
5.2. Animales y su manejo	15
5.3. Tratamiento	15
5.4. Examen ecográfico de los ovarios	15
5.5. Análisis estadístico	16
6. RESULTADOS	18
7. DISCUSIÓN	19
8. CONCLUSIÓN	21
9. BIBLIOGRAFÍA	22

Tabla 1. Medias de mínimos cuadrados, EMM pooleado y valor P de ovulaciones y tamaños foliculares registrados mediante controles ecográficos realizados cada 12 h, luego de aplicar los tratamientos (Control, GEN y BET)..... 18

Figura 1. Imágenes obtenidas durante el control ecográfico ovárico. Se visualizan folículos preovulatorios. Se muestran los diámetros foliculares (diámetro 1 y diámetro 2) de los cuales se calculó un promedio para obtener la medida final..... 16

## RESUMEN

La ovulación se puede desencadenar de forma espontánea o inducida según la especie de la que se trate. En ovuladores inducidos la ovulación ocurre en respuesta a estímulos vinculados a la cópula, como ocurre en las llamas, en que existe una proteína presente en el plasma seminal de los machos que es la responsable de inducir el pico de hormona luteinizante y la ovulación. Esta proteína es denominada  $\beta$ NGF (factor de crecimiento neurológico beta) y se ha demostrado su presencia en el plasma seminal de toros y carneros (ovuladores espontáneos), aunque su función en estas especies es aún desconocida. En el presente trabajo se planteó investigar si la administración de  $\beta$ NGF era capaz de inducir el desarrollo folicular durante el período periovulatorio y producir la ovulación en ovejas en anestro estacional con posterior formación de cuerpo lúteo. El trabajo se realizó durante octubre (anestro estacional), con 24 ovejas y borregas de una cruce que tenía como base las razas Milchschaf y Finnish Landrace ( $50,7 \pm 2,5$  kg y condición corporal de  $3,3 \pm 0,5$ ; media  $\pm$  DE). A las mismas se le insertaron dispositivos intravaginales impregnados con progesterona, con el fin de simular una fase lútea. Al momento del retiro de los dispositivos, siete días después de la introducción se dividió los animales en tres grupos homogéneos. Las ovejas del primer grupo no recibieron ningún tratamiento (grupo Control) (n=8), a las del segundo grupo se les administró un análogo de la hormona liberadora de gonadotropina (acetato de gonadorelina, 50  $\mu$ g/animal IV, control positivo) (grupo GEN) (n=7), y a las del tercer grupo una dosis de un purificado de  $\beta$ NGF obtenido del plasma seminal de llamas (1 mg/animal, IV) (grupo BET) (n=9). Mediante ecografía transrectal se registró el tamaño de los folículos mayores a 4 mm y su desarrollo, cada 12 h, desde el retiro de los dispositivos intravaginales hasta detectar la ovulación o regresión de los mismos. Se consideró a los folículos que superaban los 4 mm como preovulatorios y que hubo ovulación cuando ocurrió la desaparición de uno de estos. Ocho días después se realizó un control ecográfico para evaluar los cuerpos luteos formados. Las ovulaciones fueron de un solo folículo y ocurrieron únicamente en el grupo BET, donde 8 de 9 ovejas ovularon. Además, el número de folículos grandes observados por día en este grupo fue mayor que en los otros dos. Se observó en cinco de ellas presencia de una estructura compatible con cuerpo lúteo, mientras que en las restantes no se logró identificar. Por lo tanto, el tratamiento con  $\beta$ NGF estimuló el desarrollo folicular e indujo la ovulación en ovejas en anestro.

## SUMMARY

Ovulation may be spontaneously triggered or induced, depending on the species in question. In the case of induced ovulators, ovulation occurs as a response to mating-associated stimuli; for instance, in *llamas* a protein present in the seminal plasma of males is responsible for inducing a surge in luteinizing hormone and ovulation. This protein is called  $\beta$ NGF (nerve growth factor beta), which has been proven to be present in the seminal plasma of bulls and rams (spontaneous ovulators), although its function is yet unknown in these species. In this study, we investigated whether the administration of  $\beta$ NGF was capable of inducing follicular development during the preovulatory period and producing ovulation in sheep in seasonal anoestrus with subsequent formation of the corpus luteum. To begin with, 24 Milchaschaf- and Finnish Landrace-based crossbred sheep and lambs ( $50.7 \pm 2.5$  kg, and body condition of  $3.3 \pm 0.5$ ; average  $\pm$  DE) were used. These animals were inserted progesterone impregnated intravaginal devices with the purpose of stimulating a luteal phase. At the time of removing the devices (seven days after being introduced), the animals were divided in three homogenous groups. The sheep included in the first group did not receive any treatment (Control group) (n=8), while the sheep in the second group were administered a gonadotropin-releasing hormone analogue (gonadorelin acetate, 50  $\mu$ g/animal IV, positive control) (GEN group) (n=7), and the sheep in the third group received a dose of purified  $\beta$ NGF obtained from seminal plasma of *llamas* (1 mg/animal, IV) (BET group) (n=9). By means of transrectal ultrasound, the size of follicles greater than 4 mm and their growth were registered every 12 hours, from the time of removing the devices until detecting ovulation or their regression. Follicles larger than 4 mm were considered as preovulatory, and ovulation was deemed to occur upon disappearance of one of such follicles. Eight days later, an ultrasound examination was performed to evaluate the corpus luteum formed. Ovulations were of single follicle and occurred only in the BET group, where 8 out of 9 sheep ovulated. Furthermore, the number of large follicles observed per day in this group was greater than in the other two. A corpora lutea-compatible structure was observed in 5 of them, with no identification in the remaining animals. Consequently, the treatment with  $\beta$ NGF stimulated follicular growth and induced ovulation in sheep in anoestrus period.

## 1. INTRODUCCIÓN

La producción agropecuaria es la base de la economía del país (Secretariado de la Lana (SUL), 2020). En el rubro ovino los cambios productivos vinculados a la caída del precio de la lana durante los últimos años exigen producir en forma más eficiente carne de cordero para mantener la rentabilidad en los sistemas ovinos, lo cual requiere modificaciones en el manejo reproductivo tradicional. Cualquier incremento en la producción de corderos que no demande costos importantes redundará en un incremento potencial de las ganancias del productor. Existen varias estrategias reproductivas para incrementar la producción de corderos: aumentar la cantidad de corderos nacidos por parto o aumentar la cantidad de partos por oveja. Las ovejas presentan reproducción estacional, lo que determina que exista un prolongado período del año durante el cual no hay ciclicidad ni preñez. En nuestro país, las ovejas de raza Corriedale (más predominante) comienzan a ciclar en febrero y si no quedan preñadas continúan haciéndolo hasta junio-julio (Ungerfeld y Rubianes, 2001). Como regla general, las ovejas de razas carniceras comienzan su época reproductiva más tarde y las de lana más fina ciclan más tempranamente. La estacionalidad reproductiva sumada al hecho de que la gestación dura 5 meses determina que no sea posible obtener partos entre noviembre y junio. La actividad reproductiva en los ovinos puede ser controlada, por ejemplo, a través del control del fotoperiodo de forma artificial, regulación de la temperatura, estimulando las ovejas mediante el efecto macho, entre otros (Pijoan, García y Lucas, 1987), siendo el método más utilizado el tratamiento hormonal (Sharkey, Callan, Mortimer y Kimberling, 2001). La administración de progestinas, sustancias similares a la progesterona secretada por el cuerpo lúteo (CL), se realiza comúnmente por dispositivos intravaginales (esponjas o CIDR). Durante el anestro estacional el uso de estos dispositivos en combinación con hormonas como la gonadotrofina coriónica equina (eCG) determina que ocurra la ovulación (Ungerfeld y Rubianes, 2001). La utilización de técnicas que permitan inducir celos fuera de la estación reproductiva puede tener varias ventajas, como por ejemplo encarnerar las ovejas 3 veces en 2 años, incrementando la cantidad de corderos producidos (Ungerfeld y Rubianes, 2001).



## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Fisiología reproductiva del ovino

#### 2.1.1. Ciclo estral

El ciclo estral es un conjunto de eventos que se repiten sucesivamente (Ungerfeld, 2002) y tiene una duración de 16 a 17 días, siendo más corto en borregas que en ovejas adultas (Uribe, Correa y Osorio, 2009). El ciclo estral lo podemos dividir en proestro (desde el comienzo de la luteolisis hasta el inicio del celo), estro (celo) el cual se considera como el día 0 del ciclo, ya que este es fácilmente detectable debido a la manifestación del comportamiento sexual por parte de la hembra (Ungerfeld, 2002), metaestro (desde el final del celo hasta la formación del cuerpo lúteo) y diestro (presencia del cuerpo lúteo activo) (Ungerfeld, 2011). También de manera más sencilla lo podemos dividir en 2 fases, una fase luteal que se extiende desde el día 2-3 hasta alrededor del día 13 y una fase folicular que va desde la luteolisis (regresión del cuerpo lúteo) que se produce el día 13-14 hasta el día 2 (Ungerfeld, 2011).

#### 2.1.2. Estacionalidad reproductiva

Los ovinos son una especie con una estacionalidad reproductiva marcada, lo que significa que los ciclos estrales ocurren sucesivamente durante un período limitado del año. Por eso, la oveja es considerada una especie poliéstrica estacional (Karsch, 1980). El comienzo de la actividad reproductiva ocurre con la disminución del fotoperíodo (Atuesta y Gonella, 2011). La glándula pineal juega un rol imprescindible en este proceso, actuando como un órgano transductor neuroendocrino capaz de convertir la señal nerviosa proveniente de la retina en una señal química resultando en la producción de melatonina (Leyva-Ocariz, 2014). Esta hormona actúa en la regulación de la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (Binkley, 1988). La síntesis y liberación de melatonina está acoplada al ciclo de luz-oscuridad; sus niveles en la glándula pineal y en la sangre periférica aumentan en la noche y disminuyen durante el día (Keefe y Turek, 1985; Turek y Van Cauter, 1988). La liberación nocturna de melatonina es la señal traductora de la información fotoperiódica a los centros hipotalámicos que controlan la liberación de hormonas hipofisarias siendo estas la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) (Ungerfeld, 2002).

#### 2.1.3. Regulación neuroendocrina del ciclo estral

El ciclo estral resulta de la coordinación de cuatro estructuras principales: el hipotálamo, la hipófisis, los ovarios y el útero. Estas estructuras se comunican mediante mecanismos endocrinos. Las principales hormonas involucradas son la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), secretada por el hipotálamo, la LH y FSH secretada por la hipófisis, el estradiol, la inhibina y la progesterona de origen ovárico y la prostaglandina F2 alfa (PGF2 $\alpha$ ) secretada por el útero (Ungerfeld, 2002). Durante la fase folicular ocurre una disminución en la concentración de progesterona como consecuencia de la luteólisis; la emergencia y crecimiento del/los folículo/s durante este período conlleva un aumento en la concentración de estrógenos (E2) que

son responsables de los cambios comportamentales que desencadenan la receptividad sexual. Neuronas GnRH carecen de receptores para E2, por lo que la liberación de GnRH no ocurre por la acción directa de estos, sino que otros grupos neuronales sensibles a los E2 intermedian su acción (Smith, Cunningham, Rissman, Clifton, Steiner, 2005). Estas neuronas secretan kisspeptina y otros péptidos que regulan la secreción de GnRH en respuesta al aumento preovulatorio de la concentración sanguínea de E2 (Casey et al., 2012). Luego de la ovulación las células del folículo ovulatorio se diferencian a células luteales y constituyen el CL secretando grandes cantidades de progesterona, comenzando así la fase luteal (Atuesta y Gonella, 2011). La progesterona genera un control negativo sobre la frecuencia de pulsos de LH inhibiendo por tanto la pulsatilidad de esta hormona. Por otro lado, mientras está presente durante los primeros días de la fase luteal, la progesterona inhibe la secreción uterina de PGF2 $\alpha$ , determinando con ello el momento del ciclo en el que se produce la luteólisis. La permanencia del CL dependerá del balance entre factores luteotrofos y luteolíticos (Ungerfeld, 2002).

#### 2.1.4. Desarrollo folicular

En la oveja, el desarrollo folicular ocurre en un patrón de ondas. El proceso de crecimiento folicular es continuo e independiente de la fase del ciclo estral. Una vez iniciado, el folículo se desarrollará de su estado primordial (100  $\mu$ m) hasta la ovulación (mayor que 5 mm en la oveja) o en la mayoría de los casos hasta su atresia (Uribe et al., 2009). Muchos estudios describen que hay de dos a cuatro ondas foliculares durante cada ciclo estral (Uribe et al., 2009), pero hay varios factores que pueden afectar el número de ondas por ciclo. Durante la transición desde el anestro estacional a la estación reproductiva los ciclos inter ovulatorios pueden ser más largos o más cortos que lo normal y por lo tanto tienen más o menos ondas foliculares (Ginther, Kot, Wiltbank, 1995). Estos folículos crecen y uno de ellos es seleccionado, continúa creciendo y se convierte en folículo dominante, mientras el resto de los folículos, llamados subordinados, se vuelven atrésicos y regresan (Ungerfeld, 2002). La razón por la cual el folículo dominante puede crecer con niveles bajos de FSH mientras que los subordinados se atresian puede estar relacionado con la síntesis de receptores para LH en las células de la granulosa del folículo dominante. Todos los folículos poseen receptores de LH en las células de la teca y de FSH en la granulosa pero sólo el folículo dominante adquiere receptores de LH en las células de la granulosa. La cantidad de receptores de LH aumenta abruptamente a partir del día 3 de la onda, cuando el folículo dominante tiene más de 5 mm de diámetro. La LH se une a los receptores de las células de la granulosa estimulando una mayor producción de E2, lo que le permite al folículo seguir creciendo aun cuando disminuyen los niveles de FSH (Ginther et al., 1995). El folículo dominante de la primera onda es anovulatorio porque se desarrolla durante la fase luteal y tiene una fase de crecimiento, una fase estática y una fase de regresión (Ginther, Kastelic y Knopf, 1989).

#### 2.1.5. Mecanismo de ovulación

La ovulación es un momento crucial en el proceso reproductivo de mamíferos, donde los eventos que conducen a ella y la posibilidad de manipularla han sido motivo de investigación con el fin de comprenderlos (Thiery y Martin, 1991). Esto es de gran importancia para el uso de biotecnologías como la inseminación artificial (IA), la cual

brinda muchas ventajas como el mejoramiento genético, aprovechamiento de machos de alto valor genético, entre otras (Jaime, 2004). El éxito en la utilización de esta herramienta depende, entre otras cosas, del momento en el cual se realiza, ya que el momento de inseminación debe ajustarse con relación al momento en el que ocurre la ovulación. La mayor probabilidad de fertilizar se logra cuando la IA se realiza entre 12 y 18 h luego del comienzo del celo (Ax et al., 2000). El proceso ovulatorio se desencadena a partir de un aumento de 20 a 80 veces de los niveles basales de LH, lo que se conoce como pico preovulatorio de LH (Thiery y Martin, 1991).

El pico de LH y por tanto la ovulación se puede desencadenar de forma espontánea o inducida según la especie de la que se trate. En las especies de ovulación espontánea el pico de LH se desencadena a partir de mecanismos endocrinos endógenos (Ungerfeld, 2002). En la oveja, la ovulación ocurre entre 22 y 26 h luego del pico de LH (Cumming et al., 1973) y entre 24 a 30 h después del inicio del estro en la vaca (Peter, Levine, Drost y Bergfelt, 2009; Senger, 2003). La disminución de la progesterona determina que se produzca un aumento de la GnRH. Ante cada pulso de GnRH la hipófisis responde con un pulso de LH y el folículo responde a la LH secretando E2. Los E2 determinan que se produzca rápidamente un nuevo pulso de LH el que inducirá un nuevo incremento de E2. A su vez el estradiol incrementa la sensibilidad de la hipófisis a la GnRH (Reeves, Arimura y Schally, 1971).

El pico de LH determina la ruptura del folículo preovulatorio, la liberación del ovocito y posterior luteinización del mismo (Ungerfeld, 2002). Aun antes de que la ovulación ocurra, la LH induce a que las células de la granulosa se diferencien a células luteales. Además, estimula la producción local de sustancias que debilitan la unión intercelular en la pared folicular. Sustancias como la PGF2 $\alpha$ , prostaglandina E2 (PGE2), los E2 y la relaxina incrementan su concentración en el líquido folicular durante este período. La inhibición experimental de la producción de algunas de estas hormonas impide que se desencadene el proceso ovulatorio (Ungerfeld, 2002), lo cual sugiere que participan en el proceso de debilitamiento de la pared, necesario para que se produzca la ovulación.

En especies de ovulación inducida el pico de LH, y por tanto la ovulación, ocurren en respuesta a estímulos desencadenados por la cópula. En los camélidos (camellos bactrianos, llamas, alpacas) existe una proteína presente en el plasma seminal (PS) de los machos que es la responsable de inducir el pico de LH y la ovulación (Ratto, Huanca y Adams, 2010). El primer estudio que documenta un papel directo del semen sobre el mecanismo ovulatorio fue informado por Chen, Yuen y Pan (1985) donde se observó ovulación después de una deposición de semen en la vagina de camellos bactrianos hembras que no tuvieron contacto físico con el macho. La existencia de un factor inductor de la ovulación (OIF, por sus siglas en inglés) en el PS se confirmó de manera convincente en una serie de estudios con llamas y alpacas en los que el 90% de las hembras ovularon después de la administración de una única dosis intramuscular de PS (Adams, Ratto, Silva y Carrasco, 2016). El descubrimiento de esta molécula presente en el PS de llamas y alpacas denominado, en un primer momento OIF, llevó a un cambio en el concepto de ovulación inducida, ya que esta molécula es la responsable de la ovulación en estas especies (Adams, Ratto, Huanca y Singh, 2005). Estudios recientes, principalmente en llamas y alpacas, caracterizaron las propiedades biológicas y químicas de OIF y finalmente lo identificaron como factor de crecimiento neurológico beta ( $\beta$ NGF, por sus siglas en inglés) (Ratto et al., 2012).

Las implicaciones de los descubrimientos relacionados con  $\beta$ NGF en los tejidos reproductivos se extienden más allá de las especies de camélidos. Los resultados de estudios recientes muestran que la presencia y función de  $\beta$ NGF en el PS se conservan entre las especies consideradas como ovuladores inducidos, así como entre las consideradas como ovuladores espontáneos (Adams et al., 2016). En un estudio proteómico se comparó la composición de proteínas del PS de siete especies de mamíferos y se observó que si bien este factor es la principal proteína en el PS de los camélidos, también está presente en pequeñas cantidades en el PS del toro, el carnero y el caballo (Druart et al., 2013); aunque no está del todo claro el rol que cumple esta proteína en estas especies. En un estudio realizado en vacas, se observó que  $\beta$ NGF purificado no indujo la ovulación (Tanco, Van Steelandt, Ratto y Adams, 2012), pero el tratamiento con PS bovino resultó en ovulaciones más sincrónicas y, además, se observó un efecto luteotrófico (Tribulo, Bogle, Mapletoft, y Adams, 2015). Este efecto se debió a un cambio en el patrón de secreción de la LH, lo que mejoró la vascularización durante el período preovulatorio y etapas tempranas del desarrollo luteal, resultando en un incremento de la secreción de progesterona (Ratto, 2016). La administración intramuscular de  $\beta$ NGF en llamas ha demostrado que su acción es sistémica (Páñez, Huanca, Huanca, Ratto y Adams, 2009). Además, la realización de un curetaje endometrial (con el fin de simular el efecto abrasivo de la cópula, propio de esta especie), previo a la administración intrauterina de PS, facilitó la absorción de  $\beta$ NGF e incrementó el efecto del PS (Ratto, Huanca, Singh y Adams, 2005).

En ovinos la información disponible sobre posibles efectos de la monta o del PS es muy escasa. Sin embargo, la presencia de carneros durante el período estral puede tener dos efectos; inducir la ovulación antes que en ovejas aisladas de carneros y concentrar las ovulaciones en un alto porcentaje de animales (Lindsay, Cognie, Pelletier y Signoret, 1975). También se ha demostrado que la presencia de los carneros puede influir en la duración del comportamiento estral de las ovejas. El período de receptividad parecería ser más corto en ovejas mantenidas en contacto con carneros que en las que sólo tuvieron contacto intermitente con estos (Fletcher y Lindsay, 1971). En estos experimentos no se estudió la cópula en sí, sino la presencia del macho. Recientemente se ha estudiado el efecto de la cópula sobre variables como la duración del celo, el momento de la ovulación y la secreción de hormonas en el período periovulatorio. Se demostró que el apareamiento realizado frecuentemente (cada 3 h, hasta que la hembra no aceptaba más la monta) durante el período de receptividad sexual reduce la duración de ésta, aumenta la secreción de LH, disminuye la relación LH/E2 y modifica el momento de la ovulación en relación con el final del estro (Bottino, Perez-Clariget, Rodríguez, Ratto y Ungerfeld, 2021). Estos autores sugieren que durante la cópula se producen acciones mecánicas y que, además, podría haber sustancias presentes en el PS del carnero que podrían ser las responsables de los efectos observados.

Se ha demostrado que las acciones biológicas de  $\beta$ NGF están mediadas por la interacción con el receptor de tirosina quinasa A (trkA) el cual es un receptor de alta afinidad para  $\beta$ NGF (Minichiello et al., 1995) y el receptor p75 el cual es de baja afinidad (Sánchez, 2019). El receptor TrkA es una proteína tirosina quinasa que se activa por la unión de la neurotrofina ( $\beta$ NGF) desencadenando diferentes cascadas de señalización (Rodríguez, 2014). Se demostró la presencia de receptores trkA y p75 en folículos de diversas especies como vaca (Carrasco, 2016) y cabra (Naicy et al.,

2016) los cuales se encuentran en las células de la granulosa y de la teca (García et al., 2018). En ovinos, Barboni et al. (2002) demostraron la presencia de receptores trkA en las células del cumulus de ovocitos mediante la técnica de inmunohistoquímica. Frente a la exposición a  $\beta$ NGF estos ovocitos experimentan expansión y maduración lo que sugiere un papel en el mecanismo que controla este proceso. Los experimentos revelaron que el receptor trkA que se encuentra en las células del cumulus es un verdadero receptor transmembrana que transduce la estimulación del  $\beta$ NGF. Si bien no se conoce la acción de  $\beta$ NGF sobre el desarrollo folicular y la ovulación en ovinos, la localización de estos receptores y las acciones anteriormente mencionadas indicarían que puede tener algún rol durante el período preovulatorio en esta especie.

El factor de crecimiento neurológico beta ( $\beta$ NGF) es una neurotrofina presente en el sistema reproductor de muchas especies animales e interviene en importantes funciones como la espermatogénesis, foliculogénesis, maduración de gametos y ovulación. Para la obtención de esta molécula se recolectan eyaculados de llama por vagina artificial, luego el PS se separa por centrifugación de la porción celular del eyaculado y las muestras se almacena congeladas. El PS se carga en una columna de cromatografía para obtener la fracción proteica B de 14 kDa considerada  $\beta$ NGF purificado (Ratto, 2012).

### 3. HIPÓTESIS

La administración intravenosa de un purificado de  $\beta$ NGF induce el desarrollo folicular y la ovulación en ovejas en anestro.

### 4. OBJETIVO

Determinar si la administración de  $\beta$ NGF estimula el desarrollo folicular y la ovulación en ovejas en anestro.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental se realizó en la estación experimental "Wilson Ferreira Aldunate", INIA Las Brujas, la cual se encuentra ubicada al suroeste del departamento de Canelones, en el paraje denominado Rincón del Colorado (latitud: S 34° 40 m 19s). El mismo se realizó fuera de la estación reproductiva de los ovinos en el mes de octubre. El protocolo fue aprobado por la Comisión de Experimentación Animal de INIA.

### 5.1. Obtención del $\beta$ NGF

El purificado de  $\beta$ NGF fue obtenido en el Instituto de Ciencia Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile. El mismo se obtuvo a partir de semen colectado de llamas mediante la utilización de vagina artificial, y posterior centrifugado para separar el PS. Luego, este fue congelado hasta su procesamiento. El PS fue descongelado y cargado sobre una columna de cromatografía para obtener la fracción proteica B de 14 kDa considerada  $\beta$ NGF purificado. Su efectividad fue validada por bioensayo en llamas, como lo describe Ratto (2012).

### 5.2. Animales y su manejo

Se utilizaron 24 ovejas (10 borregas y 14 ovejas de cría), de una cruce que tenía como base las razas Milchschaf y Finnish Landrace ( $50,7 \pm 2,5$  kg y condición corporal de  $3,3 \pm 0,5$ ; media  $\pm$  DE). A las mismas se les realizó una evaluación clínica y ginecológica la cual constó de evaluar condición corporal, mucosas, revisión de dientes, aparato locomotor y conformación vulvar para darlas como aptas para ser incluidas en el experimento. En cuanto al manejo sanitario se les había administrado recientemente vacunas clostridiales y antiparasitario interno. Estos ovinos permanecían en un potrero en base a gramíneas naturales, con aguadas artificiales.

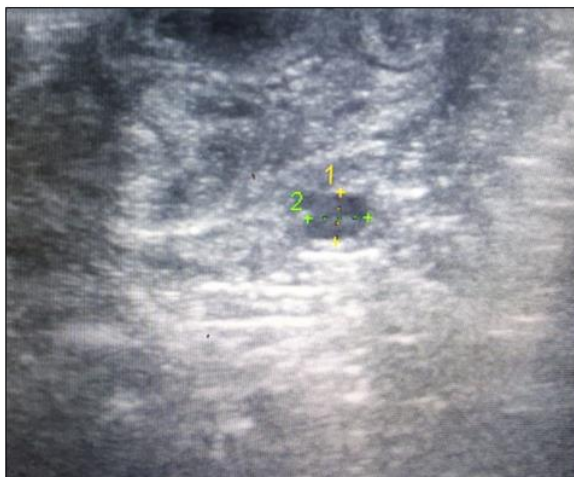
### 5.3. Tratamiento

Siete días antes de aplicar los tratamientos se insertaron dispositivos intravaginales impregnados con progesterona (CIDR Ovis 0,35 g, Zoetis, Porto Salvo, Portugal) con el fin de simular una fase lútea. Al momento del retiro de los dispositivos los animales fueron divididos en tres grupos homogéneos según el peso, la raza y la edad. Las ovejas del primer grupo no recibieron ningún tratamiento (grupo Control) (n=8, 3 borregas y 5 ovejas), a las del segundo grupo se les administró un análogo de la GnRH (gonadorelina acetato, 50  $\mu$ g/animal IV, control positivo, Syntex, Buenos Aires y Argentina) (grupo GEN) (n=7, 3 borregas y 4 ovejas), y las del tercer grupo recibieron una dosis del purificado de  $\beta$ NGF (1 mg/animal, IV) (grupo BET) (n=9, 4 borregas y 5 ovejas).

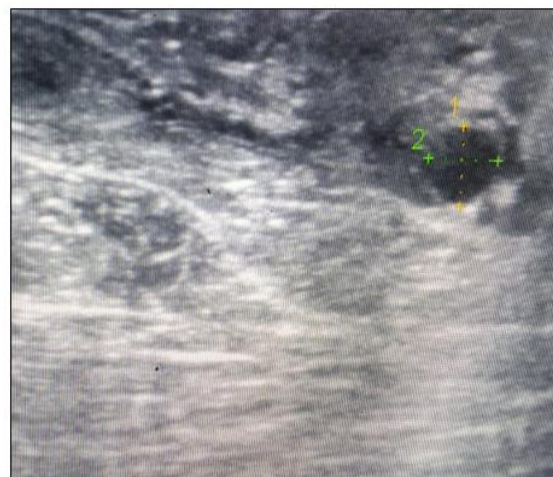
### 5.4. Examen ecográfico de los ovarios

Se realizaron ultrasonografías ováricas seriadas por vía transrectal, utilizando un transductor de matriz lineal de 7,5 MHz acoplado a un monitor (United Imaging IUStar160 vet model, Beijing, China) al momento de retirar los dispositivos intravaginales, al aplicar los tratamientos y luego cada 12 h hasta detectar la ovulación u 84 h posteriores al tratamiento. Esto se llevó a cabo con el animal en pie, introduciendo la sonda previamente lubricada con un gel en base a carboximetilcelulosa en el recto. Una vez localizados los ovarios a ambos lados del útero, se registró el tamaño de los folículos mayores a 3 mm tomando dos medidas del diámetro folicular y calculando un promedio entre ellas. Posteriormente estos folículos fueron medidos en cada control ecográfico para determinar su desarrollo y su ovulación o regresión. Se consideró a los folículos que superaron los 4 mm como preovulatorios y que hubo ovulación cuando ocurrió la desaparición de uno de estos en el siguiente control ecográfico. A los 8 días de detectada la ovulación se realizó una ecografía para evaluar el CL formado, donde se evaluó el tamaño de los mismos.

Figura 1. Imágenes obtenidas durante el control ecográfico ovárico. Se visualizan folículos preovulatorios. Se muestran los diámetros foliculares (diámetro 1 y diámetro 2) de los cuales se calculó un promedio para obtener la medida final



Folículo preovulaorio  
Diámetro 1: 0,53 cm, diámetro 2: 0,62 cm  
Promedio: 0,57 cm



Folículo preovulaorio  
Diámetro 1: 0,78 cm, diámetro 2: 0,72 cm  
Promedio: 0,75 cm

## 5.5. Análisis estadístico

Las variables que se midieron en el experimento fueron la cantidad de ovejas que ovularon en cada grupo, el tamaño del primer y segundo folículo mayor hasta la ovulación, el folículo mayor hasta 48 h luego del tratamiento, y el número de folículos grandes y medianos por día. Para cada una de ellas se determinó la distribución normal por la prueba de Shapiro-Wilk, y luego se compararon los datos con modelos mixtos. El modelo incluye el tratamiento, el tiempo y su interacción como efectos fijos. La frecuencia de ovejas que ovularon se comparó mediante el test de



probabilidad exacta de Fisher. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando  $p \leq 0,05$ , y tendencias cuando  $0,05 < p \leq 0,1$ .

## 6. RESULTADOS

La cantidad de ovulaciones en cada grupo, el tamaño del primer y segundo folículo mayor hasta la ovulación, el folículo mayor hasta 48 h luego del tratamiento, y el número de folículos grandes y medianos por día, se presentan en la Tabla 1. Las ovulaciones fueron de un solo folículo y ocurrieron únicamente en el grupo BET, donde 8 de 9 ovejas ovularon. No hubo diferencias significativas entre el tamaño del primer folículo mayor hasta el momento de la ovulación entre los grupos, pero el tamaño del segundo folículo mayor fue menor en el grupo GEN respecto a los demás grupos. El número de folículos grandes observados por día fue mayor en el grupo BET, en cambio la cantidad de folículos medianos observados por día fue mayor en el grupo GEN que en el grupo control y BET ( $1,3 \pm 0,1$ ,  $1,05 \pm 0,1$  y  $0,92 \pm 0,1$  mm, media  $\pm$  EEM;  $p=0,05$ , respectivamente). En cinco ovejas del grupo BET se observó la presencia de CLs pequeños (siendo 3 de ellas ovejas de cría y 2 borregas) mientras que en las restantes no se observó (1 oveja de cría y 2 borregas).

Tabla 1. Medias de mínimos cuadrados, EMM pooleado y valor P de ovulaciones y tamaños foliculares registrados mediante controles ecográficos realizados cada 12 h, luego de aplicar los tratamientos (Control, GEN y BET).

	Control	GEN	BET	EEM	P
Diámetro del folículo mayor hasta la ovulación (mm)	3,8	3,6	3,7	0,02	ns
Diámetro del segundo folículo hasta la ovulación (mm)	3,4 <sup>a</sup>	1,5 <sup>b</sup>	3,3 <sup>a</sup>	0,01	0,001
Diámetro del folículo mayor hasta 48 h post tratamiento (mm)	4,2 <sup>a</sup>	3,4 <sup>b</sup>	4,1 <sup>a</sup>	0,02	0,007
Cantidad de folículos mayores a 4 mm/día	0,87 <sup>a</sup>	0,47 <sup>b</sup>	1,14 <sup>c</sup>		0,001
Cantidad de folículos medianos (2-4 mm)/día	1,05 <sup>a</sup>	1,3 <sup>b</sup>	0,92 <sup>a</sup>	0,1	0,05
Ovejas que ovularon	0/8	0/7	8/9	-	0,001

Distintas letras en la misma fila:  $P < 0,05$

## 7. DISCUSIÓN

En este trabajo se observó que la administración intravenosa de un purificado de  $\beta$ NGF, extraído del plasma seminal de llama, indujo la ovulación en 8 de 9 ovejas en anestro estacional. No se conoce exactamente cuál es el mecanismo de acción del  $\beta$ NGF en la oveja, pero para inducir la ovulación se presume que debió actuar a nivel del eje hipotálamo-hipofisario y así desencadenar el pico preovulatorio de LH. En la llama (ovuladores inducidos)  $\beta$ NGF es responsable de inducir el pico de LH y la ovulación luego de la cópula (Ratto et al., 2010). Algunos autores plantean la acción directa de esta proteína sobre las células secretoras de GnRH (Silva et al., 2011). Sin embargo, las neuronas secretoras de GnRH tienen escasos receptores para  $\beta$ NGF (Carrasco, Singh, Ratto y Adams, 2021). Por lo tanto, en llamas, se ha propuesto que la secreción de GnRH por parte de estas neuronas está modulada por la acción de neuropéptidos (kisspeptina y neuroquinina B), secretados por interneuronas que presentan receptores para  $\beta$ NGF (Carrasco, 2016). En la llama, los receptores de  $\beta$ NGF (TrkA y p75) se observaron en el tabique medial y banda diagonal de Broca, y en poblaciones de células en el hipotálamo periventricular y dorsal (Carrasco et al., 2021). En llamas las neuronas secretoras GnRH están presentes principalmente en la eminencia media y en el hipotálamo medio-basal (Caldani, Batailler, Thiery y Dubois, 1988; Lehman, Robinson, Karsh y Silverman, 1986), al igual que en las ovejas donde la mayoría de las neuronas secretoras de GnRH se encuentran en el hipotálamo medio-basal (Carrasco, 2016). En ovuladores espontáneos como los ovinos la liberación de GnRH está regulada por la secreción ovárica de E2 que son producidos por las células de la granulosa del folículo. El aumento de la concentración sanguínea de los E2 es responsable de desencadenar el pico preovulatorio de LH mediante una retroalimentación positiva sobre la secreción de GnRH y un aumento en la sensibilización de las células gonadotropas a la acción de esta hormona (Rodríguez, 2000). En esta especie, las neuronas GnRH carecen de receptores para E2, por lo que la liberación de GnRH no ocurre por la acción directa de estos, sino que otros grupos neuronales sensibles a los E2 intermedian su acción (Smith et al., 2005). Al igual que en llamas, estas neuronas secretan kisspeptina y otros péptidos que regulan la secreción de GnRH en respuesta al aumento preovulatorio de la concentración sanguínea de E2 (Casey et al., 2012). En ovinos no se ha demostrado la presencia de receptores para  $\beta$ NGF en estas interneuronas. Sin embargo, la acción de  $\beta$ NGF sobre ellas podría explicar los efectos observados en el presente trabajo. Para confirmar esto, más estudios deberían ser realizados ya sea midiendo la cantidad de LH secretada luego del tratamiento con  $\beta$ NGF o demostrando la presencia de receptores para  $\beta$ NGF en las interneuronas que modulan el pico de GnRH y LH en ovejas.

En el presente trabajo se observó al día 8 del tratamiento con  $\beta$ NGF, la presencia de CLs pequeños en 5 de 8 ovejas que ovularon (de las cuales 3 eran ovejas de cría y 2 borregas), mientras que en las restantes ovejas que ovularon no se logró identificar CLs (3 de 8 ovejas). Lo observado podría deberse a un fenómeno definido como "cuerpo lúteo de vida corta" (Hernández et al., 2010), similar a los descritos en ovinos luego de la primera ovulación (pubertad), en el postparto (Hernández, Valencia y Zarco, 1997), luego de estimular a las ovejas con carneros para inducir la ovulación (efecto macho) (Rodríguez et al., 2013), en el período de transición del anestro estacional a la ciclicidad (Christensen, Haresign y Khalid, 2014) y en las ovulaciones inducidas durante el anestro con hCG y GnRH (Hernández et al., 1997). Estos CL regresan entre el día 4 y 5 después de la ovulación (Hernández et al., 1997), son

pequeños (< 5 mm), pobremente irrigados, con poca o ninguna protuberancia en la superficie del ovario y están asociados a concentraciones bajas de progesterona circulante (Oliveira et al., 2009). Por un lado, considerando el día en el que se realizó la ecografía para la evaluación de CL (8 días luego de la ovulación), es probable que se hayan evaluado CL que sufrieron una luteolisis temprana. Sin embargo, el nivel de progesterona circulante en sangre no fue determinado en el presente trabajo, por lo que, no se puede afirmar que se trate este fenómeno. Si las concentraciones hubieran sido bajas, se reforzaría la teoría de que lo que ocurrió con estos CLs fue una regresión temprana. Estos CLs de vida media corta podrían estar asociados, por un lado, al momento en que fue realizado el experimento (anestro estacional). Durante la transición del anestro a la ciclicidad en la oveja, la ovulación y la luteogénesis ocurren debido a un soporte gonadotrófico inadecuado (Chemineau, Pellicer-Rubio, Lassoued, Khald y Monniaux, 2006). La cantidad de progesterona secretada por los CLs formados bajo estas circunstancias es incapaz de inhibir la secreción de la PGF2 $\alpha$  uterina lo que desencadena la regresión prematura del CL (Hernández et al., 2010). Otro factor a tener en cuenta es que en el trabajo experimental se formaron grupos homogéneos partiendo de ovejas de diferentes categorías (borregas y ovejas de cría). Fernández (2000) plantea que la regresión prematura del CL ocurre en un alto porcentaje de borregas luego de la primera ovulación, pudiendo ser por esta razón que se observaron CLs más pequeños ya que la mitad del grupo BET estaba conformado por ovejas de esta categoría.

Otro efecto observado en el presente trabajo fue que el tratamiento con  $\beta$ NGF aumentó la cantidad de folículos grandes observados por día. En vacas tratadas con  $\beta$ NGF, el tratamiento no indujo la ovulación, pero aumentó el nivel de FSH circulante. El tratamiento con  $\beta$ NGF se asoció con la supresión del crecimiento del folículo dominante existente y regresión tardía de los folículos subordinados, los que continuaron creciendo (Tanco et al., 2012), pudiendo esto ser la explicación para la mayor cantidad de folículos grandes observados en el presente trabajo. Por otro lado, muchos autores plantean la acción de  $\beta$ NGF a nivel de los folículos. Mediante un experimento en ratones, Tessarollo (1998) sugiere que  $\beta$ NGF, se une a sus receptores y promueve el crecimiento, el mantenimiento, la proliferación y la diferenciación de las células de la teca y la granulosa de los folículos preantrales y antrales, de manera independiente a la acción de las gonadotropinas. Además, Barboni et al. (2002) describieron la presencia de receptores Trka en folículos ovinos. Lo anteriormente dicho sugiere que  $\beta$ NGF podría tener una acción directa en folículos en desarrollo, lo cual también podría explicar los resultados obtenidos.

## 8. CONCLUSIÓN

La administración intravenosa de un purificado de  $\beta$ NGF extraído del plasma seminal de llama estimuló el crecimiento de los folículos e indujo la ovulación en ovejas en anestro estacional, aunque no se pudo comprobar su efecto luteogénico en el presente trabajo.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, G.P., Ratto, M.H., Huanca, W. y Singh, J. (2005). Ovulation-Inducing Factor in the Seminal Plasma of Alpacas and Llamas. *Biology of reproduction*, 73, 452-457.
- Adams, G.P., Ratto, M.H., Silva, M.E., y Carrasco, R.A. (2016). Ovulation-Inducing factor (OIF-NGF) in seminal plasma: a review and update. *Reproduction in domestic animals*, 51 (2), 4-17.
- Atuesta, J., Gonella, A. (2011). Control hormonal del ciclo estral en bovinos y ovinos. *Revista Spei Domus*, 7 (14): 15-25.
- Ax, R.L., Dally, B.A., Didion, B.A., Lenz, R.W., Love, C.C., Varner, D.D., ... Bellin, M.E. (2000). Inseminación artificial. En E.S.E. Hafez, y B. Hafez (Eds.). *Reproducción e inseminación artificial en animales* (pp. 387-400). México: McGraw-Hill.
- Barboni, B., Mattioli, M., Gioia, L., Turriani, M., Capacchietti, G., Berardinelli, P., y Bernabò, N. (2002). Preovulatory rise of NGF in ovine follicular fluid: Possible involvement in the control of oocyte maturation. *Microsc. Res. Tech.*, 59, 516-521.
- Binkley, J. (1988). *The Pineal. Endocrine and neuroendocrine function*. Eaglewood Cliff: Prentice Hall.
- Bottino, J.P., Pérez-Clariget, R., Rodríguez, M.G.K, Ratto, M., Ungerfeld, R. (2021). Multiple matings modify the estrous length, the moment of ovulation, and the estradiol and LH patterns in ewes. *Anim Reprod.*, 18 (3), 1-7.
- Caldani, M., Batailer, M., Thiery, J.C., y Dubois, M.P. (1988). LHRH-immunoreactive structures in the sheep brain. *Histochemistry*, 89, 129-139.
- Carrasco, R. (2016). *Ovulation-inducing factor/nerve growth factor (OIF/NGF): Immunohistochemical studies of the bovine ovary and the llama hypothalamus*. Tesis de Maestría. University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan, Canadá.
- Carrasco, R., Singh, J., Ratto, M. y Adams, G. (2021). Neuroanatomical basis of the nerve growth factor ovulation-induction pathway in llamas. *Biol Reprod*, 104 (3), 578-588.
- Casey, N., Briscoe A.M., Shay, D., Valent, M., Goodman, R.L. y Hileman, S.M. (2012). Evidence of a role for kisspeptin and neurokinin B in puberty of female sheep. *Endocrinology* 153, 2756-2765.
- Chemineau, P., Pellicer-Rubio, M.T., Lassoued, N., Khaldi, G. y Monniaux, D. (2006). Male-induced short oestrus and ovarian cycles in sheep and goats: a working hypothesis. *Reprod Nut Dev* 46, 417-429.

- Chen, B.X., Yuen, Z.X. y Pan, G.W. (1985). Semen induced ovulation in the Bactrian camel (*Camelus bactrianus*). *J Reprod Fertil* 73, 335-339.
- Christensen, A.C.M., Haresign, W. y Khalid, M. (2014). Progesterone exposure of seasonally anoestrus ewes alters the expression of angiogenic growth factors in preovulatory follicles. *Theriogenology* 81, 358-367.
- Cumming, I.A., Buckmaster, J.M., Blockey, M.A.B., Goding, J.R., Windfield, C.G. y Baxter RW. (1973). Constancy of interval between luteinizing hormone release and ovulation in the ewe. *Biol Reprod* 9, 24-29.
- Druart, X., Rickard, J. P., Mactier, S., Kohnke, P. L., Kershaw-Young, C. M., Bathgate, R., ... de Graaf, S. P. (2013). Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma. *Journal of Proteomics*, 91, 13–22.
- Fernández, A. (2000). Variación estacional de la actividad sexual y ovárica de las principales razas laneras y su implicancia desde el punto de vista productivo. *Lana Noticias*, 12, 12-17.
- Fletcher, I.C. y Lindsay, D.R. (1971). Effect of rams on the duration of oestrus behaviour in ewes. *J Reprod Fert* 25, 253-259.
- Garcia-Garcia, R.M., Arias-Alvarez, M., Sanchez-Rodriguez, A., Rebollar, P.G., y Lorenzo, P.L. (2018). NGF system is differentially expressed in the ovary, oviduct and uterus of rabbit does although independent of serum hormonal levels. *Proceedings of the 22nd Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction, Conferences*. Córdoba: ESDAR.
- Ginther, O.J., Kot, K. y Wiltbank, M.C. (1995). Association between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. *Theriogenology*, 43, 689-703.
- Ginther, O.J., Kastelic, J.P. y Knopf, L. (1989). Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Animal Reproduction Science* 20, 187-200.
- Hernandez, J., Valencia, J. y Zarco, L. (1997). Regresión prematura del cuerpo lúteo en la oveja. *Agrociencia*, 31 (4).
- Hernández, O., Montaldo, H., Angulo-Mejorada, R., Balcázar, J.A., Martínez I.Y., Hernández, J. (2010). Regresión prematura del cuerpo lúteo en ovejas en anestro tratadas con la hormona bovina del crecimiento. *Veterinaria México*, 41 (2), 81-87.
- Jaime, D. (2004). *Inseminación artificial en vacunos*. Recuperado de: <http://www.inia.org.uy/prado/2004/inseminacionartificial.htm>

- Karsch, F.J (1980). Twenty-fifth annual bowditch lecture. Seasonal reproduction: A sage of reversible fertility. *Physiologist* 23, 29-38.
- Keefe, D.L. y Turek, F.W. (1985). Circadian time keeping processes in mammalian reproduction. *Oxford Reviews of Reproductive Biology* 7, 346-400.
- Lehman, M.N., Robinson, J.E., Karsh, F.J. y Silverman, A.J. (1986). Immunocytochemical localization of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) pathways in the sheep brain during anestrus and the mid-luteal phase of the estrous cycle. *Journal of Comparative Neurology* 244, 19-35.
- Leyva-Ocariz, H. (2014). La glándula pineal, la melatonina, el fotoperiodo y la sexualidad animal. *Medicina Veterinaria al Dia* 5, 3-5.
- Lindsay, D.R., Cognie, Y., Pelletier, J. y Signoret, J.P. (1975). Influence of presence of rams on the timing of ovulation and discharge of LH in ewes. *Physiol Behav* 15, 423-426.
- Minichiello, L., Piehl, F., Vazquez, E., Schimmang, T., Hokfelt, T., Represa, J. y Klein R. (1995). Diferencial efectos de las mutaciones combinadas del receptor trk sobre el ganglio de la raíz dorsal y las neuronas sensoriales del oído interno. *Desarrollo* 121, 4067-4075.
- Naicy, T., Venkatachalapathy, R.T., Aravindakshan, T.V., Radhika, G., Raghavan, K.C., Mini, M. y Shyama, K. (2016). Nerve Growth Factor gene ovarian expression, polymorphism identification, and association with litter size in goats. *Theriogenology* 86 (9), 2172- 2178.
- Oliveira, M., Fonseca, J., Pieroni, J., Ferreira, R., Cordeiro, M., Souza, S., ... Vicente, W. (2009). Occurrence of subnormal corpus luteum in superovulated Santa Inês sheep using protocols with or without LH administrated at the end of the FSH treatment. *Animal Biology of Reproduction*, 6, 231-231.
- Páñez, S., Huanca, W., Huanca, T., Ratto, M., y Adams, G. (2009). Efecto del sitio de deposición del plasma seminal sobre la tasa de ovulación y formación del cuerpo lúteo en alpacas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 20 (1), 21-27.
- Peter, A.T., Levine, H., Drost, M., y Bergfelt, D.R. (2009). Compilation of classical and contemporary terminology used to describe morphological aspects of ovarian dynamics in cattle. *Theriogenology*, 71 (9), 1343-57.
- Pijoan, P.J., García, A. y de Lucas J. (1987). Determinación de la pubertad en corderos y corderas Suffolk nacidos en dos épocas, bajo condiciones del altiplano mexicano. *Tec Pec Méx*, 25, 302-308.
- Ratto, M. H., Huanca, W., Singh, J., y Adams, G. P. (2005). Local versus systemic effect of ovulation-inducing factor in seminal plasma of alpacas. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3, 29.



- Ratto, M.H., Huanca, W., y Adams, G.P. (2010). Ovulation-inducing factor: A protein component of llama seminal plasma. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8, 44.
- Ratto, M. H., Leduc, Y. A., Valderrama, X. P., van Straaten, K. E., Delbaere, L. T. J., Pierson, R. A., y Adams, G. P. (2012). The nerve of ovulation-inducing factor in semen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 15042-15047.
- Ratto, M.H. (2016). Luteotrophic effect of OIF/NGF in llamas. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 24 (2), 101-106.
- Reeves, J.J., Arimura, A. y Schally, A.V. (1971). Changes in pituitary responsiveness to luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) in anestrus ewes pretreated with estradiol benzoate. *Biol Reprod* 4, 88-92.
- Rodríguez, A. (2014). *Identificación y caracterización de desubiquitininas que modulan el receptor de neurotrofinas TrkA*. (Tesis de doctorado). Instituto de Neurociencia de Castilla y León, Salamanca España.
- Rodríguez, N. (2000). Regulación de la expresión y liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH): Los glucocorticoides como inhibidores de la reproducción. Revisión. *Rev Col Cienc Pec* 13 (2), 136-142.
- Rodríguez, R.M., Ciccio, N.H., Ferrería, J., Pevsner, D.A., Rosas, C.A., Rodríguez, M.M. y Pedrueza, J.R. (2013). Short-lived corpora lutea syndrome in anoestrous ewes following 17 $\beta$ -oestradiol or MAP treatments applied before an allogenic sexual stimulation with rams and oestrous ewes. *Anim Reprod Sci*, 136, 268-279.
- Sánchez, A. (2019). *Caracterización y producción de  $\beta$ -NGF y su papel en la fisiología reproductiva del conejo*. (Tesis de doctorado). Universidad Complutense de Madrid, España.
- Secretariado Uruguayo de la Lana. (2020)
- Senger, P.L. (2003). *Pathways to pregnancy and parturition*. (2da ed.) Pullman: Current Conceptions.
- Sharkey, S., Callan R.J., Mortimer, R. y Kimberling C. (2001). Reproductive techniques in sheep. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 17, 435-455.
- Silva, M.E., Smulders, J.P., Guerra, M., Valderrama, X.P., Letelier, C., Adams, G.P. y Ratto, M.H. (2011). Cetorelix suprime el pico preovulatorio de LH y la ovulación inducida por el factor inductor de la ovulación (OIF) presente en el plasma seminal de llama. *Biología Reproductiva y Endocrinología* 9, 74.
- Smith, J.T., Cunningham, M.J., Rissman, E.F., Clifton, D.K., Steiner, R.A. (2005). Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology*, 146, 3686-3692.

- Tanco, V. M., Van Steelandt, M.D., Ratto, M.H., y Adams, G.P. (2012). Effect of purified llama ovulation-inducing factor (OIF) on ovarian function in cattle. *Theriogenology*, 78, 1030-1039.
- Tessarollo, L. (1998). Pleiotropic functions of neurotrophins in development. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 9 (2), 125-138.
- Thiery, J.C. y Martin, J.B. (1991). Neurophysiological control of the secretion of gonadotropin-releasing hormone and luteinizing hormone in the sheep - a review. *Reprod Fertil Develop*, 3, 137-173.
- Tribulo, P., Bogle, O., Mapletoft, R. J., y Adams, G.P. (2015). Bioactivity of ovulation inducing factor/nerve growth factor (OIF/NGF) in bovine seminal plasma and its effects on ovarian function in cattle. *Theriogenology*, 83, 1394-1401.
- Turek, F.W. y Van Cauter, E. (1988). *Physiology of reproduction*. En E. Knobil, J.D. Neill, (Eds), Rhythms in Reproduction. New York: Raven.
- Ungerfeld, R. (2002). *Reproducción en los animales domésticos*. (V.1) Montevideo: Ed. Melibea.
- Ungerfeld, R. y Rubianes, E. (2001). Corderos tempranos: Estrategia reproductiva que genera nuevas alternativas productivas. *Revista del Plan Agropecuario* 98, 19-22.
- Uribe, L.F., Correa, A. y Osorio, J.H. (2009). Características del crecimiento folicular ovárico durante el ciclo estral en ovejas. *Biosalud*, 8, 117-131.