



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**EFECTO DE LA eCG ADMINISTRADA LUEGO DE LA
INSEMINACIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD OVARICA, LA TASA
DE PREÑEZ Y LAS PÉRDIDAS EMBRIONARIAS Y FETALES
EN OVINOS**

Camila García Pintos

TESIS DE MAESTRÍA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL

URUGUAY

2017



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

EFECTO DE LA eCG ADMINISTRADA LUEGO DE LA INSEMINACIÓN
SOBRE LA ACTIVIDAD OVARICA, LA TASA DE PREÑEZ Y LAS PÉRDIDAS
EMBRIONARIAS Y FETALES EN OVINOS

Camila García Pintos

Nombre

Director de Tesis

Nombre

Co-director (si corresponde)

2017

ACTA DE DEFENSA DE TESIS

En esta hoja va el Informe del Tribunal

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al grupo del IRAUy por la compañía y la ayuda durante estos años de trabajo. En este grupo conocí gente muy valiosa desde el punto de vista académico y humano.

Dentro de este equipo el principal agradecimiento va dirigido a mi tutor y amigo, Alejo Menchaca. No sólo por el incondicional apoyo durante todo el proceso de la tesis, sino también por ser una motivación constante a seguir estudiando, actualizándome y especializándome. Desde hace ya 10 años venimos trabajando juntos, y siempre encuentra la forma de recordarme que el estudio sumado al esfuerzo es lo que nos permite diferenciarnos y crecer. Le agradezco por ayudarme a convertirme en una mejor profesional.

Sumado al apoyo académico de mi tutor, tengo la suerte de tener una estimulación personal al estudio, mi hermano. Él es el ejemplo que seguir aprendiendo no es más trabajo, sólo es esfuerzo para superarnos, ya que como decía mi abuelo: "el conocimiento no ocupa lugar". Le agradezco por seguir ayudándome con la carrera sin importar donde este.

Finalmente le agradezco a mi familia, especialmente a Nacho, por estar siempre apoyándome en todos los proyectos de la vida.

ÍNDICE

RESUMEN.....	V
SUMMARY	VI
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Fisiología de la gestación temprana y pérdidas embrionarias	1
1.2 Período crítico de gestación.....	3
1.3 Soporte luteal exógeno	4
1.1 Gonadotropina coriónica equina.....	7
2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.....	8
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS	9
4. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN.....	10
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
5.1 Experimento 1.....	11
5.2 Experimento 2.....	13
5.3 Experimento 3.....	13
5.4 Experimento 4.....	14
5.5 Variables durante la gestación	14
5.6 Análisis estadístico.....	14
6. RESULTADOS	16
6.1 Experimento 1.....	16
6.1.1 Concentraciones séricas de progesterona y área luteal.....	16
6.1.2 Dinámica folicular.....	17
6.2 Experimento 2.....	21
6.3 Experimento 3.....	21

6.4 Experimento 4.....	22
7. DISCUSIÓN.....	24
8. CONCLUSIONES	29
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
10. ANEXOS.....	VII

Publicaciones:

La información generada en los experimentos de esta tesis fue publicada en dos artículos científicos:

García-Pintos C., Menchaca A. Luteal response and follicular dynamics induced with equine chorionic gonadotropin (eCG) administration after insemination in sheep. *Small Ruminant Research* 2016; 136: 202–207.

García-Pintos C., Menchaca A. Pregnancy establishment and maintenance after the administration of equine chorionic gonadotropin (eCG) associated or not with gonadotropin-releasing hormone (GnRH) after insemination in sheep. *Animal Production Science* 2017 (in press).

RESUMEN

El objetivo fue evaluar el efecto de la eCG administrada luego de la ovulación y previo al período crítico de la gestación sobre la actividad ovárica, el establecimiento de la gestación y las pérdidas embrionarias y fetales en ovinos. Se realizaron cuatro experimentos en ovejas multíparas en las que se sincronizó el ciclo estral mediante un Tratamiento Corto con progestágenos durante 6 días asociado a una dosis de prostaglandina $F_2\alpha$ y eCG al finalizar el tratamiento para su posterior inseminación artificial a tiempo fijo 48 horas más tarde (Día 0). En el Experimento 1 y 2 los animales fueron asignados a tres grupos experimentales para recibir 400 UI de eCG al Día 5 o 10 luego de la inseminación, o no recibir eCG luego de la inseminación (Grupo Control). En el Experimento 1 se realizó el monitoreo diario durante los primeros 30 días de gestación -o hasta el siguiente estro en las ovejas no preñadas- de las estructuras ováricas de 27 ovejas Corriedale mediante ultrasonografía transrectal con el fin de determinar el efecto del tratamiento sobre la dinámica folicular y el tamaño del CL. Durante el mismo período y con la misma frecuencia se determinaron las concentraciones séricas de progesterona por radioinmunoanálisis. En el Experimento 2 se evaluó el efecto de la eCG sobre la tasa de preñez y las pérdidas embrionarias/fetales en un total de 408 ovejas Corriedale. En el Experimento 3, 587 ovejas multíparas Merino fueron asignadas a cuatro grupos experimentales en un arreglo 2 x 2 factorial para recibir o no una dosis de 400 UI de eCG al Día 5, asociada o no a 100 μ g de un análogo de GnRH al Día 6 (30 horas más tarde). En el Experimento 4, 715 ovejas Merino y Corriedale fueron asignadas a cuatro grupos experimentales en un arreglo 2 x 2 factorial, para recibir o no una dosis de 400 UI eCG al Día 10, asociada o no con 100 μ g de un análogo de GnRH al Día 11 (30 horas más tarde). La tasa de preñez y la carga fetal se determinaron en los últimos tres experimentos mediante ultrasonografía transrectal realizada al Día 30 de la inseminación, y las pérdidas de gestación se determinaron por ultrasonografía transabdominal al Día 70. Los resultados mostraron que la administración de 400 UI de eCG al Día 10 aumenta el tamaño luteal y las concentraciones séricas de progesterona. La administración de eCG al Día 10 en el Experimento 3 mejoró la tasa de preñez al Día 30 pero dicha mejora no logró mantener la mejoría hasta el Día 70 de gestación. El tratamiento con eCG al Día 5 no tuvo efecto sobre el tamaño, ni la función luteal, ni sobre la tasa de preñez. Ambos tratamientos afectan la dinámica folicular, el tratamiento al Día 5 promueve el desarrollo del folículo dominante de la onda que emerge luego del tratamiento, y al Día 10 del folículo que se encuentra en fase de crecimiento al momento del tratamiento. La administración de GnRH al Día 6 u 11, precedida o no por una dosis de eCG, no afectó la tasa de preñez ni la carga fetal. En conclusión, la eCG administrada 10 días luego de la inseminación aumenta el tamaño del cuerpo lúteo y las concentraciones de progesterona. Esto parece reflejarse en un mejor establecimiento de la preñez durante el primer mes, efecto que no se mantiene durante el segundo mes de gestación.

SUMMARY

The objective was to evaluate the effect of eCG in sheep administered between the insemination and the critical period of gestation, over the ovarian activity, the maintenance of pregnancy and over embryonic and fetal losses. Four experiments were carried out on multiparous ewes. In all of them the estrous cycle was synchronized by a short treatment with an intravaginal device with progesterone for 6 days associated with an im dose of prostaglandin $F_{2\alpha}$ and eCG at device removal, following by intrauterine artificial insemination at fixed time (Day 0). In Experiment 1 and 2 the animals were divided into three experimental groups, to receive 400 IU of eCG on Day 5 or 10 after insemination, or to receive no eCG after insemination (Control Group). In Experiment 1, in order to evaluate follicular dynamics and corpus luteum development, the ovarian structures of 27 Corriedale ewes were daily examined by transrectal ultrasonography during the first 30 days of gestation or until next estrus in non pregnant ewes. Daily serum progesterone concentrations were also analyzed by radioimmunoassay. In Experiment 2, the effect of eCG on pregnancy rate and embryonic and fetal losses was evaluated over a total of 408 Corriedale ewes. In Experiment 3, 587 Merino ewes were randomly assigned to four experimental groups in a 2 x 2 factorial arrangement, to receive or not 400 IU of eCG on Day 5, associated or not with 100 μ g of a GnRH analogue on Day 6 (i.e. 30 hours later). In Experiment 4, 715 Merino and Corriedale ewes were randomly assigned to four experimental groups in a 2 x 2 factorial arrangement, to receive or not a dose of 400 IU of eCG on Day 10, associated or not with 100 μ g of a GnRH analogue on Day 11 (i.e. 30 hours later). In the last three experiments, pregnancy diagnosis was determined on Day 30 and Day 70 by transrectal ultrasonography. The results show that the administration of 400 IU of eCG 10 days after insemination increases luteal size, improving its function and thus increasing serum progesterone levels. The administration of eCG on Day 10 in Experiment 3 enhanced pregnancy rate on Day 30, although this improvement was not maintained on Day 70, which showed greater pregnancy failure. On the other hand, treatment with eCG on Day 5 had no effect on the pregnancy rate. Follicular dynamics were influenced by both eCG treatments on Day 5 and Day 10, promoting the growth of the largest follicle present during treatment or increasing the length of the wave that emerged after treatment. Administration of GnRH on Day 6 or Day 11, preceded or not by a dose of eCG, did not had any effect over the analyzed variables. In conclusion, the luteal improvement and the greater progesterone profiles obtained with the administration of eCG on Day 10 seems to have a marginal positive effect on pregnancy establishment during the first month, which is not maintained during the second month of gestation.

1. INTRODUCCIÓN

El promedio de la tasa de señalada en Uruguay en ovinos en las últimas décadas es aproximadamente 73% (Salgado, 2013). Si bien esto se debe principalmente a pérdidas que ocurren durante la época de parición con importantes pérdidas neonatales (Salgado, 2013), las pérdidas durante la gestación también deberían ser consideradas. En los últimos años se han realizado esfuerzos importantes por desarrollar y transferir al sector productivo nuevas herramientas para mejorar la tasa de preñez con técnicas de reproducción asistida como la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF; Menchaca y Rubianes, 2004). Sin embargo, una limitante casi ignorada es el alto porcentaje de pérdidas durante la preñez temprana (Quinlivan, 1966 en ovinos, Warnick y Hansen, 2010 en bovinos). Está demostrado que la tasa de fecundación es cercana al 90% luego de una inseminación en ovinos (Quinlivan, 1966) y también en bovinos (Sartori et al. 2010; Diskin et al. 2011), mientras que en ovinos la tasa de preñez a los 30 días normalmente no supera el 60-70%. En general, en el manejo reproductivo de la majada estas pérdidas quedan compensadas al prolongar la duración del servicio reproductivo a campo, de tal manera que las hembras tienen dos o tres oportunidades para volver a preñarse luego de que las mencionadas pérdidas ocurren, alcanzando finalmente un alto porcentaje de preñez en un servicio de 45-60 días. Sin embargo, esta limitante biológica debería ser abordada con mayor profundidad ya que tiene un impacto directo en la eficiencia reproductiva de varias especies.

1.1 Fisiología de la gestación temprana y pérdidas embrionarias

Las pérdidas de la gestación se clasifican en base al momento en el que ocurren como pérdidas embrionarias tempranas (pérdida entre la concepción y los 25 días), pérdidas embrionarias tardías (entre los 25 días de gestación y el fin del período de diferenciación embrionaria a los 40-45 días de gestación), y pérdidas fetales (desde los 45 días al parto) (Dixon et al. 2007). Algunos estudios estiman que las pérdidas embrionarias y fetales ovinas se aproximan al 30% (Diskin y Morris, 2008). La mayoría de estas pérdidas embrionarias en ovinos ocurren antes del Día 18 (Quinlivan, 1966). Más precisamente se estima que hasta el 40% de dichas pérdidas ocurren entre los 8 y 17 días luego de la concepción. Este hecho sugiere que algunas de estas pérdidas embrionarias podrían ser resultado de una incapacidad en el bloqueo de la secreción uterina de prostaglandina (PG) $F_2\alpha$ por parte del embrión necesaria para evitar la luteólisis (Thatcher et al. 1994). Sobre las pérdidas embrionarias más tardías y las pérdidas fetales, algunos reportes señalan que entre el Día 25 y el parto se pierden aproximadamente un 20% de las gestaciones (Dixon et al. 2007). Otros autores indican que estas pérdidas en ovinos corresponden a un 1,3 o un 5,3% de las preñeces (Quinlivan et al. 1966). Independientemente de la magnitud de dichas pérdidas, todos los autores coinciden en que la mayor incidencia ocurre en la etapa más temprana, previo al reconocimiento materno de la gestación.

La activación genómica embrionaria se da luego que el embrión alcanza el estadio de 8-16 células (Gjorret et al. 2003), hecho que en ovinos ocurre 3 días después de la fertilización. Luego comienza la diferenciación celular y aparece el trofoectodermo constituido por células que llevarán adelante el reconocimiento materno de la

gestación y la placentación (Spencer et al. 2004). Según Fabian et al. (2005) la mayoría de las pérdidas embrionarias se dan a consecuencia de un error en esta etapa, ya que una incorrecta expresión genómica puede afectar la diferenciación y afectar los procesos subsiguientes (reconocimiento materno de la gestación y placentación). En las ovejas hay dos factores previos a la implantación embrionaria de suma importancia para el establecimiento de la gestación: la migración y la elongación del *conceptus* (Spencer et al. 2004). Después que el embrión abandona la zona pelúcida a los 7 u 8 días luego de la fecundación (etapa conocida como eclosión) sufre el proceso conocido como elongación entre el Día 11 y 16. Durante la elongación el blastocisto se alarga en su porción trofoblástica y aumenta de tamaño, aumentando así la porción del útero disponible para que el *conceptus* haga contacto, y así proporcionar un mejor soporte de la preñez (Spencer et al. 2004). Entre el Día 10 y 14 ocurre la elongación del blastocisto, desarrollándose en *conceptus* tubular y luego filamentoso que queda inmovilizado en el lumen uterino (Wintenberger-Torres y Flechon, 1974). Hacia el Día 15-16 del ciclo se ponen en contacto las microvellosidades de la superficie del epitelio endometrial con las suaves membranas plasmáticas de las células que rodean el embrión (Guillomot et al. 1990). Es entonces cuando ocurre el reconocimiento materno del *conceptus*, para evitar la luteólisis y de esta manera dar lugar al establecimiento de la gestación. En rumiantes este reconocimiento se da por medio de la acción de una proteína denominada interferón-tau (IFN- τ). Esta proteína está compuesta por 172 aminoácidos y antes de iniciarse el período de implantación, entre el Día 10 y 21, es sintetizada por las células trofoblásticas del blastocisto (Guillomot et al. 1981; Guillomot et al. 1990; Bazer et al. 1998; Gray et al. 2002). El pico de producción y secreción de IFN- τ por parte del *conceptus* ovino se da entre el Día 12 y 17 (Ott et al. 1995). El IFN- τ bloquea la síntesis de PGF $_2\alpha$ de la mucosa uterina y por consiguiente rescata al cuerpo lúteo (CL) de la luteólisis que ocurriría aproximadamente entre el Día 15-17 en ovinos (Ott et al. 1989). Luego el embrión continúa con la fase de aposición, entre los días 14 a 16 en ovinos, que conlleva a la fijación del mismo en el útero por la interdigitación de las células diferenciadas del trofoectodermo embrionario con las microvellosidades del epitelio endometrial (Guillomot et al. 1981; Spencer et al. 2004). Finalmente se da la adhesión, caracterizada por la fusión de membranas trofoblástica con membranas de las células endometriales (Guillomot et al. 1981) culminando este proceso conocido como implantación embrionaria. El éxito en la interacción entre el *conceptus* y el útero materno no sólo depende del IFN- τ , sino también de diferentes mecanismos hormonales, sustancias y señales químicas que participan en el proceso a nivel local y sistémico (Spencer et al. 2004).

Existen varios factores uterinos que influyen en la supervivencia del *conceptus*: longitud uterina, flujo sanguíneo y el desarrollo de las glándulas uterinas (Vallet et al. 2013). La progesterona es la principal reguladora de los cambios que deben ocurrir en el oviducto y útero para que el embrión se desarrolle y la gestación pueda tener lugar. Esta hormona provee el ambiente uterino apropiado, regulando las secreciones uterinas de las cuales el embrión recibirá los nutrientes y sustancias que estimularán su crecimiento y diferenciación (Garret et al. 1988; Roberts y Bazer, 1988). Asimismo, la progesterona mantiene en óptimas condiciones el microambiente en el cual se desarrollará el embrión, ya que su presencia en el tracto materno tiene acción sobre las secreciones uterinas que mejoran el desarrollo embrionario temprano y por lo tanto favorece la producción de IFN- τ (Mann y

Lamming, 2001). Tanto en ovinos como en bovinos, se ha demostrado que altas concentraciones plasmáticas de progesterona al comienzo de la fase luteal se correlacionan positivamente con la posterior producción de IFN- τ , estimulando así el desarrollo embrionario y aumentando las tasas de sobrevivencia del embrión y el establecimiento de la preñez (Parr et al. 1987; Kerbler et al. 1997; Lonergan 2014). A su vez, en ovinos se ha demostrado que una baja concentración de progesterona previa al reconocimiento materno de la gestación puede conducir a un pobre desarrollo embrionario (Nephew et al. 1991).

Aún existe cierta discusión acerca del mecanismo mediante el cual se inhibe el proceso de luteólisis permitiendo así el reconocimiento materno de la gestación. Según Wiltbank et al. (2016) en la vaca hay tres modelos que están científicamente comprobados, y no necesariamente son excluyentes uno del otro. El primer modelo explica cómo el *conceptus* produce IFN- τ que altera la expresión de los receptores endometriales de estradiol y de oxitocina, de esta forma se produce una inhibición en la secreción uterina de PGF $_2\alpha$ impidiendo así la luteólisis. Otro modelo postula como un aumento en la producción uterina de PGE1 y PGE2 por parte de las células endometriales inhibe la acción de PGF $_2\alpha$ a nivel de las células luteales grandes, y de esta forma se bloquea el desencadenamiento de la luteólisis. Finalmente, el tercer modelo promueve el rol del IFN- τ sistémico que escapa del lumen uterino y actúa directamente sobre el CL.

1.2 Período crítico de gestación

A consecuencia de los mencionados procesos fisiológicos que ocurren durante la gestación temprana en los rumiantes se podría definir como el período crítico de la gestación al período que involucra el reconocimiento materno de la misma (Binelli et al. 2001). Durante este período el animal cambia su estado fisiológico, pasando de un estado cíclico a un estado de gestación, en los cuales el embrión sufre cambios importantes para los cuales necesita un ambiente uterino adecuado que, como ya se mencionó, depende en gran medida de las concentraciones plasmáticas de progesterona (Garrett, 1988; Mann, 2006).

Muchas pérdidas embrionarias que se dan entre la fertilización y el momento del reconocimiento materno de la gestación están relacionadas con alteraciones en la función luteal. Estas alteraciones determinan bajas concentraciones de progesterona durante las etapas iniciales del ciclo estral, lo que conlleva a un retraso en el desarrollo embrionario y a una producción insuficiente de IFN- τ con la subsecuente regresión prematura del CL (Inskeep y Dailey, 2004). No obstante, esta secuencia dicho mecanismo no ocurre siempre de la misma manera. La mortalidad embrionaria puede ocurrir entre el Día 4 y 9 como consecuencia de la regresión prematura del CL por secreción anticipada de PGF $_2\alpha$, o incluso por factores vinculados a la calidad embrionaria que se definen en el ovocito previo a la ovulación (Inskeep y Dailey, 2004).

La unión de la progesterona a sus receptores endometriales impide la unión entre el estradiol y su receptor, bloqueando así la síntesis de receptores de oxitocina y por ende la producción de PGF $_2\alpha$ (Spencer et al. 2004). Normalmente al final de la fase

luteal del ciclo estral, la progesterona va perdiendo actividad debido a una disminución de sus propios receptores uterinos, lo que posteriormente conduce a una mayor pulsatilidad de la hormona luteinizante (LH) hipofisaria que actúa como un estímulo en el crecimiento folicular. La presencia de receptores de estradiol uterinos se ve favorecida al desaparecer la acción de la progesterona (Silvia et al. 1991). En esta etapa, el estradiol producido por el folículo preovulatorio además de ejercer un retroalimentación positiva sobre la LH, estimula en el endometrio la producción de enzimas como la fosfolipasa A y la ciclooxigenasa que son necesarias para la síntesis de $\text{PGF}_2\alpha$ (Silvia et al. 1991). El estradiol también estimula la síntesis de receptores de oxitocina (Beard y Lamming, 1994), siendo éste uno de los principales factores involucrado en el control de la secreción de $\text{PGF}_2\alpha$. La secreción de $\text{PGF}_2\alpha$ depende de la unión de la oxitocina a sus receptores en el endometrio. A partir del Día 13 del ciclo en la oveja aumenta el número de receptores de oxitocina en el endometrio, evento que determina el momento en que se inicia la luteólisis (Silvia et al. 1991). Por otra parte, los estrógenos también regulan la expresión y producción de mucina, glicoproteína presente en la superficie apical del epitelio endometrial que impide el contacto entre el embrión y el endometrio materno evitando la implantación en un momento inadecuado del ciclo (Spencer et al. 2004). Altos niveles de estradiol durante la fase luteal pueden ser nocivos para la vida del embrión (Pritchard et al. 1994; Bridges et al. 2000). En este mismo sentido, Thatcher et al. (1989) señalan que una disminución en la actividad folicular durante la gestación temprana podría favorecer el mantenimiento del CL.

1.3 Soporte luteal exógeno

Considerando toda la información mencionada anteriormente, una estrategia a estudiar con el fin de disminuir la mortalidad embrionaria es estimular la producción de progesterona previa al período crítico de gestación. Si bien la acción de la progesterona depende también de la presencia de su receptor en el órgano blanco, es lógico proponer que en la medida que se aseguren niveles adecuados de esta hormona, el establecimiento de la gestación podría verse favorecido. Esto podría lograrse por ejemplo mediante un tratamiento exógeno con progesterona, pero esta estrategia no ha tenido mucho éxito, ya que al carecer de efecto sobre la actividad luteal no se logra una acción duradera sobre los niveles de progesterona (Ashworth y Bazer, 1989). Otras alternativas que se han propuesto consisten en el abordaje con diferentes hormonas gonadotróficas exógenas. La administración de la gonadotropina coriónica humana (hCG) y de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) luego de la ovulación, mediante el efecto LH o mediante la liberación de LH, respectivamente, inducen la luteinización o la ovulación de folículos grandes. De esta manera es posible generar CLs accesorios o incrementar la luteinización del CL existente (Barrett et al., 2004; Campanile et al., 2007; Wallace, 2011; Bartolome, 2012; Coleson et al. 2015). En ovejas varios autores han experimentando el tratamiento con hCG luego de la ovulación y antes del período crítico de la gestación, y los resultados obtenidos han sido variados (Newphew et al. 1994; Fukui et al. 2001; Khan et al. 2009; Catalano et al. 2015; Coleson et al. 2015; Rostami et al. 2016). En la Tabla 1 se muestran diversos antecedentes en ovejas tratadas con GnRH luego de la inseminación o de la monta natural. Estas estrategias no han sido siempre exitosas para mejorar el establecimiento de la gestación, y una posible causa quizás

sea la corta vida media de estas hormonas (Smith et al. 1993) no permitiendo lograr un soporte luteotrófico sostenido.

Tabla I: Efecto del tratamiento con GnRH de ovejas luego de la inseminación o monta natural, sobre factores vinculados a la supervivencia embrionaria.

Tratamiento	Dosis	Día del ciclo estral	Ovejas por grupo experimental (n)	Raza	Efecto del tratamiento	Autores
Análogo de GnRH (buserelina)	4 µg	Día 12	140	Beulah Speckle Faced/ Suffolk/ Clun Forest/ Texel x Welsh Mountain	Tasa de preñez no varió. Aumentó tasa de mellizos. No afectó peso al nacimiento.	Beck et al. 1994
Análogo de GnRH (buserelina)	4 µg	Día 12	40	Clun Forest	Disminuyó E2 (Día 13-15). Formación CL accesorios.	Beck et al. 1996
Análogo de GnRH (buserelina)	4 µg	Día 12	103	Karayaka Karayaka x Sakiz	Aumentó P4 (Día 13-15). Formación CL accesorios. Aumento peso ovárico. Aumentó LH (1-4 h). Aumentó la tasa de preñez. Peso de la placenta no varió. Aumentó tasa de mellizos.	Akif Cam et al. 2002
hCG	150 UI	Día 12	44	Karayaka Karayaka x Sakiz	Aumentó tasa de nacimiento. Aumentó tasa de mellizos. Formación CL accesorios. Aumentó peso luteal, ovárico y de la placenta. Aumentó peso fetal y de mellizos al nacimiento.	Akif Cam y Kuran, 2004
Análogo de GnRH (buserelina)	4 µg	Día 12	43	Karayaka Karayaka x Sakiz	Aumentó tasa de nacimiento y de mellizos. Formación de CL accesorios. Aumentó peso luteal, ovárico y de la placenta. Aumentó peso de mellizos al nacimiento (no fetal).	Akif Cam y Kuran, 2004
Análogo de GnRH (buserelina)	10 µg	Día 12	12	Awasi	Disminuyó E2 (Día 13-14)	Basiouni, 2006

Tratamiento	Dosis	Día del ciclo estral	Ovejas por grupo experimental (n)	Raza	Efecto del tratamiento	Autores
Análogo de GnRH, (buserelina)	4 µg	Día 12	20	Welsh Halfbred	No afectó P4; aumentó E2. Aumentó peso luteal, Aumentó tamaño de la placenta. Sin efecto sobre peso fetal ni sobre los placentomas.	Khan et al. 2007
hCG	200 UI	Día 12	20	Welsh Halfbred	Aumentó P4 y E2 Aumentó peso luteal. Aumentó tamaño de la placenta. Aumentó peso fetal y número de placentomas.	Khan et al. 2007
Análogo de GnRH (cinnarelin)	12,5 µg	Día 11 o 13	30	Arkhar-Merino x Ghezel/ Arkhar-Merino x Monhani	Aumentó tasa de nacimiento Aumentó tasa de mellizos. Formación CL accesorios. Mejoró sobrevivencia embrionaria.	Olfati y Moghaddam, 2013
eCG	500 UI	Día 10	28	Harri	Formación CL accesorios. Aumentó P4. Aumento la tasa de preñez. Resultados comparados con grupo GnRH.	Allam et al. 2015
Análogo de GnRH, (buserelina)	4 µg	Día 10	30	Harri	Menor P4. Menor tasa de preñez. Resultados comparados con grupo eCG.	Allam et al. 2015
Análogo de GnRH, (buserelina)	4 µg	Día 7	10	Rahzmani Afshari x Booroola-Merino	Formación de CL accesorios. Aumentó P4. No cambió población folicular. No afectó tasa de preñez ni de mellizos. Redujo mortalidad fetal después del Día 40. Aumentó el peso de los mellizos al nacimiento.	Hashem et al. 2015

P4 = progesterona. E2 = estradiol.

En todos los experimentos las ovejas recibieron monta natural (solo se realizó inseminación a celo visto en Olfati y Moghaddam, 2013).

Considerando los resultados variables los indicadores reproductivos de la administración de un análogo de GnRH luego de la inseminación y antes del período crítico de gestación en ovinos sobre sería bueno evaluar el efecto de este tratamiento sobre un número suficiente de animales.

En bovinos se ha demostrado que el uso de una dosis de gonadotropina coriónica equina (eCG) luego de la ovulación y antes del período crítico de la gestación puede mejorar los niveles de progesterona y la tasa de preñez (Núñez-Olivera et al. 2018). Esta estrategia aún no ha sido evaluada en ovinos.

1.1 Gonadotropina coriónica equina

La eCG es una glicoproteína producida por el corion equino entre los 40 a 130 días de gestación (Cole y Hart, 1930; Murphy y Martinuk, 1991). Esta compleja gonadotropina está constituida por dos subunidades denominadas alfa y beta que se encuentran unidas no covalentemente entre sí, la subunidad beta tiene un peso de 44000 Daltons y la alfa de 17000 Daltons (Moore et al. 1980). Al tener una estructura similar a la hormona folículo estimulante (FSH) y a la LH (Pierce y Parsons, 1981) puede ser reconocida por sus receptores y actuar como estas gonadotropinas. Contrariamente a lo que ocurre en otras especies, en la yegua se une sólo a receptores de LH debido a que la subunidad beta, que es la responsable de la actividad hormonal específica, es igual a la subunidad beta de la LH equina, induciendo la formación de CL accesorios y favoreciendo entonces el mantenimiento de la gestación en esta especie. Aproximadamente el 45% de la molécula está conformada por carbohidratos, siendo el ácido siálico el que se presenta en mayor cantidad (Cole y Hart, 1930). Dicho carbohidrato se encuentra en mayor proporción en la subunidad beta, tiene una carga negativa y es el responsable de la larga vida media que presenta esta gonadotropina (Martinuk et al. 1991). Esta particularidad así como el tamaño y el peso de la molécula impide que se metabolice rápidamente, o que atraviese fácilmente el filtro renal, lo que prolonga su tiempo en la circulación sanguínea (Cole, 1975; Martinuk et al. 1991). Schams et al. (1978) reportaron que la vida media en bovinos es de 45,6 horas. En ovejas, algunos autores encuentran una remoción de la circulación más rápida, siendo la vida media de 21 horas a una dosis aproximada a 25.000 UI (Mc Intosh et al. 1975; Martinuk et al. 1991). Más allá de la vida media, su acción es bastante prolongada en rumiantes ya que su presencia en la circulación sanguínea es detectable por más de 10 días (Murphy y Martinuk, 1991).

La eCG administrada algunas horas previas a la ovulación en los bovinos tiene la capacidad de unirse a los receptores de FSH y LH de los folículos mayores a 9 mm de diámetro (Soumano et al. 1996), y luego de la ovulación a los receptores de LH del CL (Castilho et al. 2014). La administración de esta gonadotropina previo a la ovulación de la vaca incrementa la proporción de hembras que ovulan, estimula el crecimiento del folículo ovulatorio (aumentando su diámetro y la tasa de crecimiento diario) y aumenta las concentraciones plasmáticas de progesterona luego de la ovulación (Baruselli et al. 2004; Bó et al. 2007; Núñez et al. 2014). Si bien no existe tanta información disponible en ovinos y caprinos sobre la administración de eCG antes de la ovulación, los efectos probablemente sean similares a los reportados en bovinos (Barrett et al. 2004). Se ha reportado que cuando se administra luego de un tratamiento con progestágenos (al retirar el dispositivo con progesterona) incrementa la tasa de preñez en cabras (Menchaca y Rubianes, 2004 y 2007).

2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

Debido a los efectos favorables sobre la actividad ovárica antes mencionados, en bovinos, caprinos y ovinos, el uso de la eCG está ampliamente difundido para la inducción y sincronización de la ovulación, administrada siempre previo a la inseminación. La dosis de eCG utilizada para la inducción de la ovulación en ovinos es de 200 a 500 UI dependiendo de la región, estación del año, raza, tamaño de los animales, entre otros factores. Sin embargo, nunca ha sido propuesto evaluar su efecto durante la gestación como ocurre naturalmente en la yegua, lo que podría ser favorable para la implantación embrionaria también en otras especies considerando su efecto luteotrófico. La eCG tiene como ventaja frente a LH, GnRH o hCG una mayor vida media, permitiendo un efecto más prolongado lo que probablemente repercuta en un soporte luteal más adecuado.

Para avanzar con esta alternativa resulta necesario conocer el efecto de la eCG sobre la actividad ovárica y particularmente sobre la función del CL cuando es administrada previo al reconocimiento materno de la gestación. Parte de nuestro equipo de investigación llevó a cabo una serie de experimentos en vacas en anestro para evaluar el efecto de eCG administrada al Día 14 post-inseminación (Núñez-Olivera et al. 2018). Estos estudios en vacas demostraron que la administración de doble dosis de eCG en bovinos (al momento del retiro del dispositivo y a los 14 días luego de la inseminación) mejora la tasa de preñez al compararlo con un grupo control sin eCG (61.3%, 168/274 vs. 47.5%, 121/255, respectivamente; $P < 0,05$).

Por lo tanto, si bien hay antecedentes alentadores con el uso de la eCG post servicio en vacas, la información es sumamente escasa en esa especie y en ovinos no se ha reportado aún ningún estudio. Para responder algunas de estas interrogantes con respecto al uso de eCG luego de la inseminación en la oveja nos planteamos evaluar su efecto a nivel ovárico y sobre diferentes parámetros reproductivos, con el fin de mejorar el establecimiento y el mantenimiento de la gestación.

Por otro lado, considerando que la administración de una dosis de eCG luego de la inseminación y antes del período crítico de gestación en ovinos podría tener efecto sobre el desarrollo folicular, se podría asociar a una dosis de un análogo de GnRH con el fin de inducir la ovulación, formar CLs accesorios, aumentar los niveles de progesterona y consecuentemente aumentar la tasa de preñez. Nos planteamos evaluar el efecto de la asociación de estas dos gonadotrofinas sobre el establecimiento y el mantenimiento de la gestación.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

Las pérdidas embrionarias en la gestación temprana representan una limitante para alcanzar una alta eficiencia reproductiva. Las concentraciones sanguíneas de progesterona previo al período crítico tienen cierto efecto sobre dichas pérdidas, y un mayor soporte luteal en esta etapa podría favorecer el establecimiento de la gestación. Antecedentes reportan que la eCG posee efecto LH que podría brindar un soporte luteotrófico, pero su uso no ha sido propuesto para mejorar la actividad luteal en ovinos.

Nuestro plan de trabajo consiste en intervenir mediante una estrategia simple, de fácil aplicación y económica como lo es la administración de una dosis de eCG al Día 5 o 10 luego de la inseminación, durante la fase luteal temprana y media/tardía. Para ello es necesario identificar si existe algún efecto de ésta gonadotropina sobre el CL y los folículos ováricos, y posteriormente evaluar si dicho efecto puede favorecer el establecimiento y mantenimiento de la gestación. Por otro lado se plantea evaluar el establecimiento y mantenimiento de la gestación ovina asociado o no a una dosis de eCG a una dosis de GnRH 30 horas más tarde.

Hipótesis

La primera hipótesis planteada es que la administración de eCG luego de la ovulación y antes del período crítico de la gestación posee un efecto favorable sobre la función del CL, y que esto mejora el establecimiento y mantenimiento de la gestación en la oveja. La segunda hipótesis es que el tratamiento con eCG asociado a una dosis de GnRH aumenta la tasa de preñez y disminuye las pérdidas de gestación.

Objetivo General

Determinar el efecto de la administración de eCG previo al período crítico sobre el establecimiento y el mantenimiento de la gestación en ovinos. Evaluar el efecto de la eCG asociado o no a una dosis de GnRH 30 horas después sobre los resultados reproductivos.

Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto de la eCG sobre:
 - la dinámica folicular, el desarrollo del CL y la formación de CLs accesorios.
 - las concentraciones séricas de progesterona en los primeros 30 días luego del servicio.
- Evaluar el efecto de la eCG asociado o no a una dosis de GnRH 30 horas más tarde sobre:
 - la tasa de preñez y número de fetos.
 - las pérdidas embrionarias/fetales.

4. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN

Se realizaron 4 experimentos secuenciales en los cuales para sincronizar la ovulación y evitar otros factores ajenos a los tratamientos, todas las ovejas recibieron el mismo protocolo de IATF para ser inseminadas todas el mismo día, con los mismos eyaculados con semen fresco proveniente de los mismos carneros y asignados de manera balanceada a cada grupo experimental. El Experimento 1 se realizó con el objetivo de determinar el efecto de una dosis de eCG administrada en la fase luteal sobre el desarrollo y función del CL, la dinámica folicular y la posible formación de CLs accesorios. Posteriormente, con el fin de evaluar el establecimiento de la gestación se realizó el Experimento 2, en el que las ovejas recibieron el mismo tratamiento que en el experimento anterior para determinar la tasa de preñez. Considerando que en el Experimento 1 se encontró que la eCG tiene efecto sobre la actividad ovárica pero en el Experimento 2 no se encontró ningún efecto sobre la tasa de preñez, en los Experimentos 3 y 4 se evaluó el uso de eCG asociada o no a una dosis de GnRH. En estos últimos dos experimentos se evaluó el establecimiento de la gestación determinada 30 días después de la inseminación, y el mantenimiento de la misma a los 70 días.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se realizaron durante la estación reproductiva (Marzo-Abril) en las instalaciones de Fundación IRAUy (Montevideo, Uruguay), en la Estación Experimental Mario Cassinoni de la Facultad de Agronomía (Paysandú, Uruguay) y en dos predios pertenecientes a empresas privadas (Lavalleja y Salto, Uruguay). En todos los experimentos las ovejas pastorearon campo nativo y recibieron un tratamiento antiparasitario 15 días antes de comenzar con la sincronización de la ovulación. Fueron sincronizadas mediante un Tratamiento Corto en base a progestágenos, $\text{PGF}_2\alpha$ y eCG, para ser IATF (Menchaca y Rubianes, 2004). Reportes previos muestran que con este protocolo más del 90% de las ovejas ovulan aproximadamente a las 60 horas de retirado el dispositivo, con una pequeña dispersión que permitiría obtener una alta tasa de fertilización mediante una inseminación (Vilariño et al. 2013). En el Experimento 1 se utilizó un único eyaculado de un carnero para inseminar todas las ovejas, y en el Experimento 2, 3 y 4 se utilizó un pool de eyaculados de varios carneros extraídos por vagina artificial y ser administrado por vía intrauterina. Cada eyaculado fue evaluado considerándose apto sólo aquel con un volumen mayor a 0,5 ml, motilidad de masa mayor a 3 (escala 0-5) y con más de 80% de motilidad progresiva. El semen fresco fue diluido en leche UHT descremada para utilizar una dosis de inseminación con 100×10^6 espermatozoides por oveja (i.e. 500×10^6 espermatozoides/ml), y se mantuvo a baño maría a 30°C para ser utilizado dentro de la primera hora luego de extraído. Las ovejas fueron inseminadas a tiempo fijo por el mismo operario en todos los experimentos entre las 48 y 54 horas después de retirado el dispositivo por vía intrauterina mediante laparoscopia (Karl Storz, Hopkins, Tuttlingen, Alemania). El día de la inseminación artificial fue considerado como el Día 0 para todos los experimentos.

5.1 Experimento 1

Este experimento se llevó a cabo en las instalaciones de Fundación IRAUy (Montevideo, 56° LO 34° LS) sobre un total de 30 ovejas multíparas Corriedale. Al inicio del experimento la condición corporal (CC) de los animales fue de 2.8 ± 0.3 (escala de 0–5), se mantuvieron sobre campo nativo y fueron suplementados diariamente con fardo de alfalfa y ración balanceada (2000 y 300 gr/oveja/día respectivamente) y agua *ad libitum*. Las ovejas fueron sincronizadas mediante un dispositivo con 0,3 g progesterona (DICO, Dispositivo Intravaginal Caprino Ovino, Syntex, Buenos Aires, Argentina) durante 6 días, asociado a 300 UI de eCG (Novormon, Syntex, Buenos Aires, Argentina) y 125 μg de cloprostenol (análogo de prostaglandina, Ciclase DL, Syntex, Buenos Aires, Argentina) administrados i.m. al momento del retiro del dispositivo. Se realizó la IATF tal como se describió previamente utilizando un eyaculado de un carnero. Las ovejas se dividieron en bloques según CC y fueron asignados al azar en tres grupos experimentales, para recibir una dosis i.m. de 400 UI de eCG al Día 5 luego de la IATF ($n = 10$) o al Día 10 ($n = 10$), mientras que el grupo restante no recibió eCG luego de la IATF actuando como Grupo Control ($n = 10$).

Las estructuras ováricas fueron monitoreadas diariamente mediante ultrasonografía

transrectal en modo-B utilizando un transductor de 7,5 MHz (Well-D, Beijing, China) realizado por el mismo operario desde el momento del retiro del dispositivo intravaginal hasta el Día 30 en las ovejas preñadas y hasta la siguiente ovulación en las ovejas no gestantes. Para realizar la ultrasonografía el animal se mantuvo de pie e inmobilizado en un cepo diseñado para este propósito. Los ovarios se ubicaron de acuerdo al procedimiento descrito por Ginther y Kot (1994) con el fin de realizar un mapeo de las estructuras ováricas, grabando, midiendo y dibujando la ubicación dentro del ovario de los folículos ≥ 3 mm, para poder así hacer el seguimiento de cada folículo de forma individual. Durante una onda folicular al menos un folículo alcanza un diámetro de aproximadamente 5 mm o más, este folículo se siguió de manera retrospectiva y se tomó como el día de emergencia cuando su diámetro fue de 3 mm (Menchaca y Rubianes, 2004). Los folículos antrales se clasificaron como pequeños (3 a < 4 mm de diámetro), medios (4 a < 5 mm) o grandes (≥ 5 mm). Una onda folicular se definió como un grupo de folículos pequeños que da origen a uno o más folículos grandes. Para cada onda folicular, el día de la emergencia se definió como el día en que el folículo más grande alcanzó 3 mm de diámetro, seguido por un aumento en su diámetro el día posterior. La fase de crecimiento de un folículo se consideró como el período transcurrido entre los 3 mm de diámetro y el día que alcanzó su máximo diámetro. La tasa de crecimiento (mm/día) para el folículo más grande de cada onda se calculó como la diferencia entre el diámetro máximo y el diámetro inicial sobre el período transcurrido expresado en días. El intervalo entre ondas foliculares se definió como el período entre la aparición de dos ondas foliculares sucesivas. La duración de cada onda se determinó como el intervalo entre la aparición del folículo de mayor diámetro y el día en que regresó a 3 mm. La ocurrencia de la ovulación fue definida como la desaparición de un folículo grande, usualmente mayor de 5 mm de diámetro. La tasa de ovulación se definió como el número de folículos que alcanzaron la ovulación por oveja, variable que fue confirmada más tarde por la presencia del CL. Asimismo, también se evaluó el desarrollo del/los CL/s de cada oveja midiendo los diámetros menor y mayor de cada CL (d_1 y d_2 , respectivamente) y a partir de estos datos se calculó el área luteal, utilizando la fórmula $A=4\pi d_1/2d_2/2$ (Kastelic et al. 1990). En los animales con más de un CL se sumó el área luteal de todos los CLs.

El efecto de la eCG sobre la dinámica folicular se evaluó con respecto al estadio en que se encontraba el folículo más grande al momento de la administración de eCG. Por lo tanto, los términos onda en fase de regresión u onda en fase de crecimiento se refieren al estadio del folículo de mayor diámetro en el momento del tratamiento con eCG. La nueva onda que emergió luego de la administración de eCG fue denominada como onda emergente después del tratamiento.

A su vez, para determinar las concentraciones séricas de progesterona durante el mismo período que se realizó el mapeo de las estructuras ováricas, se extrajeron diariamente por punción de la vena yugular muestras de sangre de 10 ml de cada animal. Las muestras se centrifugaron dentro de la hora siguiente a la extracción y el suero fue almacenado a -20°C para el posterior análisis mediante radioinmunoanálisis (RIA) en el Laboratorio de Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay. Las muestras se analizaron por duplicado mediante un RIA en fase sólida Iodo¹²⁵ usando kits de DPC (Coat-A-Count, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, California, Estados Unidos) validado previamente por Meikle et al. (1997).

La sensibilidad del ensayo fue 0,1 ng/ml y los coeficientes de variación intra-ensayo fueron de 7,5%, 5,5% y 7,7% para los valores controles bajos ($1,0 \pm 0,5$ ng/ml), medio ($2,2 \pm 0,2$ ng/ml) y altos ($8,2 \pm 0,5$ ng/ml), respectivamente. Los coeficientes inter-ensayo fueron de 9,9%, 12,3% y 9,8% para valores de control bajos, medios y altos, respectivamente.

5.2 Experimento 2

Este experimento se realizó en la Estación Experimental Mario Cassinoni de la Facultad de Agronomía de la Universidad de la República, ubicada en el departamento de Paysandú (58° LO 32° LS). Se utilizó un total de 408 ovejas multíparas cruza (Texel, Merino, Finnish Landrace, Poll Dorset, Romney Marsh y Southdown) que comenzaron el experimento con una CC de $2,8 \pm 0,3$. Las ovejas recibieron un tratamiento de sincronización estral utilizando esponjas intravaginales con 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (Progespon, Syntex, Buenos Aires, Argentina) asociadas a una dosis i.m. de $\text{PGF}_2\alpha$ y eCG tal como se describió en el Experimento 1. Se utilizaron dos carneros cuyo eyaculado se trabajo en forma de pool tal como se describió previamente. Luego de la IATF las ovejas fueron asignadas a tres grupos experimentales para recibir 400 UI de eCG i.m. al Día 5 ($n = 137$), al Día 10 ($n = 138$), o para no recibir eCG alguna luego de la IATF actuando como Grupo Control ($n = 133$). La tasa de no retorno al estro se determinó por medio de la detección estral diaria con siete machos vasectomizados marcadores entre el Día 13 y 22. El Día 30 se realizó el diagnóstico de gestación por ultrasonografía transrectal (5,0 MHz, Well-D, Beijing, China).

5.3 Experimento 3

Este experimento se realizó en el departamento de Salto (57° LO 31° LS) sobre un total de 587 ovejas Merino multíparas que presentaban una CC de $2,8 \pm 0,2$ al inicio del experimento. Las ovejas recibieron un tratamiento de sincronización estral utilizando esponjas intravaginales asociadas a una dosis i.m. de $\text{PGF}_2\alpha$ y eCG tal como se describió en el Experimento 1. Se utilizaron tres carneros cuyo eyaculado se trabajo en forma de pool tal como se describió previamente. Después de la IATF las ovejas fueron asignadas aleatoriamente a cuatro grupos experimentales en un diseño experimental 2×2 factorial, para recibir o no 400 UI de eCG el Día 5 en la mañana por vía i.m. y 100 μg de un análogo de GnRH (acetato de gonadorelina, Gonasyn Gdr., Syntex, Buenos Aires, Argentina) el Día 6 en la tarde por vía i.m., 30 horas después de la administración de eCG. De esta manera se conformaron cuatro grupos experimentales, uno recibió una dosis de eCG al Día 5 ($n = 148$), otro de GnRH al Día 6 ($n = 142$), otro recibió la combinación de ambas hormonas, eCG y GnRH ($n = 143$), y el Grupo Control no recibió ningún tratamiento luego de la IATF ($n = 154$). El diagnóstico de gestación se realizó el Día 30 por ultrasonografía transrectal (5,0 MHz, Well-D, Beijing, China), y con el fin de determinar pérdidas embrionarias/fetales se repitió el diagnóstico al Día 70 mediante ultrasonografía transabdominal (3,5 MHz, Well-D, Beijing, China).

5.4 Experimento 4

Un total de 715 ovejas multíparas fueron utilizadas en dos réplicas, 571 Merino con una CC $3,1 \pm 0,2$ (57° LO 31° LS, Salto) y 144 Corriedale con una CC $3,9 \pm 0,5$ (55° LO 34° LS, Lavalleja). Las ovejas recibieron un tratamiento de sincronización estral utilizando esponjas intravaginales asociadas a una dosis i.m. de $\text{PGF}_2\alpha$ y eCG tal como se describió en el Experimento 1. Se utilizaron tres carneros en la réplica 1 y dos en la réplica 2, en cada réplica los eyaculados se trabajaron en pool como se describió previamente. En ambas réplicas las ovejas fueron asignadas a cuatro grupos experimentales en un arreglo 2×2 factorial para recibir o no 400 UI de eCG el Día 10 de mañana y 100 μg de un análogo de GnRH (acetato de gonadorelina, Gonasyn Gdr., Syntex, Buenos Aires, Argentina) el Día 11 de tarde, 30 horas después de la administración de eCG, ambos por vía i.m.. De esta manera un grupo fue tratado sólo con eCG al Día 10 ($n = 180$), otro con GnRH al Día 11 ($n = 186$), otro con eCG y GnRH ($n = 180$), y el Grupo Control no recibió tratamiento luego de la IATF ($n = 169$). El diagnóstico de gestación se realizó el Día 30 por ultrasonografía transrectal (5,0 MHz, Well-D, Beijing, China), y con el fin de determinar pérdidas embrionarias/fetales se repitió el diagnóstico al Día 70 mediante ultrasonografía transabdominal (3,5 MHz, Well-D, Beijing, China).

5.5 Variables durante la gestación

En los experimentos 2, 3 y 4, la tasa de preñez se definió como el número de ovejas preñadas al Día 30 sobre el total de ovejas inseminadas, la tasa de prolificidad como el número total de fetos presentes al Día 30 sobre el total de ovejas preñadas. En el Experimento 2 la tasa de no retorno al estro se determinó como el número de ovejas sin manifestación estral entre el Día 13 y 22 sobre el total de ovejas inseminadas. En el Experimento 3 y 4 las pérdidas embrionarias/fetales se determinaron como la diferencia en el número de embriones/fetos entre los Días 30 y 70 de las ovejas preñadas al Día 30. Las pérdidas de preñez se determinaron de la misma manera, considerando el número de ovejas preñadas en ambos momentos.

5.6 Análisis estadístico

En el Experimento 1 el diámetro folicular, el área luteal y las concentraciones séricas de progesterona fueron comparadas usando procedimientos mixtos (StataCorp, 2013), incluyendo los tratamientos con eCG y el tiempo como efectos fijos considerando también su interacción, y los animales como efecto aleatorio. Se utilizó el test exacto de Fisher para comparar el número de ovejas con uno, dos o tres CLs, la tasa de preñez, y el número de ovejas con uno o dos embriones. El test no paramétrico de Wilcoxon se usó para comparar el intervalo entre ondas foliculares, el largo de la duración de la onda folicular, la duración de la fase de crecimiento, el Día de emergencia de cada onda, la tasa de crecimiento del folículo mayor, el máximo diámetro de dicho folículo, y el Día que alcanzó el máximo diámetro.

En los Experimentos 2, 3 y 4, la tasa de no retorno al estro, de preñez y de mortalidad embrionaria/fetal fueron analizadas por modelos generalizados y mixtos (regresión logística, StataCorp, 2015). Por otra parte, la tasa de prolificidad se analizó por

regresión de Poisson. En los últimos dos experimentos se realizó un arreglo 2 x 2 factorial que incluyó la administración de eCG y GnRH. Para las variables de los experimentos 2, 3 y 4 se consideró como efecto fijo el tratamiento y su interacción, y como efecto aleatorio la identidad del animal y también la réplica en el Experimento 4.

En todos los experimentos se asumió una diferencia significativa cuando el valor P fue menor a 0,05, y tendencia estadística cuando el valor P fue entre 0,05 y 0,1. Los resultados se presentan como media \pm error estándar (EE).

6. RESULTADOS

6.1 Experimento 1

El protocolo de sincronización del estro fue efectivo en el 90% de los animales, dado que 27 ovejas de un total de 30 (9/10 de cada grupo experimental) ovularon luego del retiro del dispositivo con progesterona. En el análisis estadístico de las variables evaluadas para los tres grupos no se consideraron las tres ovejas que no ovularon luego de la sincronización.

La tasa ovulatoria fue similar en las ovejas que luego fueron asignadas a los tres grupos experimentales, siendo $2,3 \pm 0,4$ en el Grupo Control, $2,2 \pm 0,7$ en el Grupo que recibió eCG al Día 5 y $2,3 \pm 0,8$ en el Grupo que recibió eCG al Día 10 ($P > 0,1$).

Si bien este experimento no fue diseñado para comparar la tasa de preñez, se indica de manera descriptiva el número de ovejas preñadas y el número de fetos por oveja. Se preñaron siete ovejas del Grupo Control, cuatro del Grupo eCG Día 5 y cinco del Grupo eCG Día 10. La cantidad de fetos por oveja preñada fue $1,4 \pm 0,3$ en el Grupo Control, $1,5 \pm 0,3$ en el Grupo eCG Día 5 y $1,6 \pm 0,4$ en el Grupo eCG Día 10. Las ovejas que no se preñaron (11/27) mostraron celo $16,5 \pm 1,2$ días luego de la IATF y la ovulación ocurrió $1,2 \pm 0,2$ días más tarde. No se detectaron diferencias significativas entre los grupos experimentales en ninguna de estas variables.

6.1.1 Concentraciones séricas de progesterona y área luteal

Se encontró un efecto significativo para el tratamiento, el día y su interacción ($P < 0,05$). A medida que la fase luteal fue avanzando luego de la ovulación, las concentraciones séricas de progesterona aumentaron gradualmente en los tres grupos experimentales. No se encontró un efecto sobre las concentraciones de progesterona cuando la eCG se administró al Día 5, pero sí cuando se administró al Día 10 ($P < 0,05$). Los datos de las ovejas gestantes y de las ovejas no gestantes analizados por separado, mostraron diferencias entre el grupo eCG Día 10 y el Grupo Control entre el Día 11 y 19 para las ovejas gestantes ($P < 0,01$; Figura 1A), y entre el Día 11 y 15 para las ovejas no gestantes ($P < 0,05$).

El área luteal no fue afectada por el tratamiento cuando la eCG se administró al Día 5, pero fue significativamente mayor en las ovejas tratadas al Día 10. Esta diferencia fue encontrada entre el Día 11 y 30 cuando se analizaron las ovejas gestantes ($P < 0,05$; Figura 1B), pero no se encontraron diferencias en las ovejas no gestantes.

Ningún animal formó CLs accesorios a consecuencia del tratamiento.

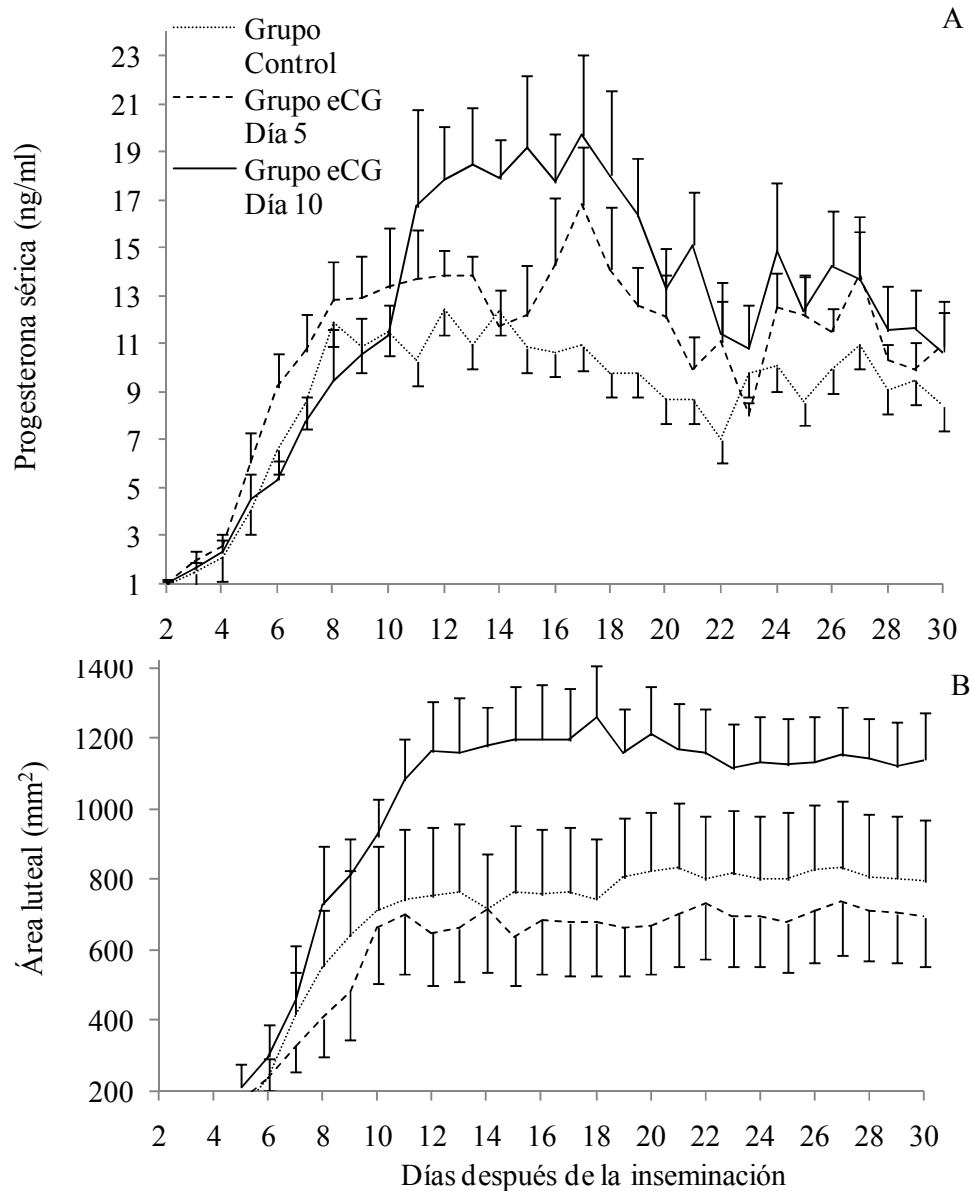


Figura 1. Concentraciones séricas de progesterona (Panel A) y área luteal (Panel B) (media \pm EE) de ovejas gestantes tratadas con 400 UI de eCG al Día 5 ($n = 4$) o al Día 10 ($n = 5$) después de una inseminación a tiempo fijo. El grupo Control no recibió eCG luego de la inseminación ($n = 7$). Diferencias significativas se hallaron entre el Grupo eCG Día 10 y el Control entre el Día 11 y 19 en el Panel A, y entre el Día 11 y 30 en el Panel B ($P < 0,05$).

6.1.2 Dinámica folicular

Con el fin de caracterizar la dinámica folicular durante los primeros 16 días luego de la inseminación, en la Tabla II se muestran los resultados únicamente de las ovejas del Grupo Control. Esta información se presenta simplemente para tomar como referencia la caracterización del patrón de ondas foliculares de las ovejas utilizadas

en el experimento. De nueve ovejas una presentó dos ondas foliculares entre el Día 0 y el Día 16, cuatro presentaron tres ondas y las restantes cuatro presentaron cuatro ondas. Las dos ovejas de este grupo experimental que no quedaron preñadas luego de la inseminación están incluidas en el grupo de hembras que presentaron cuatro ondas, siendo la cuarta onda la ovulatoria.

Tabla II. Caracterización de la dinámica folicular en ovejas que no recibieron ningún tratamiento con eCG entre el Día 0 y 16 luego de una inseminación artificial a tiempo fijo (Grupo Control, n=9). Día de emergencia (DE) y Día de máximo diámetro (DMD) del folículo dominante de cada onda folicular. Media \pm EE.

	1 ^{era} onda folicular		2 ^{da} onda folicular		3 ^{era} onda folicular		4 ^{ta} onda folicular	
	DE	DMD	DE	DMD	DE	DMD	DE	DMD
2 ondas (n=1)	1,0 \pm 0,0 ^a	5,0 \pm 0,0 ^a	8,0 \pm 0,0 ^a	11,0 \pm 0,0 ^a	-	-	-	-
3 ondas (n=4)	1,2 \pm 0,2 ^a	3,2 \pm 0,2 ^b	4,7 \pm 0,5 ^b	8,0 \pm 0,4 ^b	11,2 \pm 0,7 ^a	15,0 \pm 1,2 ^a	-	-
4 ondas (n=4)	0,2 \pm 0,8 ^a	3,5 \pm 0,9 ^b	5,0 \pm 0,7 ^b	7,7 \pm 1,1 ^b	8,2 \pm 0,5 ^b	10,0 \pm 0,4 ^b	11,7 \pm 0,5	14,0 \pm 0,5

Para cada columna, a vs. b son diferentes (P < 0,05).

Se encontraron diferencias significativas para algunas variables del desarrollo folicular durante los 16 días posteriores a la inseminación, entre las ovejas que recibieron eCG al Día 5 y al Día 10 comparadas con el Grupo Control. Por otro lado, no se encontraron diferencias al evaluar estas variables entre las ovejas gestantes y las no gestantes, y por este motivo los datos se analizaron en conjunto.

El tratamiento con eCG al Día 5 (Figura 2 y Tabla III) no afectó el crecimiento folicular de la onda que estaba en fase de regresión, pero sin embargo hubo una tendencia a que se prolongara la duración de la onda que se encontraba en fase de crecimiento al momento del tratamiento (P = 0,07). Asimismo, el folículo de la onda que emergió luego del tratamiento alcanzó un mayor diámetro (P < 0,05) y tendió a prolongar su duración en comparación con el grupo control (P = 0,09).

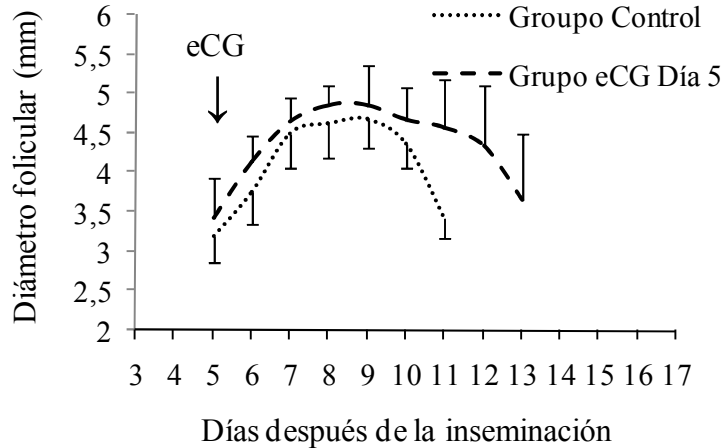


Figura 2. Tamaño (media \pm EE) del folículo de mayor diámetro que se encontraba en fase de crecimiento en ovejas tratadas con 400 UI de eCG al Día 5 luego de la inseminación (n = 9) vs. Grupo Control (n = 9). La duración de la onda tendió a ser mayor a consecuencia del tratamiento ($0,05 < P < 0,1$).

Tabla III. Dinámica folicular de ovejas tratadas con 400 UI de eCG al Día 5 luego de una inseminación a tiempo fijo (n = 9) vs. Grupo Control sin eCG luego de la inseminación (n = 9). Media \pm EE.

	Intervalo entre ondas (días)	Día de emergencia de la onda*	Día del máximo diámetro*	Máximo diámetro (mm)	Tasa de crecimiento (mm)	Duración fase de crecimiento (días)	Duración de la onda (días)
Onda en regresión al momento del tratamiento							
eCG Día 5	-	0,1 \pm 0,4 ^a	2,9 \pm 0,5 ^a	5,4 \pm 0,2 ^a	0,9 \pm 0,1 ^a	3,6 \pm 0,3 ^a	6,7 \pm 0,6 ^a
Control	-	0,8 \pm 0,4 ^a	3,6 \pm 0,5 ^a	5,3 \pm 0,2 ^a	0,9 \pm 0,1 ^a	4,1 \pm 0,4 ^a	6,9 \pm 0,6 ^a
Onda en fase de crecimiento al tratamiento							
eCG Día 5	3,9 \pm 0,5 ^a	4,3 \pm 0,3 ^a	8,1 \pm 0,7 ^a	5,7 \pm 0,4 ^a	0,8 \pm 0,1 ^a	4,9 \pm 0,6 ^a	8,4 \pm 1,1 ^a
Control	4,1 \pm 0,4 ^a	4,5 \pm 0,6 ^a	7,9 \pm 0,5 ^a	5,4 \pm 0,2 ^a	0,9 \pm 0,1 ^a	3,6 \pm 0,5 ^a	6,4 \pm 0,5 ^c
Onda que emergió luego del tratamiento							
eCG Día 5	4,7 \pm 1,1 ^a	7,1 \pm 0,6 ^a	10,4 \pm 0,5 ^a	6,3 \pm 0,4 ^a	0,9 \pm 0,1 ^a	5,4 \pm 1,0 ^a	8,7 \pm 0,9 ^a
Control	3,8 \pm 0,8 ^a	7,3 \pm 0,8 ^a	10,3 \pm 0,8 ^a	5,3 \pm 0,2 ^b	0,8 \pm 0,1 ^a	4,7 \pm 0,6 ^a	6,6 \pm 0,4 ^c

Diferentes superíndices para cada columna, a vs. b ($P < 0,05$) y a vs. c ($0,05 < P < 0,1$). * Días después de la inseminación.

Los resultados de la dinámica folicular del grupo eCG Día 10 en comparación con el Grupo Control se presentan en la Figura 3 y en la Tabla IV. El tratamiento con eCG prolongó la duración de la onda que se encontraba en fase de crecimiento al Día 10 ($P < 0,01$), y tendió a atrasar el Día en el que el folículo dominante alcanzó el máximo diámetro ($P = 0,07$). La duración de la onda que emergió luego de la administración de eCG tendió a prolongarse por el tratamiento con eCG ($P = 0,06$).

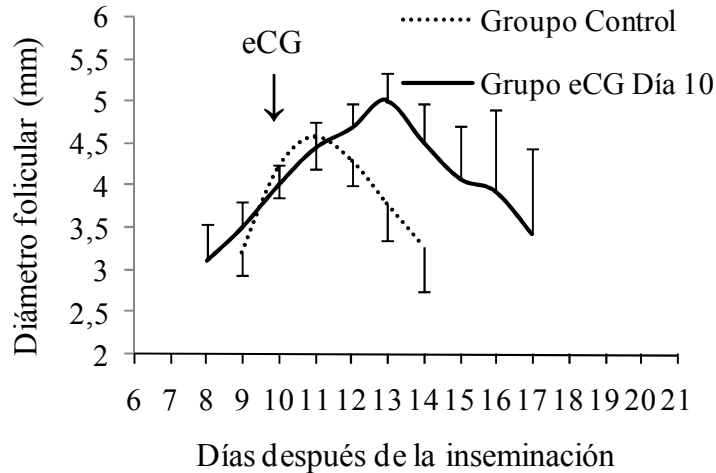


Figura 3. Tamaño (media \pm EE) del folículo de mayor diámetro que se encontrarba en fase de crecimiento en ovejas tratadas con 400 UI de eCG al Día 10 de la inseminación (n = 9) vs. Grupo Control (n = 9). Folículo mayor alcanzó más tarde el máximo diámetro a concurrencia del tratamiento (P < 0,05) y la duración de la onda tendió a ser mayor a concecunecia del tratamiento (0,05 < P < 0,1).

Tabla IV. Dinámica folicular de ovejas tratadas con 400 UI de eCG al Día 10 luego de una inseminación a tiempo fijo (n = 9) vs. un Grupo Control sin eCG luego de la inseminación (n = 9). Media \pm EE.

	Intervalo entre ondas (días)	Día de emergencia de la onda*	Día del máximo diámetro*	Máximo diámetro (mm)	Tasa de crecimiento (mm)	Duración de la fase de crecimiento (días)	Duración de la onda (días)
Onda en regresión al momento del tratamiento							
eCG Día 10	4,1 \pm 0,6 ^a	4,3 \pm 0,4 ^a	7,9 \pm 0,5 ^a	5,6 \pm 0,2 ^a	0,8 \pm 0,1 ^a	3,9 \pm 0,6 ^a	6,4 \pm 0,9 ^a
Control	4,2 \pm 0,4 ^a	3,6 \pm 0,6 ^a	6,6 \pm 0,5 ^a	5,4 \pm 0,2 ^a	0,8 \pm 0,1 ^a	4,0 \pm 0,3 ^a	6,7 \pm 0,5 ^a
Onda en fase de crecimiento al tratamiento							
eCG Día 10	3,7 \pm 0,5 ^a	8,0 \pm 0,4 ^a	12,6 \pm 0,7 ^a	5,6 \pm 0,3 ^a	0,7 \pm 0,1 ^a	5,6 \pm 1,0 ^a	9,3 \pm 1,1 ^a
Control	4,3 \pm 0,6 ^a	7,8 \pm 0,5 ^a	10,4 \pm 0,4 ^c	5,1 \pm 0,1 ^a	0,9 \pm 0,1 ^a	4,1 \pm 0,7 ^a	5,8 \pm 0,6 ^b
Onda que emergió luego del tratamiento							
eCG Día 10	4,5 \pm 0,6 ^a	12,2 \pm 0,4 ^a	15,7 \pm 0,8 ^a	5,8 \pm 0,4 ^a	0,9 \pm 0,1 ^a	5,3 \pm 0,5 ^a	9,3 \pm 0,9 ^a
Control	6,0 \pm 1,0 ^a	12,4 \pm 0,6 ^a	15,8 \pm 0,6 ^a	5,5 \pm 0,2 ^a	0,8 \pm 0,1 ^a	4,5 \pm 0,9 ^a	6,6 \pm 0,8 ^c

Diferentes superíndices para cada columna, a vs. b (P < 0,05) y a vs. c (0,05 < P < 0,1). * Días después de la inseminación.

6.2 Experimento 2

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales en la tasa de no retorno al estro, la tasa de preñez, ni en la tasa de prolificidad al Día 30 (Tabla V).

Tabla V. Tasa de no retorno al estro, tasa de preñez y tasa de prolificidad de ovejas tratadas con 400 UI de eCG al Día 5 o 10 luego de una inseminación a tiempo fijo.

	Tasa de no retorno al estro	Tasa de preñez al Día 30	Tasa de prolificidad al Día 30
Grupo Control	43,6% (58/133)	36,1% (48/133)	150,0% (72/48)
eCG al Día 5	48,2% (66/137)	35,0% (48/137)	131,2% (63/48)
eCG al Día10	42,8% (59/138)	33,3% (46/138)	139,1% (64/46)

P = NS.

6.3 Experimento 3

Las tasas de preñez y de prolificidad al Día 30 no fueron afectadas por la administración de eCG al Día 5 o GnRH al Día 6, ni hubo interacción entre ambos tratamientos (Tabla VI). Las pérdidas de preñez o fetales entre los días 30 y 70 de la gestación no se vieron afectadas por el tratamiento con eCG o GnRH, ni hubo interacción entre ambos tratamientos. En general las pérdidas de preñez fueron en promedio 6,3% (20/319). Los resultados se muestran en la Tabla VI.

Tabla VI. Tasa de preñez, tasa de prolificidad y fallas en la gestación en ovejas tratadas con 400 UI de eCG 5 días después de una inseminación a tiempo fijo, asociada o no a una dosis de GnRH 30 horas más tarde (al Día 6 de la inseminación).

	Tasa de preñez al Día 30	Tasa de prolificidad al Día 30	Pérdidas de preñez entre el Día 30 y 70	Pérdidas fetales entre el Día 30 y 70
Efectos principales				
eCG al Día 5				
Con eCG	50,5% (147/291)	133,3% (196/147)	4,8% (7/147)	4,6% (9/196)
sin eCG	58,1% (172/296)	145,9% (251/172)	7,6% (13/172)	6,4% (16/251)
GnRH al Día 6				
con GnRH	54,4% (155/285)	138,1% (214/155)	6,5% (10/155)	5,6% (12/214)
sin GnRH	54,3% (164/302)	142,1% (233/164)	6,1% (10/164)	5,6% (13/233)
Efectos simples				
Grupo Control	58,4% (90/154)	145,6% (131/90)	6,7% (6/90)	6,1% (8/131)
eCG al Día 5	50,0% (74/148)	137,8% (102/74)	5,4% (4/74)	4,9% (5/102)
GnRH al Día 6	57,7% (82/142)	146,3% (120/82)	8,5% (7/82)	6,7% (8/120)
eCG+GnRH	51,0% (73/143)	128,8% (94/73)	4,1% (3/73)	4,2% (4/94)

P=NS

6.4 Experimento 4

La tasa de preñez al Día 30 aumentó por la administración de eCG al Día 10 ($P < 0,01$) y no fue afectada por el tratamiento con GnRH ni hubo interacción entre ambos tratamientos (Tabla VII). Las pérdidas de preñez y fetales entre el Día 30 y 70 fueron mayores en las ovejas tratadas con eCG ($P < 0,05$). No hubo diferencia en la tasa de preñez al Día 70, ni considerando los factores principales ni en la interacción entre ambos, siendo en promedio 47,2% (170/360) para las ovejas que recibieron eCG al Día 10, y 41,1% (146/355) para las ovejas que no recibieron eCG luego de la inseminación. Las fallas en la gestación (pérdidas de preñez y pérdidas fetales) no se vieron afectadas por el tratamiento con GnRH. Como no hubo efecto de la réplica experimental para ninguna variable, los datos se muestran en conjunto.

Tabla VII. Tasa de preñez, tasa de prolificidad y fallas en la gestación en ovejas tratadas con 400 UI de eCG 10 días después de una inseminación a tiempo fijo asociada o no a una dosis de GnRH 30 horas más tarde (al Día 11 de la inseminación).

	Tasa de preñez al Día 30	Tasa de prolificidad al Día 30	Pérdidas de preñez entre el Día 30 y 70	Pérdidas fetales entre el Día 30 y 70
Efectos principales				
eCG al Día 10				
con eCG	51,7% ^a (186/360)	135,5% ^a (252/186)	8,6% ^a (16/186)	10,3% ^a (26/252)
sin eCG	42,5% ^b (151/355)	141,7% ^a (214/151)	3,3% ^b (5/151)	3,7% ^b (8/214)
GnRH al Día 11				
con GnRH	45,9% ^a (168/366)	140,5% ^a (236/168)	6,0% ^a (10/168)	8,5% ^a (20/236)
sin GnRH	48,4% ^a (169/349)	136,1% ^a (230/169)	6,5% ^a (11/169)	6,1% ^a (14/230)
Efectos simples				
Grupo Control	43,8% ^{ab} (74/169)	141,9% ^a (104/74)	5,4% ^{ab} (4/74)	2,9% ^a (3/104)
eCG al Día 10	52,8% ^a (95/180)	132,6% ^a (126/95)	7,4% ^a (7/95)	8,7% ^{ab} (11/126)
GnRH al Día 11	41,4% ^b (77/186)	142,9% ^a (110/77)	1,3% ^b (1/77)	4,5% ^a (5/110)
eCG+GnRH	50,6% ^{ab} (91/180)	138,5% ^a (126/91)	9,9% ^a (9/91)	11,9% ^b (15/126)

Diferentes superíndices para cada columna, $P < 0,05$.

7. DISCUSIÓN

Esta tesis contribuye con una serie de experimentos enfocados en la evaluación de la eCG como soporte luteotrófico, con la idea de explorar estrategias farmacológicas para mejorar el establecimiento de la gestación en ovinos.

En el Experimento 1 se demostró que la administración de eCG luego de la ovulación en ovejas afecta la actividad luteal y la dinámica folicular. El tratamiento con 400 UI de eCG 10 días después de la inseminación tuvo un efecto positivo sobre el área luteal y consecuentemente sobre las concentraciones sanguíneas de progesterona. Por otro lado, el tratamiento con 400 UI de eCG 5 días luego de la inseminación no influyó en el tamaño ni en la actividad luteal. En ambos tratamientos se encontró un efecto sobre la dinámica folicular.

El incremento en las concentraciones séricas de progesterona y en el tamaño luteal inducido por el tratamiento con eCG, posiblemente responde a la capacidad de esta gonadotropina de unirse a los receptores de LH de las células luteales (Stewart y Allen, 1981). Resulta interesante que éste efecto fue evidente cuando la eCG se administró al Día 10 pero no al Día 5. Aunque este experimento fue diseñado para determinar dicha respuesta y no para explicar el mecanismo responsable, probablemente la diferencia pueda estar asociada con la dinámica en la población de células luteales y su diferente sensibilidad al efecto LH de la eCG en la fase luteal temprana o tardía. La capacidad esteroidogénica de las células luteales junto con su capacidad en responder a la LH, aumentan en la medida que el CL se va desarrollando (Niswender et al., 2000). Aunque las células luteales grandes son la principal fuente de producción de progesterona basal, no serían sensibles a la adición de LH (Niswender, 2002) y entonces no tendrían la capacidad de respuesta a la eCG. Sin embargo, se ha demostrado que las células luteales pequeñas sí responden a la LH con un aumento en la producción de progesterona, más marcada en la medida que avanza el ciclo estral (Baird, 1992). En el ciclo estral de las ovejas, el número de células luteales pequeñas aumenta aproximadamente cinco veces entre el Día 4 y 16 (Niswender et al., 2000). Por otro lado, la expresión de ARNm para los receptores de LH así como el número de estos receptores en el CL ovino, también aumentan aproximadamente cinco veces entre el Día 9 y 12 (Niswender et al., 2000). Entonces, nuestras conclusiones acerca de la respuesta luteal a la eCG administrada 10 días después de la ovulación, quizás pueden haber estado desencadenadas por una mayor sensibilidad a la LH (eCG en este caso) por parte de las células luteales pequeñas en la fase lútea media-tardía. Como mecanismo alternativo, Farin et al. (1988) demostraron que el tratamiento con LH cada 6 horas entre el Día 5 y 10, y al Día 5 con hCG, promueve la conversión de las células luteales pequeñas a células luteales grandes. A partir de esta información, los autores proponen este otro mecanismo para explicar la mayor producción de progesterona en el CL avanzado, lo que también deberíamos tener en cuenta para comprender el efecto de la eCG encontrado en esta tesis. Sumado a esto, aún no está completamente establecida la población de receptores de FSH en los diferentes tipos de células luteales y su posible función en la actividad del CL. Si bien en general se le quita relevancia a este efecto de la FSH, Manns et al. (1984) han mostrado evidencia que el CL bovino contiene receptores

para esta hormona lo que debería ser considerado teniendo en cuenta el efecto FSH de la eCG (Stewart y Allen, 1981). El hecho de encontrar una respuesta biológica en una primera aproximación como la planteada en esta tesis, puede abrir la posibilidad de nuevos estudios para comprender el mecanismo involucrado y avanzar en el conocimiento de la fisiología del CL.

El tratamiento con eCG durante la fase luteal también afectó la dinámica folicular. Este efecto fue dependiente del estado de desarrollo del folículo dominante al momento del tratamiento. Mientras que la administración de eCG no tuvo efecto sobre los folículos que se encontraban en fase de regresión, sí mostró un efecto significativo en aquellos folículos que se encontraban en fase de crecimiento. Esto ocurrió independientemente del diámetro de los folículos presentes en ese momento, es decir tanto en folículos pequeños como medianos o grandes, prolongándose la duración de la onda folicular que estaba en crecimiento. Este hallazgo puede atribuirse al efecto LH (y quizás también al efecto FSH) descrito para la eCG (Stewart y Allen, 1981; Murphy, 2012). En vacas está bien establecido que los folículos antrales adquieren receptores para LH en las células de la granulosa cuando alcanzan los 8 o 9 mm de diámetro (Ginther et al. 1996; Soumano et al. 1996). En la etapa previa, es decir cuando los folículos son más pequeños, el desarrollo depende casi exclusivamente de la FSH. Cuando las concentraciones de FSH comienzan a bajar por la retroalimentación negativa que ejerce el estradiol y la inhibina del folículo dominante, en ausencia de LH o por escasez de sus receptores los folículos subordinados entran en atresia. Scaramuzzi et al. (2011) reportaron que en la oveja este *switch* de la dependencia de FSH a LH ocurre cuando los folículos alcanzan aproximadamente los 4-5 mm de diámetro, los autores se refieren a estos folículos como “potencialmente ovulatorios”. Considerando estos antecedentes, en el presente trabajo los folículos pequeños (menores de 4 mm) que emergieron después de la administración de eCG, pueden haber sido estimulados principalmente por la acción FSH de esta gonadotropina, mientras que el crecimiento de los folículos grandes (mayor a 5 mm) quizás pudo haber sido promovido por el efecto LH, y aquellos medianos (4 a 5 mm) se pudieron ver favorecidos por ambos efectos. Por lo tanto, nuestra observación de que la eCG favorece el desarrollo folicular cuando se administra durante la fase luteal, y que la respuesta depende de la fase de crecimiento o regresión en la que se encuentra el folículo, quizás pueda estar relacionado con la capacidad de los folículos en fase de crecimiento en responder al efecto FSH o LH de la eCG.

Los resultados del Experimento 1 pueden tener una interpretación paradójica, considerando el efecto positivo de la eCG sobre la actividad luteal y a la vez sobre la dinámica folicular. En primer lugar, el efecto luteotrófico de la eCG podría ser prometedor, sugiriendo una mejor función luteal y desarrollo embrionario durante la gestación temprana. Por otro lado, el efecto de la eCG sobre el crecimiento folicular podría promover la producción de estradiol lo que sería perjudicial para la sobrevivencia embrionaria. Existen varios estudios que muestran evidencias de que concentraciones altas de estradiol durante la gestación temprana pueden aumentar las pérdidas embrionarias al adelantar o inducir la luteólisis (Pritchard et al. 1994; Johnson et al. 1996; Bridges et al. 2000). De manera opuesta también se ha encontrado que una reducción en las concentraciones de estradiol-17 β puede atrasar el desarrollo de los receptores de oxitocina y por ende atrasar la luteólisis en la vaca

(Newcombe y Peters, 2014). En este experimento, si bien las concentraciones de estradiol no fueron determinadas, no se observó ningún efecto negativo en la duración de la vida del CL ni en las concentraciones de progesterona. No obstante, su posible efecto sobre el desarrollo embrionario tampoco fue evaluado lo que contribuye a fortalecer la interrogante sobre los resultados que podrían obtenerse al aplicar este tratamiento en un mayor número de ovejas para evaluar la respuesta sobre el establecimiento de la gestación.

En el Experimento 2 se evaluó el efecto de la eCG sobre el establecimiento y el mantenimiento de la gestación, y los resultados no mostraron ninguna diferencia entre los animales que recibieron eCG al Día 5 o al Día 10 vs. el Grupo Control. Esto podría interpretarse de dos maneras: 1) por un lado asumiendo que el aumento en la producción de progesterona al Día 10 (demostrado en el Experimento 1) no fue suficiente para mejorar el establecimiento de la gestación, o 2) que el efecto sobre la dinámica folicular (demostrado en el Experimento 1), y quizás sobre las concentraciones de estradiol, fue tal que neutralizó el efecto positivo observado sobre el CL y la progesterona. Más allá de cuál fue el mecanismo responsable de este resultado –aspecto que no puede ser definido en este estudio–, el establecimiento de la gestación en este experimento no se vio afectado por los tratamientos administrados.

Los resultados del Experimento 3 administrando la eCG al Día 5 confirman los resultados obtenidos en el Experimento 2: la administración de una dosis de 400 UI de eCG en este momento no tienen efecto sobre la tasa de preñez ni sobre la carga fetal en ovejas. Estos resultados eran de esperar considerando que en el Experimento 1 dicho tratamiento no afectó el área luteal, ni la cantidad de CLs, ni las concentraciones séricas de progesterona. El efecto de la eCG al Día 5 tampoco fue negativo sobre la tasa de preñez, lo que sugiere que el efecto sobre la dinámica folicular encontrado previamente no fue en detrimento del establecimiento de la gestación.

En el Experimento 4 se encontró que la tasa de preñez al Día 30 fue mayor en las ovejas que recibieron eCG al Día 10 comparado con las ovejas sin tratamiento. Sin embargo este efecto favorable fue suprimido por mayores pérdidas de gestación durante el segundo mes. El hecho que el establecimiento de la gestación haya sido favorecido durante el primer mes, y que el mantenimiento de la misma fuera afectado de manera negativa durante el segundo mes parecen ser contradictorios. Sin embargo, recientemente Wiltbank et al. (2016) clasificaron el primer trimestre de gestación en bovinos en cuatro etapas en base a las diferentes fases de desarrollo embrionario o fetal, y a los potenciales riesgos de pérdidas de gestación. Estos autores remarcan la importancia en tener suficientes niveles de progesterona circulante durante todo este período. Si la progesterona es insuficiente incluso antes de la inseminación, esto predispone a tener pérdidas en la primera semana de gestación; y si es insuficiente en los primeros días luego de la inseminación, las pérdidas ocurrirían entre el Día 8 y 28. Los autores proponen que el mantenimiento de la gestación en el segundo mes depende principalmente de la calidad embrionaria y de la placenta. Pérdidas en esta etapa pueden deberse a problemas en el desarrollo vascular, embrionario o a algún problema en la formación de la placenta. Estos conceptos no habían sido propuestos de esta manera hasta el año anterior (Wiltbank

et al., 2016). Teniendo en cuenta esta información, probablemente el efecto positivo de la eCG encontrado durante el primer mes en el Experimento 4 esté relacionado con un mejor soporte luteal, elongación de trofoblasto o desarrollo embrionario; y las fallas de gestación encontradas durante el segundo mes quizás estén relacionadas con retrasos o defectos en el desarrollo de la placenta o una deficiencia en la embriogénesis. Considerando todos estos antecedentes, podemos sugerir a modo de hipótesis que el efecto favorable de la eCG al Día 10 sobre el establecimiento de la gestación en el primer mes, no fue suficiente para asegurar el mantenimiento de la gestación en el segundo mes.

Considerando que en el Experimento 1 se demostró que la eCG administrada a los 5 y 10 días de la inseminación promueve el crecimiento del folículo dominante, surgió la idea de administrar GnRH como inductor de la ovulación 30 horas después de la eCG. La idea propuesta fue que la combinación de ambas hormonas podría ser favorable, considerando la estimulación del crecimiento del folículo dominante por la eCG (demostrado en el Experimento 1) y la inducción de ovulación por la GnRH administrada más tarde. Este segundo efecto, evitaría la actividad esteroidogénica de este folículo y quizás favorecería aún más la producción de progesterona inducida por la eCG probablemente generando CLs accesorios tal como ha sido demostrado (Tabla I). Si bien no se pretendía evaluar la eficacia de la GnRH sobre la inducción de CLs accesorios luego de la estimulación por eCG, sí se evaluó la tasa de preñez inducida por ambos tratamientos. Un resultado positivo hubiera ameritado un siguiente experimento más intenso para confirmar el mecanismo propuesto. Sin embargo, la administración de GnRH al Día 6 o al Día 11 no tuvo ningún efecto sobre las variables evaluadas, tanto cuando se administró sola o luego de la eCG. Los resultados obtenidos con el uso de GnRH indican que esta estrategia no fue eficaz para mejorar la tasa de preñez en las ovejas. Es importante destacar que la asociación de ambas hormonas con este fin no había sido propuesta en ninguna especie hasta el momento.

Es interesante que la administración de GnRH en este estudio (no asociada al tratamiento con eCG) no haya tenido ningún efecto sobre la tasa de preñez, tanto cuando fue administrada al Día 6 como al Día 11. Esta hormona se ha propuesto en ovejas para mejorar la tasa de preñez administrándola a los 12 días del servicio reproductivo. Como fue presentado en la Tabla I algunos autores han reportado la formación de CLs accesorios luego del tratamiento (Beck et al. 1996; Akif Cam et al. 2002; Akif Cam y Kuran, 2004; Olfati y Moghaddam, 2013; Hashem et al. 2015) y/o un incremento en las concentraciones plasmáticas de progesterona durante la gestación temprana (Hashem et al. 2015), y/o una disminución en las concentraciones de estradiol (Beck et al. 1996; Basiouni, 2006). También se han reportado resultados positivos sobre el crecimiento y el desarrollo del *conceptus*, y sobre el peso fetal, que podrían influir positivamente en la sobrevivencia de los corderos (Akif Cam y Kuran, 2004). Sin embargo, los estudios sobre la tasa de preñez son contradictorios, tanto con resultados a favor (Akif Cam et al. 2002) como neutrales (Beck et al., 1994). Muchos de estos reportes fueron realizados con un número reducido de animales y ninguno de ellos supera los 100 animales por grupo experimental, lo que limita el alcance de las conclusiones vinculadas a la tasa de preñez. Otro reporte en bovinos con mayor cantidad de animales (n = 421) reportó que el tratamiento tanto con hCG como con GnRH al Día 26 de la inseminación

inducen la formación de CLs accesorios, pero no logran prevenir pérdidas de preñez. En ese trabajo las concentraciones séricas de progesterona fueron predictivas a las subsecuentes pérdidas de preñez (Stevenson et al. 2008). Los resultados del presente estudio con la administración de GnRH son claros y en un número representativo de animales, mostrando que el tratamiento no influyó sobre la tasa de preñez ni las pérdidas durante la gestación. Cabe destacar que en la mayoría de los estudios reportados -que se resumen en la Tabla I- el análogo de GnRH utilizado fue acetato de buserelina y en esta tesis utilizamos acetato de gonadorelina. No obstante, los estudios de bioequivalencia entre ambos análogos nos permiten sugerir que el resultado no estaría afectado por este factor. Trabajos en vacas muestran que no hay diferencias en el pico de LH inducido por estos dos tipos de análogos de GnRH (100 µg de gonadorelina vs. 10 µg de buserelina), mostrando que ambos análogos utilizados a la dosis adecuada tienen el mismo efecto (Chenault et al. 1990).

8. CONCLUSIONES

En conclusión, la administración de 400 UI de eCG 10 días después de la inseminación en ovejas tiene efectos positivos sobre la función luteal, induciendo mayores concentraciones séricas de progesterona. Estos resultados fueron independientes de la cantidad de CLs, ya que ni el tratamiento con 400 UI de eCG al Día 5 ni al Día 10 induce la formación de CLs accesorios. Ambos tratamientos afectan la dinámica folicular, el tratamiento al Día 5 promueve el desarrollo del folículo dominante de la onda que emerge luego del tratamiento, y al Día 10 del folículo que se encuentra en fase de crecimiento al momento del tratamiento. La administración de eCG al Día 5 no influye sobre el establecimiento ni el mantenimiento de la gestación. En cambio, la administración de eCG al Día 10 puede inducir un mayor establecimiento de la gestación durante el primer mes, un efecto que fue neutralizado por mayores pérdidas de preñez observadas en el segundo mes. El tratamiento con un análogo de GnRH 6 u 11 días después de la inseminación no tuvo efecto sobre el establecimiento ni el mantenimiento de la gestación en ovejas.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allam AM, El-Zarkouny SZ, Elshahawy II, Nagadi SA, Kesler DJ. (2015). Effects of post-mating treatments with gonadotropin-releasing hormone and equine chorionic gonadotropin on reproductive efficiency of Harri ewes in tropical regions. *Small Rumi Res* 132: 55–59.

Armengol-Gelonch R, Mallo JM, Pont D, Jimenez A, Valenza A, Souza AH. (2017). Impact of phase of the estrous cycle and season on LH surge profile and fertility in dairy cows treated with different GnRH analogs (gonadorelin vs. buserelin). *Theriogenology* 91: 121-126.

Ashworth CJ, Bazer FW. (1989). Changes in ovine *conceptus* endometrial function following asynchronous embryo transfer on administration of progesterone. *Biol Rep* 40: 425-433.

Akif Cam M, Kuran M, Yildiz S, Selcuk E. (2002). Fetal growth and reproductive performance in ewes administered GnRH agonist on day 12 post-mating. *Anim Reprod Sci* 72: 73-82.

Akif Cam M, Kuran M. (2004). Effects of a single injection of hCG or GnRH agonist on day 12 post mating on fetal growth and reproductive performance of sheep. *Anim Reprod Sci* 80: 81-90.

Baird DT. (1992). Luteotrophic control of the corpus luteum. *Anim Reprod Sci* 28: 95-102.

Barrett DMW, Bartlewski PM, Batista-Arteaga M, Symington A, Rawlings NC. (2004). Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to a single dose of 500 IU of eCG following a 12-day treatment with progestogen-releasing intravaginal sponges in the breeding and nonbreeding seasons in ewes. *Theriogenology* 61: 311-327.

Baruselli PS, Reis E, Marques M, Nasser LF, Bó GA. (2004). The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. *Amin Reprod Sci* 82-83: 479-486.

Bartolome JA, Perez Wallace S, de la Sota RL, Thatcher WW. (2012). The effect of administering equine chorionic gonadotropin (eCG) and human chorionic gonadotropin (hCG) post artificial insemination on fertility of lactating dairy cows. *Theriogenology* 78: 1110-1116.

Basiouni GF. (2006). The Effect of GnRH Agonist (Buserelin) Treatment of Awasi Ewes on Day 12 Post-mating on Plasma Oestradiol Concentrations. *Pakistan J Biol Sci* 9: 201-204.

Bazer F, Ott T, Spencer T. (1998). Maternal recognition of pregnancy: comparative aspects. *Trophoblast Research* 12: 375-386.

Beard AP, Lamming GE. (1994). Oestradiol concentration and the development of the uterine oxytocin receptor and oxytocin-induced PGF₂ release in ewes. *J Reprod Fertil* 100: 469-475.

Beck NFG, Peters AR, Williams SP. (1994). The effect of GnRH agonist (buserelin) treatment on day 12 post mating on the reproductive performance of ewes. *Anim Prod* 58: 243-247.

Beck NFG, Jones M, Davies B, Mann GE, Peters AR. (1996). The effect of GnRH analogue (buserelin) treatment on day 12 post mating on ovarian structures and plasma progesterone and oestradiol-17 β concentrations in ewes. *Anim Sci* 63: 407-412

Binelli M, Thatcher WW, Mattos R, Baruselli PS. (2001). Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. *Theriogenology* 56 (9):1451-63.

Bó G, Cutaia L, Peres L, Pincinato D, Maraña D, Baruselli P. (2007). Technologies for fixed-time artificial insemination and their influence on reproductive performance of *Bos indicus* cattle. *Reprod Dom Rum* 5: 223-236.

Bridges P, Wright D, Bufond W, Ahmad N, Hernandez Fonseca H, McCormick M, Schrick F, Dailey R, Lewis P, Inskeep E. (2000). Ability of induced corpora lutea to maintain pregnancy in beef cows. *J Anim Sci* 78: 2942-2949.

Campanile G, Di Palo R, Neglia G, Vecchio D, Gasparrini B, Prandi A, Galiero MJ, D'Occhio MJ. (2007). Corpus luteum function and embryonic mortality in buffaloes treated with a GnRH agonist, hCG and progesterone. *Theriogenology* 67: 1393-1398.

Campbell BK, Kendall NR, Baird DT (2007). The effect of the presence and pattern of luteinizing hormone stimulation on ovulatory follicle development in sheep. *Biol Reprod* 76: 719-727.

Castilho ACS, Nogueira MFG, Fontes PK, Machado MF, Satrapa RA, Razza EM, Barros L. (2014). Ovarian superstimulation using FSH combined with equine chorionic gonadotropin (eCG) upregulates mRNA-encoding proteins involved with LH receptor intracellular signaling in granulosa cells from Nelore cows. *Theriogenology* 82(9): 1199-1205.

Catalano R, Teruela M, González C, Williams S, Videla Dornac I, Callejas S. (2015). Reproductive performance of ewe lambs in non-breeding season exposed to hCG at day 12 post mating. *Small Rum Res* 124: 63-67.

Chenault JR, Kratzer DD, Rzepkowski RA, Goodwin MC. (1990). LH and FSH response of Holstein heifers to fertirilin acetate, gonadorelin and buserelin. *Theriogenology* 34: 81-98.

Cole HH, Hart GH. (1930). The potency of blood serum of mares in progressive stages of pregnancy in affecting the sexual maturity of the immature rat. *Am J*

Physiol 93: 57.

Cole HH. (1975). Studies on reproduction with emphasis on gonadotropins, antagonotropins. *Biol Reprod* 12: 194-211.

Coleson MPT, Sanchez NS, Ashley AK, Ross TT, Ryan LA. (2015). Human chorionic gonadotropin increases serum progesterone, number of corpora lutea and angiogenic factors in pregnant sheep. *Reproduction* 150: 43–52.

Diskin MG, Morris DG. (2008). Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reprod Dom Anim* 43 (2): 260-267.

Diskin MG, Parr MH, Morris DG. (2011). Embryo death in cattle: an update. *Reproduction Fertil Dev* 24(1): 244-251.

Dixon AB, Knights M, Winkler JL, Marsh DJ, Pate JL, Wilson M E, Dailey RA, Seidel G, Inskeep EK. (2007). Patterns of late embryonic and fetal mortality and association with several factors in sheep. *J Anim Sci* 85(5): 1274-1284.

Fabian D, Koppel J, Maddox-Hyttel P. (2005). Apoptotic processes during mammalian preimplantation development. *Theriogenology* 64 (2): 221-31.

Farin CE, Moeller, CL, Mayan H, Gamboni F, Sawyer HR, Niswender G. (1988). Effect of luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin on cell populations in the ovine corpus luteum. *Biol Reprod* 38 (2): 413-421.

Fukui Y, Itagaki R, Ishida N, Okada M. (2001). Effect of Different hCG Treatments on Fertility of Estrus-Induced and Artificially Inseminated Ewes During the Non-Breeding Season. *J Reprod Dev* 47 (4): 189-195.

Garrett JE, Geisert RD, Zavy MT, Morgan GL. (1988). Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. *J Reprod Fertil* 84: 437-446.

Guillomot M, Flechon JE, Wintenberger-Torres S. (1981). Conceptus attachment in the ewe: an ultrastructural study. *Placenta* 2: 169-182.

Guillomot M, Michel C, Gaye P Charlier N, Trojan J, Martal J. (1990). Cellular localization of an embryonic interferon, ovine trophoblastin and its mRNA in sheep embryos during early pregnancy. *Biol Cell* 68: 205-211.

Ginther OJ, Kot K. (1994). Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. *Theriogenology* 42: 987-1001.

Ginther OJ, Wiltbank MC, Fricke PM, Gibbons JR, Kot K. (1996). Selection of the Dominant Follicle in Cattle. *Biol Reprod* 55: 1187-1194.

- Giordano JO, Kalantari AS, Fricke PM, Wiltbank MC, Cabrera VE. (2012). A daily herd Markov chain model to study the reproductive and economic impact of reproductive programs combining timed artificial insemination and estrus detection. *J Dairy Sci* 95: 5442-5460.
- Gray CA, Burghardt RC, Johnson GA, Bazer FW, Spencer TE. (2002). Evidence that absence of endometrial glands secretions in uterine gland knockout ewes compromises conceptus survival and elongation. *Reproduction* 124: 289-300.
- Gjorret J, Knijn HM, Dieleman S, Avery B, Larsson L, Hyttel P. (2003). Chronology of apoptosis in bovine embryos produced in vivo and in vitro. *Biol Reprod* 69: 1193-1200.
- Hashem NM, El-Azrak KM, Nour El-Din ANM, Taha TA, Salem MH. (2015). Effect of GnRH treatment on ovarian activity and reproductive performance of low-prolific Rahmani ewes *Theriogenology* 83: 192–198.
- Inskeep EK, Dailey RA. (2004). Embryonic mortality in cattle. *Vet Clin Food Anim* 21: 437-461.
- Inskeep EK. (2007). Patterns of late embryonic and fetal mortality and association with several factors in sheep. *J Anim Sci* 85:1274-1284.
- Johnson SK, Dailey RA, Inskeep EK, Lewis PE. (1996). Effect of peripheral concentrations of progesterone on follicular growth and fertility in ewes. *Dom Anim End* 13 (1): 69-79.
- Kastelic JP, Bergfelt DR, Ginther OJ. (1990). Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. *Theriogenology* 33 (6): 1269-1278.
- Kerbler TL, Buhr MM, Jordan LT, Leslie KE, Walton JS. (1997). Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-tau synthesis by conceptus in cattle. *Theriogenology*; 47: 703-714.
- Khan TH, Beck NFG, Khalid M. (2007). The effects of GnRH analogue (buserelin) or hCG (Chorulon) on Day 12 of pregnancy on ovarian function plasma hormone concentrations conceptus growth and placentation in ewes and ewe lambs. *Anim Reprod Sci* 102: 247-257.
- Khan TH, Beck NGF, Khalid M. (2009). The effect of hCG treatment on Day 12 post-mating on ovarian function and reproductive performance of ewes and ewe lambs. *Anim Reprod Sci* 116: 162–168.
- Lonergan P, Forde N. (2014) Maternal-embryo interaction leading up to the initiation of implantation of pregnancy in cattle. *Animal* 8: 64–69.

Mann GE, Fray M, Lamming GE. (2006). Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon-t production in the cow. *Vet J* 171: 500-503.

Mann GE, Lamming GE. (2001). Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction* 121(1):175-180.

Manns JG, Niswender GD, Braden T. (1984). FSH receptors in the bovine corpus luteum. *Theriogenology*, 22 (4):321-328.

Martinuk SD, Manning AW, Black WD, Murphy BD. (1991). Effects of carbohydrates on the pharmacokinetics and biological activity of equine chorionic gonadotropin in vivo. *Biol Reprod* 45: 598-604.

Mc Intosh, J.E.A., Moor, R.M., Allen, W.R., (1975). Pregnant Mare Serum Gonadotropins: rate of clearance from circulation of sheep. *J. Reprod. Fert.*; 44: 95-100.

Meikle, A., Tasende, C., Rodriguez, M., Garófalo, E.G. (1997). Effects of estradiol and progesterone on the reproductive tract and on uterine sex receptors in female lambs. *Theriogenology*; 48: 1105-1113.

Menchaca A, Rubianes E. (2004). New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reprod Fert Dev* 16: 403-414.

Menchaca A, Rubianes E. (2007). Pregnancy Rate Obtained with Short-term protocol for Timed Artificial Insemination in Goats. *Reprod Dom Anim* 42: 590-593

Moore WT, Ward DN. (1980). Pregnant mare serum gonadotropin: rapid chromatographic procedures for the purification of intact hormone and isolation of subunits. *J Biol Chem* 255:6923-6929.

Murphy, B.D., Marinuk, S.D. (1991). Equine chorionic gonadotropin. *Endocr. Rev.*; 12: 27-44.

Murphy BD. (2012). Equine chorionic gonadotropin: an enigmatic but essential tool. *Anim Reprod* 9 (3): 223-230.

Nephew, K.P., McClure, K.E., Ott, T.L., Dubois, D.H., Bazer, F.W., Pope, W.F. (1991). Relationship between variation in conceptus development and differences in estrous cycle duration in ewes. *Biol. Reprod.*; 44: 536.

Nephew KP, C'ardenas H, McClure KE, Ott TL, Bazer FW, Pope WF. (1994). Effects of administration of human gonadotropin or progesterone before maternal recognition of pregnancy on blastocyst development and pregnancy in sheep. *J. Anim. Sci.* 72: 453-458.

Newcombe P., Peters AR. (2014). The Buserelin Enigma; How Does Treatment with

this GnRH Analogue Decrease Embryo Mortality? J Veterinar Sci Technolo 5:1.

Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson, MK, McIntush, EW. (2000). Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiological Reviews* 80 (1): 1-29.

Niswender GD. (2002). Molecular control of luteal secretion of progesterone. *Reproduction* 123: 333-339.

Núñez-Olivera R, de Castro T, Cutaia L, Bó G, Menchaca A, (2018). Equine chorionic gonadotrophin (eCG) administration after insemination affects luteal function and pregnancy establishment in postpartum anestrous beef cows. *Dom Anim End.* 62: 24-31.

Olfati A, Moghaddam GH. (2013). Effects of GnRH agonist (CinnaRelin) on Reproductive Performance in Synchronized Iranian Crossbred Ewes during the Breeding Season. *J Anim Sci* 46 (1): 1-6.

Ott TL, Mirando MA, Davis MA, Fliss MFV, Bazer FW (1989). Characterization of a second period of immunoreactive ovine trophoblast protein-one secretion in sheep. *J Anim Sci* 67:370.

Ott TL, Wiley AA, Spencer TE, Bartol FF, Bazer FW. (1995). Uterine expression of interferon-induced Mx in cyclic and pregnant ewes. *Biol Reprod* 52: 143.

Peters AR, Drew SB, Mann GE, Lamming GE, Beck NF. (1992). Experimental and practical approaches to the establishment and maintenance of pregnancy. *J Physiol Pharmacol* 43: 143-152.

Pierce J, Parsons T. (1981). Glycoprotein hormones: structure and function. *An Rev Biochem* 50: 465-495.

Pritchard JY, Schrick FN, Inskeep EK. (1994). Relationship of pregnancy rate to peripheral concentrations of progesterone and estradiol in beef cows. *Theriogenology* 42: 247-259.

Parr RA, Davis IF, Fairclough RJ, Miles MA. (1987). Overfeeding during early pregnancy reduces peripheral progesterone concentrations and pregnancy rate in sheep. *J Reprod Fertil* 80: 317-320.

Quinlivan TD, Martin CA, Taylor WB, Cairney IM. (1966). Estimates of pre- and perinatal mortality in the New Zealand Romney Marsh ewe. *J Reprod Fertil* 11: 379-390.

Roberts RM, Bazer FW. (1988). The functions of uterine secretions. *J of Reprod Fertil* 82: 875-892.

Rostami B, Hajizadeh R, Hossein M, Aliyari D. (2016). The effect of post-mating hCG or progesterone administration on reproductive performance of Afshari ×

Booroola-Merino crossbred ewes. *Trop Anim Health Prod* 16: 1183-1186.

Salgado C. (2013). Ateneo de la Investigación y Desarrollo de la Producción Ovina, 30-31 Mayo, Cerro Colorado, SUL, P-30.

Sartori R, Bastos MR, Wiltbank MC. (2010). Factors affecting fertilisation and early embryo quality in single- and superovulated dairy cattle. *Reprod Fertil Dev* 22: 151-158.

Scaramuzzi RJ, Baird DT, Campbell BK, Driancourt MA, Dupont J, Fortune JE, Gilchrist RB, Martin GB, McNatty KP, McNeilly AS, Monget JP, Monniaux D, Viñoles C, Webb R. (2011). Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. *Reprod Fertil Dev* 23:444–467.

Schams D, Menzer C, Schallenberger E, Hoffmann B, Hahn J, Hahn R. (1978). Some studies on pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG) and on endocrine responses after application for superovulation in cattle. *Control Reprod Cow*: 122-143.

Silvia WJ, Lewis GS, McCracken JA, Thatcher WW, Wilson L. (1991). Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin F₂alpha during luteolysis in ruminants. *Biol Reprod* 45: 655-663.

Smith PL, Bousfield GR, Kumar S, Fiete D, Baenziger JU. (1993). Equine lutropin and chorionic gonadotropin bear oligosaccharides terminating with SO₄-4-GalNAc and Sia alpha 2,3-Gal, respectively. *J Biol Chem* 268:795-802.

Soumano K, Silversides DW, Doizé F, Price CA. (1996). Follicular 3β-hydroxysteroid dehydrogenase and cytochromes P450 17α hydroxylase and aromatase messenger ribonucleic acids in cattle undergoing superovulation. *Biol Reprod* 55 (6): 1419-1426.

Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC. (2004). Implantation mechanisms: insights from the sheep. *Reproduction* 128: 657-668.

Stata Statistical Software: Release 13, StataCorp LP, College Station, TX. (2013).

Stata Statistical Software: Release 13, StataCorp LP, College Station, TX. (2015).

Stevenson JS, Tiffany SM, Inskeep EK. (2008). Maintenance of pregnancy in dairy cattle after treatment with human chorionic gonadotropin or gonadotropin-releasing hormone. *J Dairy Sci* 91; 3092-3101.

Stewart F, Allen WR. (1981). Biological functions and receptor binding activities of equine chorionic gonadotropins. *J Reprod Fertil* 62: 527-536.

Szenci O, Taka'cs E, Sulon J, de Sousa NM. (2006). Jean-Francois Evaluation of GnRH treatment 12 days after AI in the reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology* 66: 1811-1815.

Thatcher WW, Macmillan KL, Hansen PJ, Drost M. (1989). Concepts for regulation of corpus luteum function by the conceptus and ovarian follicles to improve fertility. *Theriogenology* 31: 149-164.

Thatcher WW, Staples CR, Danet-Desnoyers G, Oldick B, Schmitt EP. (1994). Embryo health and mortality in sheep and cattle. *J Anim Sci* 72 (3): 16-30.

Vallet JL, McNeel AK, Johnson G, Bazer FW. (2013). Triennial reproduction symposium: limitations in uterine and conceptus physiology that lead to fetal losses. *J Anim Sci* 91:3030-3040.

Vilariño M, Rubianes E, Menchaca A. (2013). Ovarian responses and pregnancy rate with previously used intravaginal progesterone releasing devices for fixed-time artificial insemination in sheep. *Theriogenology* 79(1): 206-210.

Wallace LD, Breiner CA, Breiner RA, Spell AR, Carter JA, Lamb GC, Stevenson JC. (2011). Administration of human chorionic gonadotropin at embryo transfer induced ovulation of the first wave dominant follicle, and increased progesterone and transfer pregnancy rates. *Theriogenology* 75: 1506-1515.

Warnick AC, Hansen PJ. (2010). Comparison of ovulation, fertilization and embryonic survival in low-fertility beef cows compared to fertile females. *Theriogenology* 73(9): 1306-1310.

Wiltbank MC, Baez GM, Garcia-Guerra A, Toledo MZ, Monteiro PLJ, Melo LF, Ochoa JC, Santos JEP, Sartori R. (2016). Pivotal periods for pregnancy loss during the first trimester of gestation in lactating dairy cows. *Theriogenology* 86: 239-253.

Wintenberger-Torrés S, Fléchon JE. (1974). Ultrastructural evolution of the trophoblast cells of the pre-implantation sheep blastocyst from day 8 to day 18. *J Anat* 118(1):143-153.