



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

REUTILIZACIÓN DE CIDR CON DIFERENTES DÍAS DE PERMANENCIA Y DOSIS DE eCG PARA LA SINCRONIZACIÓN DE ESTROS EN OVEJAS PRIMALAS

YAINA IVANOVA RODRÍGUEZ SÁNCHEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2019

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe Yaina Ivanova Rodríguez Sánchez, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del profesor María Teresa Sánchez Torres Esqueda, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis REUTILIZACIÓN DE CIDR CON DIFERENTES DÍAS DE PERMANENCIA Y DOSIS DE eCG PARA LA SINCRONIZACIÓN DE ESTROS EN OVEJAS PRIMALAS y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejo o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. De México, a 8 de noviembre de 2019



Firma del
Alumno (a)



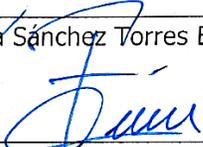
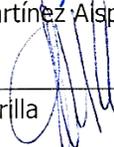
Dra. María Teresa Sánchez Torres Esqueda

Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: **REUTILIZACIÓN DE CIDR CON DIFERENTES DÍAS DE PERMANENCIA Y DOSIS DE eCG PARA LA SINCRONIZACIÓN DE ESTROS EN OVEJAS PRIMALAS**, realizada por la alumna: **Yaina Ivanova Rodríguez Sánchez**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobado por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO (A)	 _____ Dra. María Teresa Sánchez Torres Esqueda
ASESOR (A)	 _____ Dr. José Luis Figueroa Velasco
ASESOR (A)	 _____ Dr. José Alfredo Martínez Aispuro
ASESOR (A)	 _____ Dr. José Cortés Zorrilla

Montecillos, Texcoco, Estado de México, noviembre de 2019

REUTILIZACIÓN DE CIDR CON DIFERENTES DÍAS DE PERMANENCIA Y DOSIS DE eCG PARA LA SINCRONIZACIÓN DE ESTROS EN OVEJAS PRIMALAS

Yaina Ivanova Rodríguez Sánchez, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2019

RESUMEN

Se evaluó el efecto de la reutilización de un dispositivo intravaginal liberador de progesterona (CIDR®, primer uso de 11 días) en dos periodos de permanencia (9 o 12 días) y dos dosis de eCG (200 UI o 300 UI) sobre las principales variables reproductivas y concentración de progesterona. Se utilizaron 64 ovejas primaras distribuidas aleatoriamente en cuatro tratamientos (n=16/grupo): CIDR9+eCG200, CIDR9+eCG300, CIDR12+eCG200 y CIDR12+eCG300. La eCG se aplicó al retiro del dispositivo de manera intramuscular. El diseño fue completamente al azar con un arreglo factorial 2x2; se realizó una comparación de medias con la prueba de Tukey ($P > 0.05$). Los resultados fueron analizados mediante el paquete estadístico SAS. La presentación del estro no fue diferente entre tratamientos ($P = 0.285$), sin embargo, con la dosis de 200 UI de eCG se obtuvo el 100%. Las variables inicio del estro, duración del estro, porcentaje de gestación y retorno al estro no difirieron entre tratamientos ($P > 0.05$) con respecto a la duración del CIDR reutilizado (9 o 12 días) o la dosis de eCG (200 o 300 UI). La concentración de progesterona en suero fue mayor ($P < 0.05$) en ovejas con el tratamiento CIDR12+eCG300. El índice de prolificidad del tratamiento CIDR12+eCG300 fue el más alto (1.44) y diferente ($P = 0.001$) de los tratamientos CIDR9+eCG200 (1.21) y CIDR9+eCG300 (1.20), sin presentar diferencias con el grupo CIDR12+eCG200 (1.31). En los partos dobles, el tratamiento CIDR12+eCG300 obtuvo el mayor índice ($P = 0.001$) con 43.75% y el menor valor fue de 21.43% con el tratamiento CIDR9+eCG200, sin diferencias entre el último mencionado y los grupos CIDR9+eCG300 y CIDR12+eCG200 (26.66 y 37.50%, respectivamente). Los resultados indican que el uso del dispositivo CIDR por segunda vez es eficaz para sincronizar el estro en ovejas primaras obteniendo mejor fertilidad con la inserción del dispositivo durante 12 días y 300 UI de eCG.

Palabras clave: dispositivo progesterona, gonadotropina, protocolo de sincronización.

CIDR REUSE WITH DIFFERENT DAYS OF PERMANENCE AND DOSES OF eCG FOR OESTROUS SYNCHRONIZATION IN PRIMAL EWES

Yaina Ivanova Rodríguez Sánchez, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2019

ABSTRACT

We evaluated the effect the reuse of an intravaginal progesterone-releasing device (CIDR[®], first use of 11 days), in two periods of permanence (9 or 12 d) and two doses of eCG (200 or 300 IU) on the main reproductive variables and progesterone (P₄) concentration. Sixty-four primal ewes randomly distributed in four treatments (n=16/group) were used: CIDR9+eCG200, CIDR9+eCG300, CIDR12+eCG200 y CIDR12+eCG300. The eCG was applied intramuscularly at device withdrawal. The design was completely randomized with a 2x2 factorial arrangement; the comparison of means was through Tukey test. The results were analyzed using the statistical SAS program. Oestrus presentation was not different between treatments ($P = 0.285$), however, with the dose of 200 IU of eCG, 100% of oestrus was obtained. Variables onset and duration of oestrus, percentage of gestation and return to oestrus were not different between treatments ($P>0.05$) with respect to the duration of the reused CIDR (9 or 12 d) or dose of eCG (200 or 300 IU). Progesterone concentration in serum was greater ($P<0.05$) in ewes of the CIDR12+eCG300. The prolificacy index was the highest (1.44) with the CIDR12+eCG300 treatment and was different ($P=0.001$) to the treatments CIDR9+eCG200 (1.21) and CIDR9+eCG300 (1.20), but not different from the CIDR12+eCG200 group (1.31). For the twinning birth, treatment CIDR12+eCG300 showed the highest rate ($P=0.001$), with 45.75% and the lowest value was 21.43%, for the CIDR9+eCG200 treatment, with no differences between the last mentioned and the CIDR9+eCG300 and CIDR12+eCG200 groups (26.66% and 37.50%, respectively). The results indicate that the reuse of CIDR device for a second time is able to synchronize oestrus in primal ewes obtaining better fertility with the permanence of the device for 12 days and 300 IU of eCG.

Key words: Gonadotropin, progesterone device, protocol of synchronization.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por el apoyo económico brindado durante los dos años de mis estudios y el apoyo para la realización del presente trabajo de investigación.

Al **Colegio de Postgraduados**, especialmente a la Especialidad de Ganadería, por darme la oportunidad de formarme a nivel profesional, científico y personal dentro de sus instalaciones.

A la **Dra. María Teresa Sánchez-Torres Esqueda**, por compartir sus conocimientos y sembrar en mí el interés en la investigación científica; por su apoyo, confianza, paciencia y amistad brindada durante mis estudios de maestría.

Al **M.V.Z José Luis Cordero Mora**, por su apoyo, paciencia y consejos que me otorgó para que el presente trabajo se realizara de manera exitosa.

A los Doctores: **José Luis Figueroa Velasco, Alfredo Martínez Aispuro, José Cortés Zorrilla**, integrantes de mi consejo particular, por su apoyo, consejos y seguimiento en la revisión y elaboración del presente trabajo de investigación y por formar parte de mi formación profesional.

Al **Biol. Mario Cárdenas**, por el apoyo otorgado en la investigación con la determinación de los niveles séricos de progesterona en sangre realizados en el Laboratorio de Hormonas Proteicas del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán.

A mis compañeros y amigos: **José Luis Díaz, Susana López, Mayra Lozano, Sofía Rincón, Israel Martínez, Mariam Vázquez, Salvador Espinosa, Nancy Munivez, Adriana Radilla y Janet López** por brindarme su amistad, apoyo y consejos profesionales.

DEDICATORIA

A mi hija **Natalia Lira** que día a día es mi mayor motivación y aliciente para superar cualquier reto que se presente en mi vida personal y profesional.

A mi familia

A mi madre Olympia Rodríguez que con su amor, dedicación y sacrificio me ha brindado la oportunidad de tener una educación digna para ser una mujer de éxito.

A mi hermano Brandon Juárez que hemos compartido buenos momentos en compañía de la familia pero también en los malos momentos nos hemos apoyado mutuamente.

A mis profesores

Por su pasión, dedicación y compromiso por el conocimiento científico que me han transmitido el deseo de aprender cada día más, con el propósito de compartirlo con la comunidad y ser partícipe del desarrollo de mi país.

CONTENIDO

RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE CUADROS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Panorama de la ovinocultura	3
2.1.1 Ovinocultura mundial	3
2.1.2 Ovinocultura en México	3
2.2 Características reproductivas de la oveja	5
2.2.1 Estacionalidad	5
2.2.2 Actividad reproductiva (estro y ciclo estral).....	7
2.2.3 Fases del ciclo estral	7
2.2.3.1 Fase lútea.....	7
2.2.3.2 Fase folicular	8
2.2.4 Foliculogénesis	8
2.2.5 Endocrinología de la foliculogénesis.....	9
2.2.5.1 Hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH).....	9
2.2.5.2 Hormona folículo estimulante (FSH).....	10
2.2.5.3 Hormona luteinizante (LH).....	11
2.2.5.4 Estrógenos	12
2.2.5.5 Progesterona (P4)	13
2.2.5.6 Prostaglandina F2 α	14
2.2.6 Ovulación.....	15
2.2.7 Formación del cuerpo lúteo	16
2.2.8 Luteólisis.....	16
2.3 Uso de progestágenos en la reproducción ovina	18
2.3.1 Sincronización del estro en ovejas con progestágenos	18
2.3.2 Efecto fisiológico de los progestágenos sobre la sincronización del estro en ovejas	19

2.3.3	Modificación en el entorno vaginal ovino durante el uso de dispositivos con progestágenos	19
2.3.4	Uso del dispositivo CIDR en los protocolos de sincronización del estro en ovejas	21
2.3.5	Utilización de Gonadotropina coriónica equina (eCG) para la sincronización.....	22
2.3.6	Combinación del tratamiento con progestágenos más la aplicación de eCG	24
2.3.7	Tipo de dispositivo utilizado (CIDR o esponjas) más la aplicación de eCG	26
2.4	Uso de CIDR reutilizados en la sincronización del estro en ovejas	28
2.4.1	Reutilización de los dispositivos CIDR.....	28
2.4.2	Manejo sanitarios de los CIDR reutilizados	29
2.4.3	Potencial de reutilización del CIDR.....	30
2.4.4	Reutilización del CIDR en protocolos cortos o largos	34
2.4.5	Reutilización del CIDR en protocolos con monta natural o inseminación artificial	35
III.	OBJETIVOS	36
3.1	General	36
3.2	Específicos.....	36
IV.	HIPÓTESIS.....	37
4.1	Planteamiento del problema	37
V.	JUSTIFICACIÓN.....	38
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
6.1	Descripción del lugar de estudio	39
6.2	Animales y alimentación	39
6.3	Manejo de los dispositivos CIDR.....	39
6.4	Tratamientos	40
6.5	Sincronización del estro	40
6.6	Detección de estros, retorno al estro y diagnóstico de gestación	40
6.7	Muestreo sanguíneo	41
6.8	Análisis hormonal.....	41
6.9	Variables de respuesta	41
6.10	Análisis estadístico.....	42

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
7.1 Presentación del estro	44
7.2 Tiempo y duración del estro	45
7.3 Concentración de progesterona (P ₄) en ovejas primaras	46
7.4 Porcentaje de gestación, retorno al estro e índice de prolificidad	48
7.5 Tipos de partos en ovejas primaras.....	50
VIII. CONCLUSIONES	50
IX. LITERATURA CITADA.....	51
ANEXOS	66

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Principales Estados de la República Mexicana con la mayor población de ovinos (cabezas de ganado).	4
Cuadro 2. Variables reproductivas en ovejas primaras tratadas con CIDR reutilizado (9 o 12 días de permanencia) y eCG (200 o 300 UI) al retiro del dispositivo.	45

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Principales Estados de la República Mexicana productores de carne ovina..... 4
- Figura 2.** Protocolo experimental de sincronización de estros en ovejas primaras con CIDR reutilizado más la aplicación de eCG al retiro del dispositivo ... 41
- Figura 3.** Concentración promedio de progesterona desde la colocación del CIDR reutilizado hasta su retiro y el ciclo estral posterior en ovejas primaras..... 47

LISTA DE ABREVIATURAS

CIDR: Dispositivo intravaginal de liberación controlada de progesterona

CL: Cuerpo lúteo

DICO: Nuevo dispositivo liberador de progesterona

E₂: Estradiol

eCG: Gonadotropina coriónica equina

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

FSH: Hormona folículo estimulante

g: gramos

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas

GPCR: Receptores acoplados a proteínas G

IA: Inseminación artificial

IAL: Inseminación artificial por laparoscopia

IATF: Inseminación artificial a tiempo fijo

INT_T: interferón tau

KISS: Kisspeptina

LH: Hormona luteinizante

mL: Mililitros

mm: Milímetros

mmHg: Milímetro de mercurio

ng: Nanogramos

OCDE: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico

P₄: Progesterona

PC: Proteína cruda

pg: Picogramos

PGF_{2α}: Prostaglandina F_{2α}

pH: Potencial de hidrógeno

PRL: Prolactina

RIA: Radioinmunoanálisis

SAGARPA: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación

SIAP: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera

SNC: Sistema Nervioso Central

TSH: Hormona estimulante de la tiroides

UI: Unidades Internacionales

3βHSD: 3β-hidroxiesteroide deshidrogenas

I. INTRODUCCIÓN

Para mejorar la rentabilidad de la cría intensiva de ovinos se requiere aumentar la eficiencia reproductiva mediante el incremento de la fertilidad, la prolificidad y la frecuencia de partos. La estacionalidad reproductiva en ovejas es un factor limitante para alcanzar el objetivo global de obtener tres partos en dos años (Rosa y Bryant, 2003), por lo que se estudian diferentes estrategias reproductivas, incluyendo: el tratamiento con hormonas exógenas como las prostaglandinas, gonadotropinas, progesterona o sus análogos sintéticos e implantes de melatonina y combinaciones de todo lo anterior, con resultados variables en el éxito reproductivo (Abecia *et al.*, 2011), los cuales inducen y sincronizan la ovulación y el estro tanto en época reproductiva, en transición reproductiva y en anestro (Abecia *et al.*, 2012; Laven, 2019).

Existen dispositivos intravaginales de liberación controlada (CIDR) de progesterona (P₄) natural que estimulan la inducción y sincronización del estro cuando estos permanecen *in situ* durante un periodo prolongado (12 a 14 días) en ovejas (Wheaton *et al.*, 1993; Escobar *et al.*, 2017; Menchaca *et al.*, 2017), lo que incrementa el porcentaje de animales en estro, pero con resultados variables en la fertilidad (Menchaca y Rubianes, 2004). La prolongación de la exposición de P₄ en protocolos hormonales generalmente aumenta el diámetro del folículo ovulatorio, pero disminuye el número de folículos ovulatorios y en consecuencia, reduce el porcentaje de ovulación (Bartlewski *et al.*, 2017). Para disminuir los efectos negativos de los protocolos largos se evalúa la efectividad reproductiva con protocolos de duración media (8 a 10 días) y cortos (5 a 7 días) cuando se utilizan dispositivos intravaginales para sincronizar el estro en las ovejas (Swelum *et al.*, 2016; Swelum *et al.*, 2018a; Martínez-Ros *et al.*, 2019b).

En el tratamiento con CIDR se recomienda aplicar una cantidad suficiente de gonadotropina para detonar los eventos preovulatorios, por lo que al retiro del progestágeno se inyecta hormona gonadotropina coriónica equina (eCG), la cual tiene funciones similares a la hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante

(LH) (Murphy, 2012; Martínez-Ros *et al.*, 2019a). La aplicación de eCG después de retirar el CIDR durante un tratamiento corto o largo asegura la ocurrencia de ovulaciones fértiles (Martínez-Ros *et al.*, 2019b), reduce el intervalo entre el estro y la ovulación y aumenta el diámetro del cuerpo lúteo (Cox *et al.*, 2012). Generalmente las dosis de eCG recomendadas varían entre 250-500 UI (Barret *et al.*, 2004), lo que depende del peso, la edad (250-300 UI en ovejas jóvenes, 350-500 UI en ovejas adultas), la temporada (400-500 IU en anestro, 300-500 IU en ovejas cíclicas) y la raza (dosis más bajas en razas prolíficas) (Abecia *et al.*, 2011).

Los dispositivos CIDR son efectivos para inducir y sincronizar el celo en las ovejas; sin embargo, tienen un costo elevado y su desecho después del primer uso provoca la contaminación ambiental debido a la cantidad residual hormonal que aún contienen (Rathbone *et al.*, 2002). Por tal motivo, se realizan investigaciones orientadas a determinar la eficiencia reproductiva de la reutilización de los CIDR en ovejas en anestro y en época reproductiva (Güngör *et al.*, 2009; Pinna *et al.*, 2012; Swelum *et al.*, 2018b). Así mismo, se evalúa su uso en protocolos cortos (Cox *et al.*, 2012; Bazzan *et al.*, 2013; Vilariño *et al.*, 2013) hasta por seis veces (Da Silva *et al.*, 2014; Swelum *et al.*, 2018b) encontrándose efectividad con dispositivos de segundo o tercer uso principalmente cuando se combinan con eCG. No obstante, no hay consenso en la literatura de que los protocolos cortos de sincronización con progestágenos mejoren el porcentaje de gestación cuando se comparan con protocolos largos. Por ejemplo, Blaschi *et al.* (2014) obtuvieron alto porcentaje de gestación con protocolos largos (83.3%, 14 días) comparado con protocolos cortos (47.8%, 5 días) y de una duración media (60%, 9 días); por el contrario, Viñoles *et al.* (2001) reportaron mayor porcentaje de gestación con un protocolo corto (87%, 6 días) comparado con un tratamiento de 12 días (63%).

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la reutilización del dispositivo CIDR durante dos periodos de permanencia (9 o 12) y dos dosis de eCG (200 UI o 300 UI) sobre las principales variables reproductivas y concentración hormonal en ovejas primíparas durante la transición del anestro a época reproductiva.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Panorama de la ovinocultura

2.1.1 Ovinocultura mundial

La ovinocultura es una de las principales actividades pecuarias destinadas a la producción de carne para el consumo humano, así como también para la producción de lana, leche, pieles y abono. Por su disponibilidad de manejo y adaptabilidad, los ovinos se encuentran distribuidos por todos los continentes. Con respecto a la población mundial ovina, África y Asia poseen más del 70% de la población ovina, Europa el 10.77%, Oceanía el 8.47% y América el 7.2% (>87 millones de cabezas) (SAGARPA, 2016). China es el país con la mayor población de ovinos (16.71%) seguido de Australia, India e Irán; y el principal consumidor de carne de cordero con cerca de 4 millones de toneladas al año, lo que representa el 30% del total del consumo mundial (FAO, 2018). Los principales países exportadores de carne ovina son Australia, Nueva Zelanda, Reino Unido, Irlanda y España, los cuales representan el 47% de las exportaciones en el mundo. El consumo mundial per cápita anual de carne de ovino llegará a 2.1 kg en 2026, principalmente aumentará en China y en el Medio Oriente, mientras que en América Latina su consumo se mantendrá sin cambios (OCDE/FAO, 2017).

2.1.2 Ovinocultura en México

De acuerdo con información del Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), la cantidad de cabezas de ganado ovino nacional se ha incrementado de forma continua desde el 2008 con un inventario de 7,757,267 ovinos hasta cifras del 2017 con 8,902,451 ovinos, lo que representa un aumento de cerca del 13%. Seis estados poseen el 49% de la población de ovinos, siendo el Estado de México e Hidalgo los principales productores, con 16 y 14%, respectivamente (Cuadro 1).

Cuadro 1. Principales Estados de la República Mexicana con la mayor población de ovinos (cabezas de ganado).

Estado	Población ovina (2017)
México	1,450,098
Hidalgo	1,215,342
Veracruz	695,507
Oaxaca	521,869
Puebla	505,401

Fuente: Datos tomados del SIAP (2019)

La producción pecuaria nacional de carne de ovino durante el año 2018 fue de 62,939 toneladas de carne en canal; cifra modesta si se compara con otros alimentos de origen animal de mayor consumo, como la res, el pollo y el cerdo. De acuerdo al inventario ganadero de reproducción de febrero de 2019 había en existencia 6,464,784 cabezas de ovinos de los cuales 5,562,040 son vientres, 243,906 son sementales y 658,838 en gestación (SIAP, 2019). Las entidades con mayor producción de carne ovina en canal son el estado de México en primer lugar (9,068 toneladas) seguido de Hidalgo, Veracruz, Zacatecas, Puebla y Jalisco (6,855; 5,388; 4,388; 4,390, toneladas respectivamente; SIAP, 2019) (Figura1).

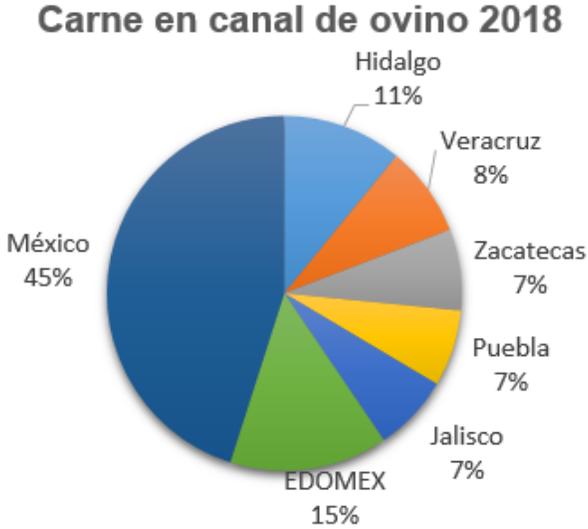


Figura 1. Principales Estados de la República Mexicana productores de carne ovina. Fuente: SIAP (2019).

La proteína cárnica es parte importante de una dieta equilibrada por ser fuente de aminoácidos, vitaminas y minerales esenciales para el desarrollo humano (Pereira y Vicente, 2013). Debido a la demanda mundial y la competencia para satisfacer las demandas del mercado alimentario cada vez en aumento, los técnicos pecuarios y productores ganaderos acentúan la necesidad de optimizar la eficiencia reproductiva al mejorar la rentabilidad de la empresa ovina a través del aumento de las tasas de cría y la producción de carne para mantener una disponibilidad constante de productos durante todo el año (Abecia *et al.*, 2011; Amiridis y Cseh, 2012).

2.2 Características reproductivas de la oveja

2.2.1 Estacionalidad

La mayoría de las razas de ovejas de regiones templadas son poliéstricas estacionales de fotoperiodo corto, es decir, que el periodo ovulatorio inicia en una determinada época del año cuando la duración de la luz del sol es menor, generalmente a finales del verano o principios del otoño y termina a finales del invierno o principios de la primavera. Por otra parte, el periodo anovulatorio abarca desde finales de la primavera hasta mediados del verano con el posterior periodo de transición que comienza a mediados del verano hasta principios del periodo ovulatorio, aunque la variación entre periodos depende de la ubicación geográfica, la raza y la edad de los ovinos (Abecia *et al.*, 2011; Shinomiya *et al.*, 2014). Cabe señalar que en las zonas tropicales, donde hay menor variación en la duración del día, las ovejas tienden a reproducirse todo el año (Goodman e Inskeep, 2006).

La reproducción estacional en ovinos, es una respuesta adaptativa a las fluctuaciones del ambiente, para concentrar la actividad reproductiva durante la época del año donde las condiciones medioambientales y de disponibilidad de alimentos son favorables para la supervivencia de las crías (Correa, 2017). La actividad sexual de las ovejas es estimulada por la disminución del fotoperiodo, el cual determina los perfiles de secreción estacional de hormonas tales como la melatonina, la prolactina (PRL) y las gonadotropinas (Hazlerigg *et al.*, 2004).

La información sobre los cambios en el fotoperiodo es percibida por la retina y transportada a través de múltiples vías neuronales hasta la glándula pineal para producir y secretar niveles rítmicos de melatonina (Pak y Chung, 2011). La síntesis y secreción de la melatonina sigue un ritmo circadiano con altos niveles en la noche y niveles bajos durante el día tanto en sangre como en el fluido cerebroespinal (Simonneaux y Ribelayga, 2003). La variación en la duración de la secreción nocturna de melatonina actúa en el hipotálamo para regular la secreción pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) (Darderte *et al.*, 2016). Otras sustancias reguladoras de la reproducción estacional han sido identificadas, como la hormona tiroidea (Shinomiya *et al.*, 2014) y kisspeptina (KiSS) (Pinilla *et al.*, 2012).

La estacionalidad, por lo tanto, da a lugar una alternancia anual entre dos periodos distintos: una temporada de reproducción, caracterizada por la sucesión a intervalos regulares (media de 17 días) de la conducta de celo y ovulación, y una temporada de anestro, caracterizada por el cese de la actividad sexual. La transición del anestro a la ciclicidad ovárica es gradual, en donde aparecen ciclos cortos debido a que el primer cuerpo lúteo (CL) a menudo sufre regresión prematuramente (de 5 a 6 días después de su formación; Rosa y Bryant, 2003).

Para reducir la estacionalidad, varios estudios se han enfocado en inducir la ovulación durante la época de anestro o tan pronto como sea posible. Los esfuerzos para acelerar el período de transición del anestro hacia la época reproductiva han involucrado el uso del efecto macho, manipulación del fotoperiodo, uso de implantes de melatonina, tratamientos hormonales (progesterona/progestágenos, gonadotropinas y prostaglandinas) y combinaciones de todo lo anterior, con resultados variables en el éxito reproductivo (Abecia *et al.*, 2011). Las técnicas reproductivas exitosas no sólo deben establecer una estrecha sincronía de estros, sino también proporcionar un nivel aceptable de fecundidad por inseminación artificial o monta natural. Cabe mencionar que los protocolos hormonales también se han utilizado en corderas prepuberales al inducir la ovulación para adelantar el primer apareamiento (Abecia *et al.*, 2011).

2.2.2 Actividad reproductiva (estro y ciclo estral)

La actividad reproductiva en las ovejas varía de acuerdo a la raza, la edad, duración del fotoperiodo, cambios estacionales, a la latitud y longitud, condiciones nutricionales, estrés, y factores asociados al macho (Arroyo, 2011; Dobson *et al.*, 2012; Arellano-Lezama *et al.*, 2013; Abecia y Forcada, 2017).

El estro (calor) es el periodo de receptividad sexual en la hembra, el cual se inicia principalmente por el aumento de estrógenos por los folículos maduros justo antes de la ovulación. En promedio la duración del estro dura alrededor de 30 h con un rango de 24 a 48 h en ovejas (Rosales-Torres *et al.*, 2012).

El ciclo estral es el intervalo desde el comienzo de un estro hasta el inicio del siguiente, el cual está relacionado con una secuencia de eventos endocrinos interrelacionados regulados por el hipotálamo (mediante la secreción de GnRH), la hipófisis (secreción de LH y FSH), el folículo (secreta esteroides e inhibina), el cuerpo lúteo (secreta progesterona y oxitocina) y el endometrio uterino (productor de prostaglandinas $F_{2\alpha}$) (Cortez-Romero y Gallegos-Sánchez, 2014). El ciclo estral tiene una duración media de 16.5 a 18.8 días, siendo más corto en corderas comparado con las ovejas adultas. Durante la época reproductiva se pueden presentar de 1 a 20 ciclos estrales consecutivos en la oveja (Rosales-Torres *et al.*, 2012).

2.2.3 Fases del ciclo estral

Para efectos de su estudio, tradicionalmente el ciclo estral en ovejas se divide en fases. Por lo general, se designa el día 0 al momento en que la hembra presenta signos de estro (Atuesta y Diaza, 2011).

2.2.3.1 Fase lútea

La fase lútea inicia después de la ovulación, en promedio 36 h después de iniciado el estro y termina alrededor del día 13 del ciclo (Cortez-Romero y Gallegos-Sánchez, 2014). Se divide en metaestro y diestro. Durante el metaestro se forma una glándula endocrina transitoria llamada cuerpo lúteo a partir de los restos del folículo

ovulado. En el diestro el CL mantiene una producción alta de progesterona (Sangha *et al.*, 2002).

2.2.3.2 Fase folicular

La fase folicular se divide en proestro y estro (Senger, 2003). El proestro, que comprende el periodo que precede al estro conductual, se caracteriza por una disminución en la concentración de progesterona debido a la lisis del cuerpo lúteo lo que provoca la emergencia y el crecimiento del folículo ovulatorio por el cual ocurre un aumento en la concentración de estrógenos (Uribe-Velásquez *et al.*, 2009). Durante el estro, período después del proestro, el estradiol se convierte en la hormona dominante la cual es responsable de los cambios en el comportamiento que favorecen la receptividad sexual y el apareamiento (Norris y Lopez, 2011).

2.2.4 Foliculogénesis

La foliculogénesis en ovejas es un proceso dinámico que ocurre durante el ciclo estral e implica el crecimiento y maduración de los folículos ováricos (Norris y Lopez, 2011). Tal proceso incluye la interacción hormonal entre los ovarios y la hipófisis, señales parácrinas y autócrinas dentro del ovario, así como también la participación de factores de crecimiento (Cortez-Romero y Gallegos-Sánchez, 2014). El desarrollo folicular comienza con el reclutamiento y desarrollo simultáneo de subpoblaciones de folículos con diferente capacidad de respuesta y grado de dependencia a las gonadotropinas hipofisarias, seguido de la formación del folículo maduro (folículo preovulatorio) y termina con la ovulación o la muerte folicular por atresia (Monniaux, 2016). Los ovocitos completamente maduros son los sobrevivientes del largo proceso de selección durante la foliculogénesis, los cuales son capaces de someterse a la fertilización y al desarrollo embrionario, lo que finalmente conduce a la descendencia (Van de Hurk y Zhao, 2005).

2.2.5 Endocrinología de la foliculogénesis

2.2.5.1 Hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH)

La GnRH es un decapeptido (10 aminoácidos) que se produce en el núcleo de las neuronas del hipotálamo tras un estímulo del sistema nervioso central (SNC) (nutrición, estrés, lactancia, presencia de machos, temporada y señales visuales y olfativas) y es transportada por axones terminales a la eminencia mediana, donde permanece almacenada (Morotti *et al.*, 2016). Las células productoras de GnRH se distribuyen por la región supraquiasmática, también en el área preóptica y algunas se encuentran dispersas por el núcleo arcuato del hipotálamo (Nélida, 2000).

La GnRH es liberada en forma pulsátil por neuroterminales de la eminencia media al sistema portal hipofisario, por donde es transportada a la adenohipófisis para interactuar con dos tipos de receptores metabotrópicos (GPCRs rodopsina) situados en las células gonadotropas (Nélida, 2000). La liberación de FSH y de LH depende de los pulsos con los que se libera GnRH desde el hipotálamo, y a su vez del tipo de receptor (I o II) GPCRs rodopsina que se sintetice. Cuando los pulsos de GnRH son de frecuencia lenta se estimula la síntesis de receptores de tipo I que favorecen principalmente la liberación de LH sobre la de FSH, y cuando los pulsos son más frecuentes se sintetizan los receptores de tipo II que inducen predominantemente la secreción de FSH que de LH (Abecia y Forcada, 2010).

La secreción de GnRH es afectada por los esteroides gonadales y los estrógenos, los cuales ejercen control dependiendo del momento del ciclo estral y de su concentración (Squires, 2003). Durante la fase lútea, la progesterona ejerce un efecto de retroalimentación negativa sobre la secreción pulsátil de GnRH y por lo tanto de LH. En cambio, durante la fase folicular, las concentraciones de progesterona basales aumentan la síntesis de estradiol en la circulación periférica la cual ejerce un efecto de retroalimentación positiva que induce el pico preovulatorio de GnRH/LH y 24 horas después la ovulación en ovejas (Arroyo, 2011).

2.2.5.2 Hormona folículo estimulante (FSH)

La FSH es una glicoproteína (210 aminoácidos), compuesta por una subunidad α común a otras glicoproteínas (LH y TSH u hormona estimulante del tiroides) y una subunidad β con especificidad de acción biológica. Es secretada en pulsos desde los gonadotropos de la hipófisis a partir de la estimulación ejercida por la GnRH desde el hipotálamo, pero también, depende de la acción de inhibinas que inhiben su secreción y de activinas que estimulan su secreción (Zarco, 2008). La FSH actúa a nivel ovárico para estimular el desarrollo (reclutamiento y selección), maduración de los folículos, la presentación de ondas foliculares y síntesis de estradiol a partir de precursores androgénicos (Silva-Santos *et al.*, 2016). Por lo tanto, la FSH controla el reclutamiento folicular tanto al inicio de la fase folicular como durante la fase lútea del ciclo estral (Uribe-Velásquez *et al.*, 2009).

El crecimiento de los folículos ováricos en ondas secuenciales a partir de un conjunto de folículos primarios está estrechamente asociado con aumentos periódicos en las concentraciones séricas de la FSH (Baby y Bartlewski, 2011). Los folículos ováricos crecen en un patrón de ondas cada 4 a 5 días y normalmente se presentan de tres a cuatro ondas foliculares por ciclo estral en ovejas (Seekallu *et al.*, 2010). Estos picos de aumentos transitorios en las concentraciones de FSH estimulan la presentación de ondas foliculares (Baby y Bartlewski, 2011). En ovejas se han reportado picos de FSH entre 3 y 4 ng/mL y durante el periodo interovulatorio las concentraciones basales de FSH oscilan en entre 1 y 2 ng/mL (Franco y Uribe-Velásquez, 2012). En los folículos antrales aumenta la dependencia a la FSH para seguir con su desarrollo hasta que un único folículo dominante alcance la maduración final del estado preovulatorio, mientras que la mayoría sufrirá atresia durante el proceso (Abecia y Forcada, 2010). El aumento en la respuesta a la FSH termina al final de la selección folicular, con la expresión y síntesis de receptores de LH en las células de la granulosa (Lenz-Souza *et al.*, 2007).

2.2.5.3 Hormona luteinizante (LH)

La LH es una glicoproteína (204 aminoácidos) compuesta por una subunidad α común y una subunidad β que confiere especificidad a su receptor (Perera-Marín *et al.*, 2007). Es secretada por la glándula pituitaria anterior de manera pulsátil en respuesta a la liberación de GnRH, con una vida media de 23 minutos a dos horas en el suero ovino (Uribe-Velásquez *et al.*, 2010). Participa en la regulación ovárica, en la maduración folicular, la ovulación, el desarrollo y mantenimiento del cuerpo lúteo e interviene en la modificación de la síntesis de hormonas esteroideas, factores de crecimiento y citocinas (Perera-Marín *et al.*, 2007). La activación de los receptores de LH en las células de la teca conduce directamente a la estimulación en la producción de androstenediona, que es el sustrato necesario para la síntesis de estradiol por las células de la granulosa (Khan-Dawood, 2003). La progesterona y el estradiol actúan en conjunto a través de mecanismos de retroalimentación negativa y positiva respectivamente, para regular la frecuencia y la amplitud de los pulsos de LH (Bartlewski *et al.*, 2011). El pico preovulatorio de LH termina la secreción de estradiol (Goodman e Inskeep, 2006).

La concentración de la LH durante la fase folicular va de 0.5 a 5 ng/mL y en la fase lútea de 0.2 a 0.7 ng/mL en ovinos (Franco y Uribe-Velásquez, 2012). En cambio, la concentración del pico preovulatorio de LH varía de 30 ng/ml hasta 184 o 250 ng/ml en ovejas primíparas y adultas (Padilla-Ramírez *et al.*, 1988), e inicia de las 2 a las 6 horas del comienzo del celo o 14 h antes de la ovulación con una duración de 6 a 15 h (Abecia y Forcada, 2010). Se ha reportado la presencia de un pulso cada 1 a 2 h antes del pico de LH y un pulso cada 20 minutos durante el aumento de LH preovulatorio (Rosa y Bryant, 2003). Durante la fase lútea, el número de pulsos de LH baja de 1 pulso cada 3 a 4 horas, debido principalmente a la acción inhibitoria de la progesterona que se encuentra en una concentración elevada (Pérez-Clariget y Almeraya, 2008). En cambio, durante el anestro estacional la LH continúa siendo liberada, episódicamente, pero con menor frecuencia (1 pulso cada 8 a 12 h) (Rosa y Bryant, 2003). Después del pico preovulatorio de LH se inician los procesos que darán lugar a la ovulación y a la luteinización de las células foliculares (Abecia y Forcada, 2010). Posterior a la ovulación se mantiene una secreción tónica de pequeños pulsos

de LH que son necesarios para completar la formación del cuerpo lúteo y estimular la secreción de progesterona (Zarco, 2008).

2.2.5.4 Estrógenos

Bajo la influencia de la LH y la FSH, los folículos ováricos en crecimiento sintetizan y liberan estrógenos, predominantemente 17β -estradiol (E_2), en la circulación general (Norris y Lopez, 2011). Durante el ciclo estral de la oveja, la presentación de ondas foliculares se asocia con el inicio de aumentos transitorios en las concentraciones séricas de E_2 (Bartlewski *et al.*, 2011). Cuando el folículo dominante adquiere un diámetro de 3 a 5 mm, durante la fase folicular (proestro), expresa receptores de LH en las células de la granulosa y de la teca e inicia la producción de inhibina y de estradiol (Franco y Uribe-Velásquez, 2012). Una oleada de LH plasmática ocurre aproximadamente 12 horas después del nivel máximo de estradiol en ovejas (Norris y Lopez, 2011).

En las ovejas durante la fase folicular, en ausencia de progesterona, el estradiol ejerce un efecto de retroalimentación positiva sobre la liberación de GnRH a nivel del hipotálamo medio basal, ya que éste contiene receptores de estrógeno alfa ($ER\alpha$). Sin embargo, el estradiol no afecta directamente a las neuronas de GnRH, por lo que puede actuar indirectamente a través de interneuronas para producir su efecto. Las vías neuronales por las cuales el estradiol controla la liberación de GnRH aún no se comprenden completamente (Bruneau *et al.*, 2014). La secreción de GnRH por su parte provoca el aumento progresivo de LH en plasma hasta alcanzar un pico preovulatorio de amplitud y frecuencia suficiente para estimular la maduración final del folículo y la posterior ovulación (Price y Estienne, 2018). Durante el anestro estacional, el estradiol por el contrario ejerce un efecto de retroalimentación negativa sobre la liberación de LH (Arroyo, 2011).

La síntesis de estradiol comienza en las mitocondrias de las células de la teca de los folículos grandes donde se lleva a cabo la conversión del colesterol a pregnenolona por la enzima P450 ($P450_{scc}$). La pregnenolona sale por difusión hacia el retículo endoplásmico donde es convertida a P_4 por la enzima 3β -hidroxiesteroide

deshidrogenasa (3β HSD). Si la LH se une a sus receptores en las células de la teca se inicia la conversión de P_4 a andrógenos, los cuales se difunden a las células de la granulosa para ser convertidos a estrona y a E_2 por la acción de la enzima aromatasa (Franco y Uribe-Velásquez, 2012).

El pico preovulatorio del estradiol inicia de 12 a 14 h antes del estro a partir de una concentración basal de 5-7 pg/mL, hasta alcanzar valores entre 13 y 16 pg/mL en ovejas. Después del pico de LH, la secreción de estradiol disminuye rápidamente hasta alcanzar valores basales de 2 a 10 h después de iniciado el estro; la elevación de los estrógenos tiene una duración de 16 a 22 h (Franco y Uribe-Velásquez, 2012). Uno de los principales efectos del estradiol es promover la conducta de receptividad sexual (celo) que permitirá que la hembra acepte al macho para que se lleve a cabo el apareamiento y además se preparen a los órganos genitales de la hembra para la cópula y el transporte exitoso de los espermatozoides hacia el oviducto (Zarco, 2008).

2.2.5.5 Progesterona (P_4)

La P_4 es una hormona esteroide que ejerce un efecto de retroalimentación negativa sobre la GnRH al reducir la frecuencia de los pulsos de LH y el pico preovulatorio inducido por E_2 , lo que impide la manifestación del estro y la ovulación (Capallejas, 2009). Sus principales funciones son estimular el cierre del cérvix, bloquear la motilidad uterina, estimular el desarrollo de las glándulas mamarias y promover la proliferación de las células del endometrio para mantener la implantación del embrión y el desarrollo a término del feto (Franco y Uribe-Velásquez, 2012).

Como se había mencionado anteriormente, la síntesis de progesterona comienza con la conversión del colesterol a pregnenolona por el citocromo P450_{scc} en la mitocondria de las células lúteas. Posteriormente, la pregnenolona sale de la mitocondria para ser convertida en progesterona por la enzima 3β HSD (3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa) en el retículo endoplásmico (Orizaba-Chávez *et al.*, 2013). La P_4 es secretada por las células de la granulosa y las luteales aunque también se produce en la placenta al final de la gestación (Bartlewski *et al.*, 2011).

La concentración de P₄ desde el día 0 (estro) hasta los días 6 al 12 del ciclo estral ovino aumentan de 0.5 hasta 5 a 7 ng/mL y posteriormente descienden en los días 13 al 16 hasta 1 a 3 ng/mL (Franco y Uribe-Velásquez, 2012). La disminución de la concentración de P₄ ocasionada por la luteólisis hasta concentraciones casi indetectables permite que la secreción de GnRH deje de ser inhibida para que se pueda inducir un nuevo estro y posteriormente la ovulación (Capallejas, 2009). El aumento inicial de la concentración plasmática de P₄ depende de la cantidad de tejido esteroideogénico y su capacidad de síntesis, lo que está relacionado con el tamaño del CL (Franco y Uribe-Velásquez, 2012). Por otro lado, la producción insuficiente de progesterona por el CL es indicativa de una incapacidad materna para mantener la gestación (Fernandez *et al.*, 2018).

2.2.5.6 Prostaglandina F_{2α}

La prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) es un ácido graso insaturado compuesto por 20 átomos de carbono que está conformado por un anillo ciclopentano, dos cadenas laterales y un grupo oxhidrilo en la posición 9. La PGF_{2α} es secretada por el endometrio mediante el control indirecto del estradiol y la progesterona (Menchaca y Rubianes, 2012). Es sintetizada a través de un proceso llamado “ruta de las ciclooxygenasas” que utilizan como sustrato a los fosfolípidos de la membrana. Los fosfolípidos al hidrolizarse por acción de las fosfolipasas liberan ácido araquidónico, los cuales son convertidos a PGH₂ por las ciclooxygenasas. Posteriormente, la PGH₂ es convertida inmediatamente a PGF_{2α} por medio de la enzima prostaglandina F sintetasa (Atuesta y Diaz, 2011). Su función principal es la de inducir luteólisis en el cuerpo lúteo hacia el final del diestro en rumiantes (Lozano-González *et al.*, 2012), pero también provoca contracciones uterinas que favorecen el transporte de los espermatozoides, la salida del feto por el canal de parto y la involución uterina después del parto (Zarco, 2008).

El aumento de estrógenos estimula la liberación de oxitocina de manera pulsátil desde la neurohipófisis mientras que en el útero influye en el aumento de los receptores endometriales de oxitocina (Weems *et al.*, 2006). La interacción entre la secreción de oxitocina y el aumento de sus receptores en el útero conduce a la secreción de pulsos de PGF_{2α} en el útero (Menchaca y Rubianes, 2012).

Simultáneamente, la $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimula la liberación de oxitocina por parte del cuerpo lúteo. Todos los pulsos de $\text{PGF}_{2\alpha}$ van precedidos de un pulso de oxitocina (Weems *et al.*, 2006); estos pulsos se incrementan entre el día 11 y 13 del ciclo estral ovino (fase lútea tardía), persistiendo los siguientes 2 a 3 días, lo que origina la regresión del CL en ovejas (Zarco, 2008). En las células del útero, la $\text{PGF}_{2\alpha}$ se une a receptores de membrana que activan una proteína G específica lo que desencadena la cascada de calcio (Ca) por medio del fosfatidil inositol (Echeverría, 2006). El intervalo entre pulsos de $\text{PGF}_{2\alpha}$ está determinado por la pérdida de la sensibilidad del endometrio a la oxitocina y por el tiempo que tarda en recuperarla (6 a 8 horas aproximadamente) (Atuesta y Díaz, 2011). Su vida media es de sólo unos segundos y es degradada por el hígado y los pulmones después de ser transportada por la circulación sanguínea (Echeverría, 2006).

2.2.6 Ovulación

La ovulación en la oveja es un proceso espontáneo que ocurre entre las 24 a 40 horas después del inicio del estro conductual y dos o tres ovulaciones pueden ocurrir en el mismo período estral (Senger, 2003). La oleada ovulatoria de LH y mediadores producidos localmente dentro de los folículos desencadenan cambios estructurales, celulares y moleculares en las células del folículo preovulatorio que dará lugar a la ovulación y posteriormente a la luteinización de las células de la teca y de la granulosa (Abecia y Forcada, 2010). El ovocito maduro comienza a secretar un factor que permite la expansión de las células del cúmulo para formar el complejo cúmulo-ovocito, que tiene la función de proteger y facilitar el transporte del ovocito por el oviducto después de la ovulación (Tamba *et al.*, 2010). Las células de la teca comienzan a secretar progesterona, lo que desencadena la síntesis de colagenasa que está relacionada con el proceso físico de la ovulación y las células de la granulosa producen sustancias inflamatorias acompañadas de una reducción en su capacidad para producir estradiol. Esto a su vez estimula la expresión de enzimas que participan activamente en la ruptura folicular y por tanto en la ovulación (Abecia y Forcada, 2010).

La oveja puede presentar ovulación sin estro (ovulación silenciosa) principalmente en la primera ovulación puberal pero también después del parto y al

inicio de la estación reproductiva (Pérez-Clariget y Almeraya, 2008); así como también es capaz de presentar ovulaciones múltiples que dependen de factores como la genética, la edad, la estación del año y la relación peso-nutrición (Pérez-Clariget y Almeraya, 2008). El número de ovulaciones está relacionado con el número de folículos que se desarrollan hasta alcanzar la fase preovulatoria (González-Bulnes *et al.*, 2002).

2.2.7 Formación del cuerpo lúteo

La formación del cuerpo lúteo (CL), es iniciada por una serie de cambios morfológicos y bioquímicos en las células del folículo ovulado. Las células de la granulosa se convierten en células luteales grandes y las células de la teca en células luteales pequeñas. La transición del tejido folicular al tejido luteal es un proceso dinámico que incluye diferenciación, migración, proliferación de células y angiogénesis. El cuerpo lúteo es una glándula endócrina transitoria que sintetiza progesterona para el crecimiento y mantenimiento de la gestación, lo que provoca el control de la LH desde la hipófisis. El CL también secreta en cantidades menores: oxitocina, relaxina, vasopresina, prostaglandinas, estradiol e inhibina (Uribe-Velásquez *et al.*, 2011).

En ovejas, las células luteales pequeñas de 12-20 μm de diámetro tienen receptores para LH por lo que responden a dicha hormona incrementando la producción de P_4 . Por otra parte, las células luteales grandes ($>20 \mu\text{m}$) segregan altas concentraciones de P_4 y aunque tienen receptores para LH, dichas células no responden a LH para aumentar las concentraciones de P_4 , dependiendo entonces de una gran cantidad de receptores para hormona de crecimiento (GH), los cuales son responsables del 80% de la producción total de P_4 (Uribe-Velásquez *et al.*, 2011; Gómez-Chang *et al.*, 2012).

2.2.8 Luteólisis

La luteólisis es un proceso por el cual cesa la producción de esteroides y las células que conforman el CL sufren la muerte celular (Atuesta y Diaza, 2011). Cuando la gestación no se establece, el útero no gestante aumenta la síntesis de la

prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) en las células endometriales y también en el CL en menor concentración, para inducir la luteólisis. Tal proceso implica la reducción de la esteroidogénesis, la degradación de la vasculatura, la alteración del fenotipo de las células inmunitarias residentes y la producción de citoquinas, muerte celular e involución tisular, lo que permite a la hembra continuar con un nuevo ciclo estral (Norris y Lopez, 2011). Las prostaglandinas son ácidos grasos no saturados derivados del ácido prostanoico y se consideran como hormonas locales, ya que tienen tendencia a ser inestables y rápidamente metabolizables (Capallejas, 2009). En las ovejas la luteólisis inicia en los días 11 al 13 posterior al estro (Weems *et al.*, 2006).

La exposición del útero a altos niveles de progesterona durante un periodo de tiempo específico prepara al endometrio para la síntesis de $PGF_{2\alpha}$, la cual inhibe la expresión de receptores para progesterona en el endometrio, lo que permite el aumento en la expresión de receptores para estradiol y, posteriormente, receptores para oxitocina que intervienen en la liberación de $PGF_{2\alpha}$. Por otra parte, el estradiol incrementa la síntesis de receptores para oxitocina en el endometrio y puede estimular la actividad de enzimas involucradas en la síntesis de $PGF_{2\alpha}$ (Atuesta y Diaz, 2011). El estradiol ovárico, la progesterona y la oxitocina son reguladores de la secreción de $PGF_{2\alpha}$ en la oveja (Goodman e Inskeep, 2006).

Durante la luteólisis el CL sufre dos eventos consecutivos interrelacionados: pérdida de la capacidad para sintetizar y secretar progesterona (luteólisis funcional) y lisis de las células del CL (luteólisis estructural). La disminución en la secreción de progesterona se debe a la acción vasoconstrictora de la $PGF_{2\alpha}$, la cual reduce el flujo sanguíneo al CL por la degeneración de los capilares luteales, lo que impide a las células que obtengan nutrientes, sustratos esteroidogénicos y soporte luteotrópico (Niswender *et al.*, 2000). El transporte reducido del colesterol a través de las membranas mitocondriales en las células luteales parece ser el punto principal de la regulación negativa de la síntesis de progesterona por la $PGF_{2\alpha}$ (Olivera, 2007).

La $PGF_{2\alpha}$ es transportada a través de un mecanismo de contracorriente desde la vena uterina hasta la arteria ovárica adyacente al ovario en el que se encuentra el CL

(Olivera, 2007). En la oveja, las células luteales pequeñas son insensibles a la $\text{PGF}_{2\alpha}$, mientras que las células luteales grandes contienen receptores para $\text{PGF}_{2\alpha}$ (rPGF). El CL de la oveja es sólo sensible a $\text{PGF}_{2\alpha}$ entre los días 4 y 14 del ciclo estral (Día 0 = estro). La $\text{PGF}_{2\alpha}$ al unirse a los receptores de membrana de las células lúteas grandes provoca la reducción en la síntesis de progesterona y el aumento de la entrada de calcio que lleva a la apoptosis o muerte celular (Capallejas, 2009).

2.3 Uso de progestágenos en la reproducción ovina

2.3.1 Sincronización del estro en ovejas con progestágenos

La sincronización del estro con tratamiento hormonal permite tener mayor planeación del manejo reproductivo al controlar el periodo de partos y la crianza de los corderos en una época con mejores condiciones climáticas o nutricionales para concentrar el destete en un tiempo determinado, lo que permite obtener lotes de animales más homogéneos para el sacrificio; además, los beneficios se reflejan en el aumento de la eficiencia reproductiva, en la reducción de costos y posibilita el uso de la inseminación artificial (IA) y otras biotecnologías reproductivas (Abecia *et al.*, 2011; Amiridis y Cseh, 2012). La sincronización del estro en ovejas se logra mediante la reducción de la longitud de la fase lútea del ciclo estral con prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$) o imitando o extendiéndola artificialmente con progestágenos exógenos. Sin embargo, la fertilidad inducida por los progestágenos puede ser afectada debido a diferentes causas como: alteraciones en la flora vaginal, patrones de liberación hormonal y transporte de esperma (Ungerfeld y Rubianes, 2002).

Los tratamientos hormonales para el control del estro y la ovulación permiten inducir el estro en ovejas en anestro y sincronizar el momento de la aparición del estro en ovejas cíclicas (Uribe-Velázquez *et al.*, 2008). Los protocolos reproductivos convencionales más utilizados dentro de la producción ovina se basan en dispositivos que contienen progesterona (P_4) natural o sus análogos sintéticos (Simões, 2015). Los dispositivos que se encuentran comercialmente son esponjas de poliuretano (impregnadas con 20-40 mg de acetato de fluorogestona [FGA] o 50-60 mg de medroxiprogesterona [MAP] y elastómeros de silicona inerte con 0.30 g de P_4 natural

(CIDR), los cuales se insertan en la vagina durante un periodo de 12 a 14 días junto con la inyección de la hormona gonadotropina coriónica equina (eCG) (Ungerfeld y Rubianes, 2002; Abecia *et al.*, 2011).

2.3.2 Efecto fisiológico de los progestágenos sobre la sincronización del estro en ovejas

Las altas concentraciones de P₄ exógena aportada por los dispositivos intravaginales ejercen una retroalimentación negativa en el eje hipotalámico-hipofisiario-ovárico disminuyendo la frecuencia y aumentando la amplitud de los pulsos de LH (Lozano-González *et al.*, 2012). La supresión de la LH causa atresia en los folículos dominantes y al mismo tiempo aumenta el crecimiento folicular a través de la regulación positiva de los receptores de gonadotropinas en las células de la granulosa de los folículos (Leyva *et al.*, 1998), lo que acelera la emergencia de la siguiente onda folicular que resulta en la ovulación de un folículo joven y saludable (Menchaca y Rubianes, 2004). Los nuevos folículos alcanzan su diámetro preovulatorio después de 5 a 7 días de la inserción del dispositivo (Escobar *et al.*, 2017). Adecuadas concentraciones de P₄ (>1 ng/mL) preparan al hipotálamo para responder al aumento del estradiol producido por el folículo dominante. Por el contrario, bajas concentraciones de P₄ promueven un crecimiento persistente del folículo dominante lo que ocasiona la ovulación del folículo envejecido que afecta al éxito en la fertilidad (Viñoles *et al.*, 2001).

2.3.3 Modificación en el entorno vaginal ovino durante el uso de dispositivos con progestágenos

Independientemente del material (poliuretano o silicona) o del tipo de progesterona (sintético o natural) con que son elaborados e impregnados los dispositivos intravaginales, al estar en contacto con la pared vaginal, generan cambios en la flora natural del útero y la vagina (Manes *et al.*, 2010). Vasconcelos *et al.* (2016) evaluaron la presencia de vaginitis y carga bacteriana después de seis días de tratamiento con progestágenos (CIDR y esponjas) y encontraron que todas las ovejas presentaron vaginitis con signos clínicos típicos como secreción mucopurulenta, eritemas y aumento de la sensibilidad local, además de un aumento considerable en

la carga microbiana. La modificación en el entorno vaginal se atribuye al aumento del potencial de hidrógeno (pH; a partir del pH neutro vaginal normal), la reacción inflamatoria procedente de la acumulación de moco y aumento de la carga bacteriana, a la acción física y a la constante absorción de P₄ durante el período del tratamiento con progestágenos (Vasconcelos *et al.*, 2016; Martínez-Ros *et al.*, 2018b). La flora normal es restaurada entre las 24 y las 48 horas posteriores al retiro del dispositivo (Vasconcelos *et al.*, 2016). De acuerdo con Manes *et al.* (2010) se requiere incluir procedimientos estrictos de higiene en el uso de dispositivos intravaginales para minimizar el crecimiento de la flora bacteriana.

La flora vaginal consiste en poblaciones asentadas de microorganismos patógenos y no patógenos que se encuentran en equilibrio sin causar daño a la salud de la hembra; sin embargo, cuando el sistema vaginal sufre un desbalance por alguna razón, como es el uso de dispositivos intravaginales, los microorganismos patógenos oportunistas se vuelven dominantes, lo que llega a causar infecciones vaginales y en consecuencia perjudican el desempeño reproductivo de la hembra (Altınçekiç y Koyuncu, 2018). Manes y Ungerfeld (2015) mencionan que la flora vaginal normal en ovejas y cabras está compuesta mayormente de bacterias gram positivas, generalmente del género *Bacillus* spp. En cambio, al retirar los dispositivos con progestágenos (esponjas o CIDR) la flora predominante cambia a bacterias gram negativas (*E. coli* y *Klebsiella* spp). Manes *et al.* (2010) encontraron que en la inserción de los dispositivos intravaginales con progestágenos (CIDR y esponjas) en ovejas cíclicas, el 90% de la población bacteriana está compuesta de bacterias gram positivas (*Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp. y *Corynebacterium* sp), y en la extracción de los dispositivos el 79% pertenecían a bacterias gram negativas (*Echerichia* sp.).

Martínez-Ros *et al.* (2018b) reportaron que el 80% de las ovejas tratadas con esponjas durante 14 días presentaron secreción purulenta o sanguinolenta, al igual que el 15% de las ovejas tratadas durante 7 días. En cambio, con el uso de CIDR, del 15 al 20% de las ovejas presentó secreción vaginal (que fue escasa, clara y con aspecto mucoso) y cambios en el pH y microbiota similar al grupo no tratado. Los autores atribuyen el bajo porcentaje de secreción vaginal al diseño y composición del

CIDR que permite el drenaje de cualquier secreción, lo que evita la acumulación y cambios posteriores en los fluidos vaginales. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Swelum *et al.* (2015a) quienes reportaron que el porcentaje de descarga vaginal fue mayor con las esponjas (98.58%) que con los CIDR (51.91%); al igual que Ezzat *et al.* (2016) quienes observaron mayor descarga de moco vaginal en las ovejas después de retirarles las esponjas que aquellas que se les retiró el CIDR.

La esponja intravaginal absorbe las secreciones vaginales lo que permite el crecimiento y la multiplicación de microorganismos que producen un olor desagradable, y algunas de las esponjas se adhirieron firmemente a la mucosa vaginal, causando un mayor porcentaje de rotura de la esponja después de la eliminación del dispositivo (Swelum *et al.*, 2015a). Se ha demostrado que las esponjas intravaginales son responsables por sí mismas de una reducción significativa en el porcentaje de gestación durante los tratamientos de sincronización del estro en ovejas (Menchaca *et al.*, 2017). Manes *et al.* (2014) determinaron que el porcentaje de gestación en las ovejas es afectado por el uso de esponjas intravaginales durante 13 días independientemente del contenido de progestágeno (con MAP: 41.5% o sin MAP: 34.6%) en comparación con el grupo que no recibió esponjas (55.4%; $p = 0.0002$). Estos resultados concuerdan con Gatti *et al.* (2011) quienes observaron durante un tratamiento con esponjas (14 días) que el progestágeno MAP no influye en el aumento del número de bacterias vaginales (log unidad formadora de colonias (CFU/ml: 4.3 ± 0.2 o 4.4 ± 0.2 con y sin MAP, respectivamente) en las ovejas.

2.3.4 Uso del dispositivo CIDR en los protocolos de sincronización del estro en ovejas

El CIDR fue diseñado en Nueva Zelanda a finales de los años 80's, está fabricado a partir de una matriz de silicona moldeada sobre una columna flexible de nylon el cual contiene 0.30 g de P₄ natural micronizada (Carlson *et al.*, 1989). La Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) y la Dirección de Medicamentos Veterinarios de Canadá (VDD) aprobaron el uso del dispositivo para inducir el estro en ovejas acíclicas (Abecia *et al.*, 2011). Rowe *et al.* (2009) demostraron que los dispositivos CIDR en tratamientos hasta por 14 días no producen efectos adversos en

la salud general de las ovejas; además, mencionan que la pérdida de los CIDR debe señalarse como un posible problema de eficacia y no como un problema de seguridad. El CIDR proporciona algunas ventajas como fácil inserción y extracción del dispositivo, alto porcentaje de retención y menor descarga de secreciones vaginales en el momento del retiro, aunque su elevado costo limita su uso generalizado en unidades de producción comerciales (Wheaton *et al.*, 1993; Martins *et al.*, 2010). El CIDR ha demostrado ser eficaz para controlar el estro en ovejas cíclicas (Aké-López *et al.*, 2014) y en ovejas en anestro (Ungerfeld y Rubianes, 2002). Escobar *et al.* (2017) reportaron que el uso de CIDR durante 12 días aumenta el porcentaje de gestación (63.4% con CIDR y 34.3% sin CIDR) y el tamaño de la camada en ovejas tanto en época reproductiva como en anestro (1.2 ± 0.1 y 1.3 ± 0.1 , respectivamente).

El dispositivo proporciona altas concentraciones de P₄ en sangre inmediatamente después de su inserción debido a su cinética de liberación eficiente y posteriormente caen rápidamente después de la extracción sin efecto acumulativo (Mohan, 2017a). Los estudios han demostrado que la progesterona plasmática de las ovejas se mantiene por encima de 2 ng/ml durante los primeros 7 días después de la inserción del CIDR (Cox *et al.*, 2012) lo que causa la presentación del comportamiento estral después de la retirada del dispositivo en más del 80% de las hembras tratadas, además de que en la mayoría de las ovejas que ovulan tienen cuerpos lúteos funcionales con una adecuada secreción de P₄ (Martínez-Ros *et al.*, 2019b). Después del retiro del CIDR, las concentraciones de P₄ bajan rápidamente hasta alcanzar concentraciones subluteales, lo que provoca el estímulo de la liberación de GnRH del hipotálamo que a su vez influye en el aumento preovulatorio de LH y FSH que da lugar al inicio de las ondas típicas de crecimiento folicular ovárico desde el cual se produce la ovulación (Hashim *et al.*, 2013).

2.3.5 Utilización de Gonadotropina coriónica equina (eCG) para la sincronización

La gonadotropina eCG, también conocida como gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG), se sintetiza en las copas endometriales derivadas del feto con la finalidad de inducir cuerpos lúteos accesorios, ya que es una variante de la LH equina,

para mantener el desarrollo embrionario entre los 40 y 130 días de gestación de la yegua (Murphy, 2012). La eCG pertenece a una familia de hormonas glicoproteicas que contiene un alto porcentaje de carbohidratos (45% de su peso molecular), especialmente de ácido siálico, lo que determina la prolongación de su vida media en circulación sanguínea ($t_{1/2}$ ~21 h en ovejas) (Martinuk *et al.*, 1991). La estructura de la eCG se compone de una subunidad α y una subunidad β que le permite interactuar con los receptores de FSH y LH en las células ováricas de los rumiantes (Murphy, 2012).

La aplicación de una dosis de eCG en ovejas durante la fase de crecimiento del folículo preovulatorio, permite que se una a los receptores foliculares de FSH y LH, confiriendo efectos fisiológicos similares a la FSH en mayor medida y de LH de manera secundaria, lo que posibilita el aumento del crecimiento folicular, el reclutamiento de folículos pequeños, la disminución en la atresia folicular natural, el aumento en el porcentaje de ovulación y la mejora de la función lútea después de la ovulación (Moakhar *et al.*, 2012; García-Pintos y Menchaca, 2016). La eCG se puede aplicar para acelerar la pubertad, inducir el estro, mejorar la fertilidad, provocar la ovulación múltiple para la transferencia embrionaria e inducir una mayor sincronía de la ovulación tanto en ovejas en anestro como en ovejas cíclicas (Kor *et al.*, 2012; Murphy, 2012).

La dosis de eCG varía de 250 a 500 UI, lo que depende del peso, la edad (250-300 UI en ovejas jóvenes, 350-500 UI en ovejas adultas), la temporada (400-500 UI en anestro, 300-500 UI en ovejas cíclicas) y la raza (dosis más bajas en razas prolíficas) (Abecia *et al.*, 2011). La administración excesiva de eCG (800 a 1000 UI) puede resultar en una luteinización prematura, debido al efecto luteinizante de la eCG, sumados a la gran cantidad de E_2 producida por los folículos grandes (>5 mm). Por otra parte, el uso repetido de eCG se ha asociado a una respuesta inmune humoral en las ovejas y al desarrollo de quistes foliculares seguido de una disminución del 60 al 40% en la fertilidad (Fierro y Olivera-Muzante, 2017).

2.3.6 Combinación del tratamiento con progestágenos más la aplicación de eCG

La combinación de dispositivos de progestágenos (CIDR o esponjas) y eCG ha mostrado efectos significativos en la respuesta al estro, aunque el porcentaje de gestación es más bajo durante el anestro que durante la época reproductiva (Kor *et al.*, 2012) debido principalmente a la reducción del 50% de la concentración de LH en la pituitaria durante el anestro (Güngör *et al.*, 2007). La reproducción en anestro también puede tener un efecto adverso en el macho, lo que lleva a reducir la fertilidad del semen de los carneros (Shahneh *et al.*, 2006). Varios factores afectan de manera indirecta el porcentaje de gestación, como: la nutrición, el sistema de apareamiento, la edad, la raza, el tipo de inseminación, el momento de la administración de eCG (antes o después de la eliminación del progestágeno) y la dosis de eCG (Nosrati *et al.*, 2010; Fleisch *et al.*, 2012). La eCG se asocia al tratamiento con progestágenos para estimular la ovulación tanto en ovejas en anestro como en ovejas cíclicas (Naderipour *et al.*, 2012).

La administración intramuscular (i.m.) de eCG en ovejas se puede realizar 24 horas antes o en el momento de retirar el progestágeno, produciendo el estro de las 24 a las 48 horas posteriores y aproximadamente a las 60 h ocurre la ovulación (Floriani-Ramos y Marques-Silva, 2018). El macho puede introducirse 24 horas después de la aplicación de eCG, durante los primeros signos del estro (Cordova-Izquierdo *et al.*, 2008). Hashim *et al.* (2013) mostraron que el tiempo de aplicación de la eCG (200 UI), 24 horas antes o en el momento del retiro del CIDR, afecta las concentraciones plasmáticas tanto de P_4 como de E_2 en las ovejas sincronizadas durante 11 o 13 días, siendo más altas cuando la eCG se aplica al momento del retiro del dispositivo. Koyuncu y Alticekic, (2010) reportaron que la aplicación de eCG 24 h antes o en el momento del retiro del progestágeno es esencial para obtener mejores porcentajes de fecundidad en ovejas cíclicas. Con respecto a la vía de aplicación, los autores señalaron que la vía subcutánea de eCG proporciona mejores porcentajes de parición y fecundidad que la vía intramuscular, lo cual lo atribuyen a las diferencias en el porcentaje de absorción y metabolismo de la eCG entre la aplicación subcutánea e

intramuscular. Zeleke *et al.* (2005) indicaron un aumento de la fecundidad cuando la eCG se aplicó 24 h antes o al momento de la eliminación del progestágeno en ovejas durante el periodo de transición; al igual que el porcentaje de fertilidad y tamaño de la camada fue mayor con la aplicación subcutánea de eCG.

La eCG aumenta el número de folículos y el porcentaje de crecimiento de los folículos grandes, lo que ocasiona que se incremente la concentración de estrógenos (Hashim *et al.*, 2013). Güngör *et al.* (2007) reportaron que el intervalo entre la retirada de los progestágenos, el tiempo de inicio de la onda de LH y el tiempo en que la LH alcanza el nivel máximo se acorta al aplicar una inyección de eCG después de retirar las esponjas o los CIDRs. Por su parte, Nasser *et al.* (2012) mencionan que el estro inicia antes en ovejas tratadas con eCG que con ovejas tratadas solo con CIDR independientemente de la duración de permanencia del dispositivo. Uriol *et al.* (2019) compararon la efectividad del uso de dispositivos CIDR durante 5 o 14 días con o sin la aplicación de eCG al final del tratamiento. Encontraron que a pesar de que el tratamiento corto sin eCG es capaz de inducir el comportamiento del estro, la secreción preovulatoria de LH y la posterior ovulación en las ovejas presentaron una diferencia de 16 horas entre la aparición y duración de la oleada de LH y el inicio de la ovulación comparado con el protocolo largo con CIDR más eCG. Por otra parte, Nasser *et al.* (2012) reportaron que el CIDR puede utilizarse con éxito durante 6 o 12 días antes de la monta natural sin tener que administrar eCG; sin embargo, la inyección de eCG afecta el tamaño de la camada y es importante para inducir partos múltiples en ovejas cíclicas.

El uso de eCG después del tratamiento con progestágenos proporciona una sincronización más precisa y predecible del estro y la ovulación, lo cual es importante para obtener mejores resultados reproductivos cuando se utiliza inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) en ovejas (Moakhar *et al.*, 2012). Dos Santos-Neto *et al.* (2015) evaluaron diferentes fuentes de progestágenos durante 6 días más una dosis de PGF_{2α} y 300 UI de eCG en el momento del retiro del dispositivo para la IATF en ovejas cíclicas y encontraron que el porcentaje de gestación es afectado por la técnica de inseminación (intrauterino: 58.3% y cervical: 39.8%, $P < 0.05$), así como por la fuente

de P₄ (CIDR: 55.8%, DICO (nuevo dispositivo liberador de P₄): 55.7% y esponjas: 37.4%, P<0.05). Los autores mencionan que la diferencia de efectividad entre la inseminación intrauterina y cervical puede deberse a varios factores, como el sitio de depósito del esperma, la concentración del esperma, la anatomía del cuello uterino, la raza, el protocolo de sincronización, entre otros. Por el contrario, Aké-Villanueva *et al.* (2018) informaron que el tipo de progestágeno (esponja o CIDR) no influyó en el porcentaje de gestación después de que las ovejas fueran inseminadas con semen congelado; además, la dosis de eCG tendió a incrementar el porcentaje de gestación con dosis de 200 UI (64.4%) y 250 UI (67.9, P = 0.0735).

2.3.7 Tipo de dispositivo utilizado (CIDR o esponjas) más la aplicación de eCG

Los dispositivos CIDR y las esponjas son igualmente eficaces para inducir o sincronizar el estro en ovejas cuando se aplica en conjunto con una dosis de eCG (Kor *et al.*, 2012; Mohan, 2017b). Ozyurtlu *et al.* (2010) observaron que con el uso de CIDR o esponjas durante 12 días en combinación con eCG (400 UI) al retiro del dispositivo son igualmente efectivos para inducir la manifestación del estro, aumentar la gestación y la parición (CIDR: 90, 70 y 85%; esponjas: 70, 70.8 y 79.2%, respectivamente) en ovejas acíclicas en comparación con el grupo testigo. Por su parte, Fleisch *et al.* (2012) demostraron que los CIDR y las esponjas durante un tratamiento de 6 días aunado a la aplicación de PGF_{2α} y 300 UI de eCG al retiro del dispositivo no presentan un efecto diferente con respecto a la respuesta del estro y la fertilidad en ovejas cíclicas. Lo que concuerda con Martínez-Ros *et al.* (2018a) quienes reportaron que el uso de progestágenos (CIDR o esponjas) durante 7 días más la aplicación de PGF_{2α} y eCG (400 UI) al retiro del dispositivo en ovejas cíclicas son igualmente efectivos para inducir una descarga preovulatoria de LH (5.1 ± 2.1 y 5.8 ± 3.3 h después del inicio del estro para esponjas y CIDR, respectivamente) y el comportamiento del estro (32.0 ± 6.0 y 33.8 ± 4.0 h de intervalo al estro después del retiro del dispositivo para esponjas y CIDR, respectivamente).

Por el contrario, Swelum *et al.* (2015a) reportaron que aunque los dispositivos CIDR y las esponjas en protocolos de 14 días más la aplicación de 600 UI de eCG al momento del retiro son eficientes para sincronizar el celo en las ovejas, el CIDR

proporciona un mayor porcentaje de gestación, fertilidad, porcentaje de partos dobles y fecundidad (77,86%, 75.57%, 34.34% y 1.02, respectivamente) que las esponjas (62.41%, 60.99%, 18.60% y 0.72, respectivamente). Así como también, las concentraciones en suero de E₂ y P₄ fueron más altas (P < 0.05) en el grupo tratado con CIDR que en el grupo tratado con esponjas a las 0, 24 y 48 horas después de la retirada del progestágeno; aunque, las concentraciones séricas de FSH fueron más altas en el tratamiento con las esponjas que en el tratamiento con los CIDR. Ezzat *et al.* (2016) informaron que el tratamiento con dispositivos CIDR en conjunto con eCG se puede obtener una mayor respuesta al estro, un rápido inicio al estro, una prolongada duración del estro y un elevado porcentaje de gestación (100%, 23–25 h, 37 h y 85.7%, respectivamente) en comparación con el uso de esponjas más eCG (85.7%, 25-30 h, 30 h y 71.4%, respectivamente) en ovejas cíclicas.

Kor *et al.* (2012) compararon la eficiencia del uso de esponjas y CIDR durante 13 días en ovejas en anestro y reportaron que con esponjas intravaginales se presenta una mayor concentración media de P₄ que con los CIDR (5.21 y 3.84, respectivamente) y un aumento del porcentaje de estro y de fecundidad (92.89 y 149.1) en comparación con los dispositivos CIDR (82.45 y 126.8%), sin reportar diferencias en el inicio del estro y el porcentaje de gestación. Estos mismos autores, además compararon la aplicación i.m. de 350, 500 y 600 UI de eCG al momento de la extracción del dispositivo, lo cual mejoró el porcentaje de fecundidad con las dosis de 350 UI en ambos dispositivos. De la misma manera, Mohan (2017b) evaluó el uso de CIDR y esponjas durante 12 días junto con la inyección de 400 o 600 UI de eCG al retiro del dispositivo, durante la época reproductiva y el anestro. De acuerdo a sus resultados el porcentaje de gestación fue mayor en ovejas sincronizadas con esponjas que con CIDR en ambos periodos; sin embargo, el tamaño de camada no difirió entre el tipo de dispositivo y la época, aunque con la dosis de 600 UI de eCG obtuvieron mayor porcentaje de partos múltiples.

2.4 Uso de CIDR reutilizados en la sincronización del estro en ovejas

2.4.1 Reutilización de los dispositivos CIDR

Los dispositivos CIDR pueden liberar cantidades limitadas de progesterona durante más tiempo del recomendado para la sincronización. Cuando el dispositivo es retirado de la vagina aún contiene P₄ y la cantidad residual depende del tiempo que permaneció insertado (Swelum *et al.*, 2018b). En vacas, si su permanencia intravaginal es de 9 días, retiene alrededor de 1.1 g de P₄ y si permanece durante 15 días retiene aproximadamente 0.9 g (Macmillan *et al.*, 1991). Por otra parte, también se ha estudiado la cantidad total de P₄ liberada por los CIDR que se mantuvieron en el interior de la vagina por 7 días, la cual fue de 0.61 ± 0.01 g en vacas (Rathbone *et al.*, 2002). Aunque el fabricante del dispositivo CIDR recomienda usarlo una sola vez, algunos estudios sugieren que es posible reutilizarlo en vacas (Santos *et al.*, 2018; Muth-Spurlock *et al.*, 2019) en cabras (Álvarez *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2015) y en ovejas (Swelum *et al.*, 2015b; Biehl *et al.*, 2019) para la sincronización e inducción del estro.

La posibilidad de reutilizar el dispositivo CIDR permite disminuir los costos y la contaminación ambiental debido a la cantidad de hormona que queda en el dispositivo después de su primer uso. Además, debido a sus características físicas, el dispositivo CIDR puede ser limpiado, desinfectado o esterilizado para posteriormente ser reutilizado (Vilariño *et al.*, 2013; Gastal *et al.*, 2013; Swelum *et al.*, 2018b) sin afectar el rendimiento reproductivo de la hembra. Sin embargo, se recomienda su reutilización dentro del mismo hato de animales que se encuentren libres de enfermedades reproductivas (Pinna *et al.*, 2012) y llevar a cabo una adecuada higiene en el momento de la inserción y extracción del dispositivo, debido a que es posible inducir infecciones reproductivas en la hembra, lo que conduce a la reducción del rendimiento reproductivo (Bragança *et al.*, 2017). Como ya se mencionó anteriormente, es importante enfatizar que aunque los dispositivos CIDR provocan una menor descarga de fluido vaginal cuando son extraídos en comparación con las esponjas, el contacto del dispositivo con las paredes vaginales provoca cambios en la flora bacteriana normal que favorecen el desarrollo de Enterobacterias oportunistas, incluso si los

dispositivos fueron usados por un periodo corto de tiempo, así como por el efecto inmunosupresor promovido por el progestágeno (Manes *et al.*, 2010).

Bragança *et al.* (2017) observaron cambios en la flora vaginal antes de la aplicación y después de la extracción de un dispositivo CIDR nuevo o reutilizado durante un protocolo corto de sincronización del estro en ovejas primaras en anestro. La flora predominante antes de la inserción del dispositivo resultó ser 93.3 y 80.0% de agentes gram-positivos, especialmente de los géneros *Bacillus* sp. y *Staphylococcus* sp. con los CIDR nuevos y reutilizados, respectivamente. En cuanto a la retirada de los dispositivos, reportaron que en el 100% de las muestras predominó agentes gram-negativos con los dispositivos nuevos, la mayoría pertenecientes al género *Enterobacteriaceae*. En cambio con el grupo de los dispositivos reutilizados hubo un equilibrio entre agentes gram-positivos y gram-negativos, siendo en su mayoría del género *Echerichia coli* (46.7%) que puede deberse a la contaminación del dispositivo con material fecal.

2.4.2 Manejo sanitarios de los CIDR reutilizados

Para disminuir el riesgo de contaminación dentro de un hato y eliminar los patógenos antes de la reutilización de los dispositivos, además de limpiarlos con agua, solución salina normal o con alcohol al 70% (Swelum *et al.*, 2018b), se propusieron alternativas para la desinfección del dispositivos antes de la reutilización, como la inmersión en una solución de cloruro de benzalconio (Vilariño *et al.*, 2013), con acriflavina (Cox *et al.*, 2012), con acetato de clorhexidina (Güngör *et al.*, 2009) o con amonio cuaternario (Da Silva *et al.*, 2014). También se propuso la esterilización de los dispositivos por medio de autoclave (Gastal *et al.*, 2013; Ungerfeld *et al.* 2013). Por otra parte, se ha sugerido en vacas que la esterilización de dispositivos reutilizados mediante autoclave podría mejorar la disponibilidad de P₄ (Zuluaga y Williams, 2008), lo que ayudaría a incrementar la respuesta estral y la fertilidad. Otra consideración para la reutilización de CIDR es que el dispositivo debe estar completamente seco antes de un almacenamiento prolongado, para minimizar el potencial de crecimiento microbiano (Pinna *et al.*, 2012).

Se ha informado que las concentraciones de P₄ aumentan en el ganado después de esterilizar en autoclave los dispositivos (Zuluaga y Williams, 2008). Sin embargo, las concentraciones de P₄ fueron menores en cabras tratadas con CIDR previamente utilizados durante 6 o 12 días y esterilizados en autoclave que cuando se utilizaron dispositivos nuevos durante la época reproductiva (Souza *et al.*, 2015) y durante el anestro (Souza *et al.*, 2011). En las ovejas, la esterilización por autoclave (121° C a 724 mm Hg por 20 min) no es suficiente para redistribuir el contenido restante de P₄ de los dispositivos reutilizados para superar el efecto negativo del uso previo sobre el porcentaje de gestación (Ungerfeld *et al.*, 2013), posiblemente porque el contenido de P₄ que queda en los dispositivos no es suficiente para obtener mayores concentraciones y, por lo tanto, no se puede aumentar la disponibilidad de P₄ mediante el proceso de autoclave de los CIDR.

Ungerfeld *et al.* (2013) reportaron que la esterilización por autoclave de los CIDR utilizados anteriormente durante 22 días no mejoran el porcentaje de estro y gestación en ovejas en anestro durante un protocolo de sincronización de 8 días sometidas al efecto macho. El porcentaje de estro y gestación fue mayor ($P < 0.05$) en dispositivos nuevos (56.7 y 50%, respectivamente) que con CIDR desinfectados (26.7 y 13.3%, respectivamente) y CIDR desinfectados en autoclave (15.6 y 16.6%, respectivamente), sin diferencias entre los últimos. De igual manera, la concentración de P₄ fue más alta ($P < 0.001$) con los dispositivos nuevos que con los CIDR desinfectados y CIDR en autoclave, sin diferencias entre ellos. En contraste, Gastal *et al.* (2013) informaron que la esterilización en autoclave contribuye a la reutilización del CIDR al obtener una mejor respuesta en la sincronización del celo en ovejas cíclicas durante un protocolo corto (6 días) en asociación con un análogo de PGF_{2α} y eCG en el momento del retiro. El porcentaje de estro con CIDR sin esterilizar fue menor (67.9%) que con los dispositivos esterilizados (89%).

2.4.3 Potencial de reutilización del CIDR

Aunque los CIDR reutilizados son eficientes para sincronizar el estro en las ovejas, se ha informado que la duración de permanencia del dispositivo en su uso anterior afecta los parámetros reproductivos en el nuevo grupo de hembras que se les

inserte el dispositivo reutilizado y el beneficio económico de la reutilización (Ungerfeld, 2009; Ungerfeld *et al.*, 2013; Vilariño *et al.*, 2013; Swelum *et al.*, 2018b). En ovejas, se determinó que el porcentaje de gestación disminuye con el uso de CIDR previamente utilizado por lo menos durante 11 días en comparación con los dispositivos nuevos (Ungerfeld y Rubianes, 1999). También disminuye cuando los CIDR fueron utilizados anteriormente durante 18 días en comparación con los utilizados durante 12 días (Ungerfeld, 2009), pero en otro estudio sólo tendió a disminuir si los CIDR se utilizaron anteriormente durante 12 días (Vilariño *et al.*, 2013). La fertilidad observada posterior al estro depende de la cantidad de P₄ administrada (Ungerfeld y Rubianes, 1999).

La disminución en el porcentaje de gestación puede relacionarse con la prolongación de la vida del folículo dominante, provocado por las bajas concentraciones de P₄ durante el tratamiento (Viñoles *et al.*, 2001) en ovejas cíclicas (Smith *et al.*, 1991), ovejas en anestro (Ungerfeld y Rubianes, 1999) y ovejas inducidas mediante el efecto macho (Ungerfeld, 2009). Los CIDR reutilizados no logran inducir el pico de P₄ durante el primer día de tratamiento observado con los nuevos dispositivos (Vilariño *et al.*, 2013), lo que podría afectar el recambio folicular ovárico, con una mayor probabilidad de inducir folículos preovulatorios persistentes; no obstante, en los siguientes días las concentraciones de P₄ en los CIDR nuevos y de segundo uso son similares, pero más bajas en los de tercer uso. Vilariño *et al.* (2013) reportaron que el recambio folicular fue del 100% en ovejas tratadas con dispositivos nuevos mientras que con los dispositivos de tercer uso solo fueron efectivos en el 80% de las ovejas, a pesar de que las características del folículo ovulatorio a la ovulación y la fase lútea subsiguiente no difirieron entre los dispositivos de primer, segundo y tercer uso.

Swelum *et al.* (2015b) observaron el efecto de 6 veces de reutilización del CIDR en tratamientos cortos de 6 días de sincronización junto con la aplicación de 300 UI de eCG al momento del retiro del dispositivo en ovejas cíclicas. Encontraron que las concentraciones de P₄ fueron similares entre los dispositivos de primer, segundo, tercer, cuarto, quinto y sexto uso (1.73, 1.67, 1.87, 1.57, 1.60 y 1.36 ng/ml, respectivamente), aunque, sin diferencias entre los porcentajes de estro con

dispositivos de primer, segundo y tercer uso (55, 70 y 55%, respectivamente); mientras que con el dispositivo de segundo uso el porcentaje de ovejas en estro fue más alto ($P \leq 0.05$) que con los dispositivos de cuarto, quinto y sexto uso (35, 35 y 31.58%, respectivamente). En cuanto al porcentaje de gestación fue mayor ($P < 0.05$) con el dispositivo de segundo uso (65%) que con los demás tratamientos (30, 30, 30, 15.79%, respectivamente), excepto con el dispositivo nuevo, que fueron similares.

En otro estudio, Swelum *et al.* (2018b) demostraron que los CIDR de segundo uso proporcionan la mayor tasa de fecundidad y rendimiento reproductivo, al comparar los efectos del CIDR previamente usados por 6, 12, 18, 24 o 30 días en protocolos de 6 días en combinación con 300 UI de eCG, en ovejas multíparas cíclicas. Estos autores obtuvieron un mayor ($p < 0.05$), porcentaje de estro, porcentaje de gestación, parto doble, fecundidad y prolificidad con los dispositivos nuevos (80%, 55%, 27.27%, 70% y 127.3, respectivamente) y de segundo uso (80%, 65%, 46.15%, 90% y 146.15, respectivamente). Sus resultados están en acuerdo con Vilariño *et al.* (2013) quienes mencionan que el porcentaje de gestación tiende a ser más bajo con dispositivos que se usan por más de tres veces comparado con dispositivos nuevos durante un protocolo corto (Vilariño *et al.*, 2013), lo que evidencia el efecto perjudicial de las bajas concentraciones de progesterona en suero sobre la fertilidad en las ovejas.

Da Silva *et al.* (2014) reportaron que los dispositivos CIDR pueden ser reutilizados hasta tres veces en protocolos de 6 días asociados con la aplicación de un análogo de prostaglandina (0.263 mg) y eCG (250 UI) en la retirada del dispositivo en ovejas Texel. El porcentaje de estro con dispositivos de primer, segundo y tercer uso fueron de 93.3, 93.9 y 91.1% y los de gestación fueron de 73.3, 72.7 y 64.7%, respectivamente, sin diferencias estadísticas. Similares resultados obtuvieron Bazzan *et al.* (2013) al tratar a las ovejas con un CIDR de 6 días de permanencia intravaginal en conjunto con 0.263 mg cloprostenol sódico y 250 UI de eCG, en cuanto al porcentaje de estro manifestado en ovejas con el CIDR nuevo (100%) de segundo uso (93.7%) y de tercer uso (95.8%), con el 68% de hembras que ya habían manifestado estro durante las primeras 48 h después del retiro del dispositivo. De igual manera, Nogueira *et al.* (2009) evaluaron el efecto del uso de dispositivos CIDR hasta tres

veces más la aplicación de 75 mg de cloprostenol y 250 UI de eCG dos días antes de la extracción del dispositivo. Observaron un alto porcentaje de estro con el dispositivo nuevo, de segundo y tercer uso (100, 94.7 y 100%, respectivamente) y con un 81.5% de ovejas que manifestaron estro durante las primeras 24 horas siguientes al retiro del dispositivo.

El éxito en la manifestación del estro y la compacta sincronía en el inicio del estro sugieren que los dispositivos CIDR reutilizados hasta por tres veces en protocolos de sincronización cortos liberan cantidades suficientes de P_4 para permitir el bloqueo adecuado de la LH desde la hipófisis y el comportamiento de celo y la ovulación mientras que promueven la renovación y sincronización de una nueva onda folicular (Colazo *et al.*, 2004). Cox *et al.* (2012) reportaron que con la adición de 400 UI al final del tratamiento con CIDR reutilizados durante 7 días se redujo el intervalo a la ovulación a través de la aceleración del inicio del comportamiento de celo ($P=0.004$) y también tendió a incrementar el diámetro del cuerpo lúteo a los 10 días después del estro ($P=0.06$). Los folículos aumentan su producción de estradiol debido a que la eCG estimula el desarrollo de los folículos, por lo tanto, los niveles de E_2 aumentan anticipando la presencia del estro (Barret *et al.*, 2004).

Stenbak *et al.* (2003) observaron que las ovejas inducidas hormonalmente suelen presentar estro de las 24 a las 48 h después de la eliminación de los dispositivos de progesterona o progestágenos. Güngör *et al.* (2009) reportaron que las ovejas en anestro expresaron estro dentro de las 36 a las 60 h posteriores al retiro del dispositivo CIDR reutilizado. Biehl *et al.* (2019) determinaron que la sincronización con CIDR reutilizados se concentró en ovejas de las 36 a las 41.9 h después de la extracción del dispositivo tanto en protocolos largos como en cortos durante la temporada reproductiva. Swelum *et al.* (2018b) registraron altos porcentajes de ovejas en estro tratadas con CIDR reutilizados hasta por 6 veces durante las 48, 60 y 72 h después de la retirada del dispositivo. Bazzan *et al.* (2013) obtuvieron una sincronización similar con el CIDR nuevo (65%) comparado con dispositivos de segundo (50%) o tercer uso (60.4%) a las 48 h posterior al retiro del dispositivo, por lo que mencionan que la dispersión de estros en los grupos experimentales revela que el uso del dispositivo

hasta tres veces no altera la manifestación del celo. Sin embargo, el efecto del dispositivo en la distribución del estro se puede asociar con la etapa de desarrollo del folículo en que se encuentra cuando el dispositivo se retira (Biehl *et al.*, 2019).

La eCG debe estar asociada al dispositivo de P₄ para estimular la ovulación, no solamente en la estación reproductiva (Safdarian *et al.*, 2006). Datos reportados por Güngör *et al.* (2009) en ovejas Awassi durante el anestro indican que el uso aislado de eCG (500 UI) produce una respuesta reproductiva menos eficiente que el obtenido en conjunto con el dispositivo CIDR de primer uso o con el CIDR de segundo uso en el momento de la remoción del dispositivo durante un tratamiento de 12 días. De acuerdo a sus resultados el porcentaje de estro y de gestación no difirieron entre el dispositivo nuevo (86.67 y 53.33%, respectivamente) y el dispositivo reutilizado (66.67 y 60%, respectivamente). En cambio, Gastal *et al.* (2013) compararon el tratamiento compuesto por una única dosis de PGF_{2α} con respecto a la combinación de dispositivos CIDR reutilizados más la aplicación de PGF_{2α} con o sin eCG en ovejas cíclicas. Estos autores encontraron que la combinación de progestágenos y análogos de PGF_{2α}, con o sin uso de eCG, proporcionó mayor expresión de estro (89%) en comparación con el protocolo único de PGF_{2α} (64.3%). Los análogos de PGF_{2α} solamente tienen efecto en las hembras que presentan cuerpo lúteo sensible, lo que no ocurre generalmente a inicios de la época reproductiva, cuando no todas las hembras se encuentran en un ciclo activo, o cuando las que están ciclando no se encuentran en la etapa de diestro (Uribe-Velásquez *et al.*, 2010).

2.4.4 Reutilización del CIDR en protocolos cortos o largos

Debido al efecto supresor de los tratamientos largos con progestágenos (12–14 días) sobre la fertilidad (Smith *et al.*, 1991; Viñoles *et al.*, 2001; Bartlewski *et al.*, 2017) se ha sugerido el uso de los dispositivos CIDR reutilizados durante periodos cortos como una solución alternativa y práctica para la sincronización del estro en ovejas tanto con monta natural como al utilizar inseminación artificial (Pinna *et al.*, 2012).

Varios estudios han demostrado la posibilidad de reutilizar dispositivos CIDR en protocolos cortos de 5 a 7 días de sincronización del estro tanto en ovejas en anestro

como durante la temporada reproductiva (Ungerfeld y Rubianes, 1999; Ungerfeld *et al.*, 2013; Swelum *et al.*, 2015b). Swelum *et al.* (2015b) indicaron que la reutilización de dispositivos CIDR en protocolos cortos son eficientes para sincronizar el estro en ovejas.

Sin embargo, para evaluar si los protocolos cortos mejoran el porcentaje de gestación cuando son comparados con protocolos largos, Biehl *et al.* (2019) compararon el efecto de la reutilización de dispositivos CIDR en protocolos cortos (7 días) y protocolos largos (11 días) en conjunto con la inyección de 300 UI de eCG y 6.70 mg de Dinoprost al retiro del dispositivo dentro de un programa de IATF en ovejas cíclicas. Encontraron que el protocolo largo tendió a incrementar el porcentaje de gestación comparado con el protocolo corto (33 y 24%, respectivamente; $P=0.07$); sin embargo, el porcentaje de gestación al final del periodo reproductivo fue similar en ambos grupos (al rededor del 84%).

2.4.5 Reutilización del CIDR en protocolos con monta natural o inseminación artificial

Pinna *et al.* (2012) verificaron la eficacia de reutilizar los dispositivos CIDR después de dar servicio con monta natural o por inseminación artificial por laparoscopia (IAL) con semen fresco en ovejas Santa Inês durante el anestro. Las ovejas recibieron dispositivos CIDR de primer, segundo o tercer uso durante 5 días más 300 UI de eCG y 5 mg de dinoprost 24 horas antes de la extracción del dispositivo. Los autores observaron que el porcentaje de gestación fue menor (25.4%) después de la IAL en comparación con la monta natural (61%), debido posiblemente a una baja capacitación de los espermatozoides para realizar una fertilización adecuada de los ovocitos a causa de la cercanía entre la extracción del dispositivo y la IAL (52.4 h) y el tiempo de ovulación (55 h). Muñoz *et al.* (2002) sugirieron que cuando se utilizara semen congelado en la IA se realizara entre las 60 y 66 h después de la eliminación del dispositivo.

III. OBJETIVOS

3.1 General

Evaluar el efecto de la aplicación de CIDR reutilizado, al comparar la duración de permanencia (9 o 12 días) y la dosis de eCG al retiro del dispositivo (200 UI o 300 UI), sobre las principales variables reproductivas en ovejas primaras durante la transición reproductiva.

3.2 Específicos

- Evaluar el efecto del CIDR reutilizado, la duración de permanencia del dispositivo y la dosis de eCG en las variables de respuesta reproductiva: presentación del estro (inicio y duración), porcentaje de gestación, retorno al estro, tipo de parto e índice de prolificidad.
- Evaluar la influencia del CIDR reutilizado, la duración de permanencia del dispositivo y la dosis de eCG sobre la respuesta en el perfil de secreción de progesterona (P₄).

IV. HIPÓTESIS

La inserción de CIDR reutilizado en conjunto con la aplicación de eCG permite sincronizar el estro en ovejas primaras y mejorar las principales variables reproductivas en ovejas primaras.

4.1 Planteamiento del problema

En los sistemas de producción animal se busca aumentar de manera efectiva el porcentaje de crías viables producidas anualmente por cada hembra destinada a la reproducción y con ello mejorar la eficiencia económica y biológica de las unidades de producción pecuarias. En la ovinocultura, el control de la actividad reproductiva toma un papel fundamental como técnica de manejo que permite incrementar la rentabilidad de la empresa y además posibilita llevar a cabo una mejor planeación de actividades como la alimentación, la época de cubrición y de parición y el manejo sanitario, entre otros; con la finalidad de obtener productos de mayor calidad y más lotes de animales más homogéneos.

Actualmente una alternativa para el control reproductivo mediante la sincronización del estro en las ovejas es el uso de dispositivos vaginales CIDR los cuales contienen 300 mg de progesterona natural. Como complemento se recomienda acompañar el tratamiento con una dosis de gonadotropina coriónica equina en el momento del retiro del dispositivo, con la finalidad de provocar el aumento en el porcentaje de ovulación y de concepción.

De acuerdo con las indicaciones del fabricante, el dispositivo puede ser usado sólo una vez; sin embargo, después de su uso aún contiene producto residual. Ya que los CIDR son los componentes más costosos de los protocolos reproductivos en comparación con otros dispositivos, su reutilización puede potencialmente disminuir su costo y además evitar la contaminación ambiental por el desecho de hormonas al ambiente.

V. JUSTIFICACIÓN

El presente trabajo busca determinar si el uso de CIDR reutilizado y retirado en diferentes periodos de tiempo junto con la aplicación de diferentes dosis de eCG logra sincronizar el estro y obtener parámetros reproductivos aceptables en ovejas, lo que permitirá aprovechar adecuadamente el uso de los dispositivos CIDR e implicaría una alternativa reproductiva para mejorar la producción y rentabilidad de la ovinocultura.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Descripción del lugar de estudio

El estudio se realizó en el mes de julio del año 2018, durante la temporada de transición reproductiva (horas luz/horas oscuridad: 13L/11D), en la granja experimental del Colegio de Postgraduados, localizada en Montecillo, Estado de México, a 98° 53' O y 19° 29' N, a 2,250 msnm. El clima es templado subhúmedo con una precipitación media anual de 632.5 mm, durante el verano y una temperatura anual entre 12 y 18°C (García, 2004). El manejo de los animales se llevó a cabo de acuerdo al Reglamento para el uso y cuidado de animales destinados a la investigación en el Colegio de Postgraduados, en cumplimiento con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (SAGARPA, 2001).

6.2 Animales y alimentación

En el presente estudio se utilizaron 64 ovejas primaras de 13 meses de edad, híbridas de las razas (Kathadin × Suffolk), de 54±3.1 kg de peso inicial, desparasitadas con IVOMECS® (1 mL por cada 50 kg de peso vivo) vía subcutánea y vitaminadas con Vigantol® A.D.E (1 mL) vía intramuscular, con una condición corporal de 3 en escala de 1 a 5 (Russel *et al.*, 1969). Durante el experimento las ovejas se alimentaron diariamente, una vez al día, con una dieta a base de heno de avena (*Avena sativa*), heno de alfalfa (*Medicago sativa*) y 250 g de concentrado comercial con 14% de proteína cruda (PC). Se ofreció agua y sales minerales *ad libitum*. Las ovejas se mantuvieron en corrales con piso de tierra y techados parcialmente con 1.4 m² de espacio por animal.

6.3 Manejo de los dispositivos CIDR

En las ovejas se insertó vía intravaginal un dispositivo (CIDR®, Zoetis, México) fabricado de elastómeros de silicona impregnado con 0.3 g de P₄ natural, usados previamente en un protocolo de 11 días de sincronización realizado dos meses antes del presente estudio en la misma granja experimental. Los dispositivos se lavaron con agua purificada después del primer uso, se secaron y se colocaron en bolsas

herméticas para su almacenamiento en refrigeración. Un día antes de su segundo uso se expusieron a temperatura ambiente para evitar humedad en los dispositivos.

6.4 Tratamientos

Las ovejas fueron distribuidas aleatoriamente en cuatro tratamientos (T) (n=16/grupo): T1: CIDR9+eCG200, T2: CIDR9+eCG300, T3: CIDR12+eCG200 y T4: CIDR12+eCG300, que combinan los días de permanencia del dispositivo CIDR (9 o 12 días) y la dosis de eCG (200 o 300 UI). La hormona eCG (Folligon® Intervet, México) se inyectó por vía intramuscular al momento del retiro del dispositivo.

6.5 Sincronización del estro

La inserción de los dispositivos se realizó en los días experimentales 0 (12 d) y 3 (9 d). En el momento en que se insertó el dispositivo se limpió el área de la vulva y se colocó en el aplicador gel lubricante y pomada bactericida (FURACINE®, PiSA, México) en el aplicador para prevenir infecciones. El retiro del dispositivo se llevó a cabo el día 12 para todos los tratamientos, momento en que se aplicó las dosis de eCG (200 UI o 300 UI).

6.6 Detección de estros, retorno al estro y diagnóstico de gestación

La detección del estro inició a las 24 h después de remover el CIDR, mediante monta controlada con machos de probada fertilidad, posteriormente se monitoreó cada 6 horas, durante 72 h para determinar la duración y término del estro. Las ovejas recibieron tres montas; la primera al inicio del estro, y dos posteriores a intervalos de 12 h. El retorno al estro se detectó en dos periodos (mañana y tarde) de los 15 a los 18 días después de las montas con machos fértiles. Las ovejas de retorno recibieron tres montas. El diagnóstico de gestación se realizó 30 y 60 días posteriores a las montas por medio de un ultrasonido Sonovet 600®, con transductor lineal de 7.5 Mhz vía transrectal para observar estructuras embrionarias (Figura 2).

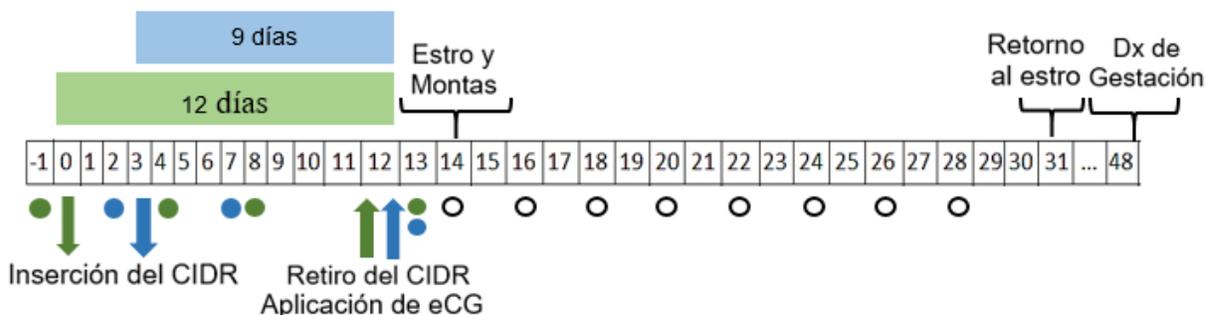


Figura 2. Protocolo experimental de sincronización de estros en ovejas primíparas con CIDR reutilizado más la aplicación de eCG al retiro del dispositivo. Los círculos indican los muestreos sanguíneos.

6.7 Muestreo sanguíneo

Para la toma de muestras sanguíneas se realizó un submuestreo de 10 ovejas/tratamiento con condición corporal similar para evaluar los niveles de P_4 . Las muestras se colectaron en tubos de polipropileno (5 mL) mediante punción de la vena yugular a las 8:00 am un día antes de la inserción del CIDR, los días experimentales 2, 4, 7 y 8 durante el tratamiento, dos días después del retiro del dispositivo y posteriormente cada 48 h. Todas las muestras se centrifugaron a 1,500 g por 20 min a 4 °C para separar el suero sanguíneo, el cual se almacenó en tubos Eppendorf a -20 °C hasta su análisis hormonal.

6.8 Análisis hormonal

Para determinar las concentraciones de P_4 , se realizó un radioinmunoanálisis (RIA) con un kit comercial PROGEST-CTRIA® (CIS-BIO INTERNATIONAL FRANCIA) con un coeficiente de variación intra e inter ensayo de 4.1 y 8.7, respectivamente y una sensibilidad de 0.05 ng/mL⁻¹.

6.9 Variables de respuesta

1) Presentación del estro. Corresponde al número de ovejas que mostraron estro posterior al retiro del dispositivo; 2) Inicio del estro. Se refiere al lapso de tiempo (horas) transcurrido a partir de que el dispositivo se retiró hasta que la oveja permaneció inmóvil y permitió la monta por el carnero; 3) Duración del estro.

Corresponde al tiempo (horas) transcurrido desde el comienzo del estro hasta que la oveja dejó de permitir la monta; 4) Porcentaje de retorno al estro. Se refiere al número de ovejas que presentaron estro a los 17 días posteriores a la monta; 5) Porcentaje de gestación. Corresponde al número de ovejas que quedaron gestantes del total de ovejas que recibieron monta; 6) Índice de prolificidad. Es el número de corderos nacidos del total de ovejas paridas; 7) Tipo de parto. Se refiere al número de crías paridas por la misma oveja.

6.10 Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar con un arreglo factorial 2x2, donde los efectos principales fueron el tiempo de permanencia del CIDR reutilizado y la aplicación de eCG, con dos niveles 9 y 12 días, y 200 y 300 UI, respectivamente. Las variables presentación de estro, retorno al estro, porcentaje de gestación, índice de prolificidad y tipo de parto se analizaron con una prueba de X^2 mediante el procedimiento PROC FREQ de SAS y para las variables inicio y duración de estro se realizó una comparación de medias con la prueba de Tukey, mediante el procedimiento PROC GLM (SAS, 2010).

Las concentraciones de P_4 se analizaron con el procedimiento PROC MIXED y una prueba de comparación de medias de Tukey. La comparación entre las medias de los tratamientos ($P \leq 0.05$) se analizó mediante la prueba de Tukey.

El modelo estadístico es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + AE_{ij} + \varepsilon_{ijk}. \text{ Donde:}$$

$i = 1, 2$ número de niveles del factor A.

$j = 1, 2$ número de niveles del factor B.

$k = 1, 2, \dots, r$ número de repeticiones de cada combinación A*B

Y_{ijk} = valor de la variable respuesta correspondiente a la repetición k del nivel i de A al nivel j de B .

μ = media general,

A_i efecto del nivel i de A ,

B_j efecto del nivel j de B ,

AB_{ij} interacción $A*B$, correspondiente al nivel i de A y del nivel j de B ,

ε_{ijk} = error experimental correspondiente a la repetición k del nivel i de A al nivel de j de B .

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Presentación del estro

La presentación del estro no fue diferente entre tratamientos ($P=0.285$); sin embargo, con la dosis de 200 UI de eCG incrementó ($P=0.078$) la presentación de estros en las ovejas (Cuadro 2). El alto porcentaje de ovejas que manifestaron un comportamiento estral (95.31%) en respuesta al CIDR reutilizado sugiere que los CIDR en el segundo uso aún contienen suficiente P_4 disponible para causar el bloqueo de LH y permitir al cerebro ser capaz de responder a las concentraciones de estradiol circulantes para que se pueda generar en la hembra el comportamiento estral (Turzillo *et al.*, 1998; Swelum *et al.*, 2018a). En estudios anteriores se ha comprobado que la reutilización por tercera vez en protocolos cortos cuando se asocian con la hormona eCG y un agente luteolítico aún es viable para la sincronización y/o inducción del estro y la ovulación en ovejas sin perjudicar los porcentajes de manifestación estral (Pinna *et al.*, 2012; Bazzan *et al.*, 2013; Vilariño *et al.*, 2013; Da Silva *et al.*, 2014) ya que la eCG favorece el crecimiento folicular y la consecuente producción de estradiol (Murphy, 2012).

Cox *et al.* (2012) al aplicar un protocolo de 7 días con CIDR reutilizado junto con la inyección de 0.125 mg de cloprostenol y 350 UI de eCG al retiro del dispositivo, obtuvieron 95.7% de ovejas que mostraron estro en época reproductiva. Estos resultados difieren con lo reportado por Güngör *et al.* (2009) quienes obtuvieron el 66.67% de hembras en estro al evaluar el uso de CIDR reutilizado durante 12 días junto con la aplicación de 500 UI de eCG en ovejas multíparas en anestro y con Biehl *et al.* (2019) quienes encontraron en ovejas multíparas cíclicas un porcentaje de estro del 70% con CIDR reutilizado en protocolos de 7 u 11 días más la aplicación de 300 UI de eCG y 6.70 mg de Dinoprost al retiro del dispositivo. Aunque en la presente investigación no se usó un agente luteolítico al final del tratamiento, el alto porcentaje de estros observados puede ser atribuido al uso de eCG y a la mayoría de ovejas (85.94%) que al inicio de los tratamientos presentaron niveles de P_4 mayores a 1ng/mL, lo que sugiere que la mayoría se encontraban en un ciclo ovárico regular.

Cuadro 2. Variables reproductivas en ovejas primaras tratadas con CIDR reutilizado (9 o 12 días de permanencia) y eCG (200 o 300 UI) al retiro del dispositivo.

	CIDR9 + eCG200 (n=16)	CIDR9 + eCG300 (n=16)	CIDR12 + eCG200 (n=16)	CIDR12 + eCG300 (n=16)	P- value CIDR * eCG	P- value CIDR	P- value eCG
Presentación del estro (%)	100	87.50	100	93.75	0.285	0.577	0.078
Inicio del estro (h)	32.62±2.18	30.00±2.35	31.12±2.73	30.80±2.50	0.495	0.792	0.215
Duración del estro (h)	36.37±3.19	34.71±2.67	37.12±2.94	35.20±3.56	0.610	0.574	0.227
Retorno al estro (%)	12.50	18.75	6.25	6.25	0.629	0.269	0.691
Gestación (%)	87.50	81.25	87.50	93.75	0.771	0.453	1.000
Índice de prolificidad	1.21 ^{bc}	1.20 ^c	1.31 ^{ab}	1.44 ^a	0.001	0.001	0.823
Tipo de parto							
Sencillo %	78.57 ^a	66.66 ^{ab}	56.25 ^b	56.25 ^b	0.001	0.001	0.072
Doble %	21.43 ^b	26.66 ^b	37.50 ^{ab}	43.75 ^a	0.001	0.001	0.044

a,b,c Diferentes superíndices dentro de las filas indica diferencia estadística ($P < 0.05$). Medias \pm SE de inicio y duración del estro. T1: CIDR durante 9 días más 200 UI eCG en el retiro; T2: CIDR durante 9 días más 300 UI eCG en el retiro; T3: CIDR durante 12 días más 200 UI eCG en el retiro; T4: CIDR durante 12 días más 300 UI eCG en el retiro.

7.2 Tiempo y duración del estro

El tiempo al inicio del estro y la duración del estro no fueron diferentes entre tratamientos ($P > 0.05$); no obstante, fueron sincronizados aproximadamente de 30 a 32 horas y de 34 a 36 horas, respectivamente después de retirar el dispositivo. Estos resultados difieren de los registrados por Pinna *et al.* (2012) quienes obtuvieron un intervalo al estro de 46.1 ± 14.1 h y una duración de estro de 52.5 ± 1.2 h en ovejas en anestro con el reuso del CIDR durante 5 días en conjunto con la aplicación de 5 mg de Dinoprost y 300 UI de eCG un día antes del retiro del dispositivo. Aunque no hubo

diferencia significativa por efecto de la dosis de eCG, las ovejas que recibieron 300 UI eCG mostraron una sincronía más temprana y compacta del estro. La adición de eCG en los protocolos con CIDR nuevos o reutilizados reduce el intervalo entre el celo y la ovulación y aumenta el diámetro del CL en el día 10 después del celo (Cox *et al.*, 2012); sin embargo, la variación en la respuesta ovárica posterior al tratamiento con eCG en programas reproductivos en ovejas se debe a las diferencias en las dosis empleadas, tipo de raza, nivel nutricional, variación estacional, estado ovárico y tiempo de aplicación de eCG (Shahneh *et al.*, 2006; Rad y Farzaneh, 2007; Moakhar *et al.*, 2012).

7.3 Concentración de progesterona (P₄) en ovejas primaras

Durante la permanencia de los dispositivos CIDR reutilizados (imitación de la fase luteal) la concentración de P₄ fue más alta (P<0.05) con el tratamiento CIDR12+eCG300 en comparación con los demás grupos (Figura 3). En todos los tratamientos, la concentración de P₄ se mantuvo por arriba de 1 ng/mL y fueron descendiendo a finales del tratamiento, en coincidencia con la presentación del estro. Posteriormente, las concentraciones de P₄ fueron mayores (P<0.05) con el tratamiento CIDR12+eCG300, sólo durante los primeros 5 días después de las montas (presencia de CL funcional). La alta concentración de P₄ en los tratamientos con una duración de 12 días en comparación con los de 9 días, probablemente se deba a una mayor concentración de P₄ endógena al comienzo del protocolo y a una mayor tasa de absorción del progestágeno exógeno, lo que también se reflejó en una mejor fertilidad con el tratamiento largo. Además, existe evidencia de una relación entre las concentraciones de P₄ durante los tratamientos, el recambio folicular ovárico y la fertilidad en ovejas (Vilariño *et al.*, 2013).

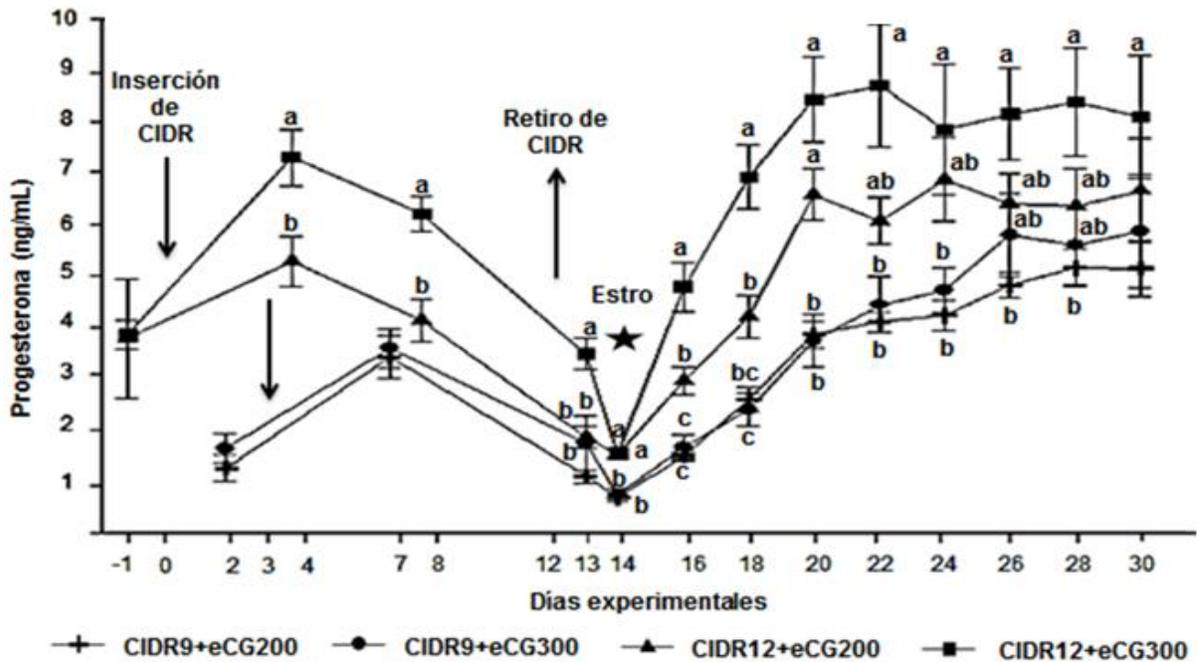


Figura 3. Concentración promedio de progesterona desde la colocación del CIDR reutilizado hasta su retiro y el ciclo estral posterior en ovejas primaras. Valores con distinta letra indican diferencias ($P < 0.05$). T1: CIDR durante 9 días más 200 UI eCG en el retiro; T2: CIDR durante 9 días más 300 UI eCG en el retiro; T3: CIDR durante 12 días más 200 UI eCG en el retiro; T4: CIDR durante 12 días más 300 UI eCG en el retiro.

La elevación de la concentración de P_4 en suero influida por la liberación de P_4 del dispositivo causa la regresión de folículos persistentes e inhibe la liberación de gonadotropinas desde la hipófisis anterior, lo que permite el bloqueo del comportamiento estral y la ovulación hasta el momento del retiro del dispositivo (Swelum *et al.* 2018a). Posteriormente, la inhibición desaparece al retiro del dispositivo, lo que provoca el estímulo de la liberación de GnRH del hipotálamo que a su vez influye en el aumento preovulatorio de LH y FSH que da lugar al reinicio de la actividad ovárica que culmina con la ovulación (Laven, 2019; Martínez-Ros *et al.*, 2019a).

En trabajos anteriores se encontró que las concentraciones séricas de P₄ son menores con los dispositivos reutilizados que con los dispositivos nuevos, a pesar de ello, los dispositivos de segundo o tercer uso son tan efectivos como los dispositivos nuevos para sincronizar el estro y la ovulación cuando se utilizan en protocolos de corta duración tanto en ovejas en época reproductiva como en anestro (Cox *et al.*, 2012; Pinna *et al.*, 2012; Vilariño *et al.*, 2013). Por otro lado, Swelum *et al.* (2015b) al evaluar dispositivos reutilizados hasta por seis veces en ovejas cíclicas durante un protocolo corto de sincronización, no encontraron diferencias en la concentración de P₄ entre tratamientos, pero sólo obtuvieron un mayor porcentaje de respuesta al estro, gestación, fertilidad y parto doble con el dispositivo nuevo y usado por segunda vez.

7.4 Porcentaje de gestación, retorno al estro e índice de prolificidad

El porcentaje de gestación y de retorno al estro no difirieron entre tratamientos (P<0.05) con respecto a la duración del CIDR reutilizado o la dosis de eCG en ovejas primíparas (Cuadro 2). Cabe mencionar que las ovejas que presentaron estro a los 17 días posmonta quedaron gestantes (excepto una en el tratamiento CIDR9+eCG300), lo que sugiere que, aunque no todas las ovejas quedaron gestantes en el primer estro, en el segundo estro estaban preparadas fisiológicamente para ovular un folículo sano. El promedio del porcentaje de gestación de todos los tratamientos con CIDR reutilizados fue de 87.50%, valor mayor a los reportados por Da Silva *et al.* (2014) quienes evaluaron la aplicación de CIDR de primer, segundo y tercer uso en protocolos cortos junto con la inyección de 0.263 mg de PGF_{2α} y 250 UI de eCG al retiro del dispositivo (73.3, 72.7 y 64.7%, respectivamente) en ovejas cíclicas. Así como también a los obtenidos por Swelum *et al.* (2018b) quienes obtuvieron en el segundo uso del dispositivo CIDR el 65% de gestación en ovejas con inseminación natural en época reproductiva.

Los resultados confirman lo reportado por Biehl *et al.* (2019) quienes concluyen que el porcentaje de gestación no es afectado por la reutilización del CIDR, tanto en protocolos de sincronización largos como en cortos al ser inseminadas las ovejas durante la época reproductiva y por Güngör *et al.* (2009) al aplicar un protocolo largo

con CIDR reutilizado en ovejas en anestro con monta natural. Sin embargo, el porcentaje de gestación y la fertilidad puede ser afectado por el tiempo en que los dispositivos sean usados con anterioridad (Swelum *et al.*, 2018b) y el tipo de reproducción que se utilice, ya sea con monta natural o con inseminación artificial (IA) (Pinna *et al.*, 2012).

En cuanto al índice de prolificidad obtenido del tratamiento CIDR12+eCG300 fue el más alto (1.44) y diferente ($P=0.001$) de los tratamientos CIDR9+eCG200 (1.21) y CIDR9+eCG300 (1.20), sin presentar diferencias con el grupo CIDR12+eCG200 (1.31); sin embargo, con la permanencia del CIDR reutilizado por 12 días el índice de prolificidad aumentó ($P=0.001$) 13% (1.37) más que con la permanencia de 9 días (1.20). Estos resultados se pueden atribuir al correcto desarrollo de cuerpos lúteos funcionales y al incremento de la P_4 secretada por los mismos para proporcionar al endometrio las condiciones adecuadas durante la implantación del embrión y para el mantenimiento de la gestación. Cabe mencionar que en el tratamiento CIDR9+eCG200 se presentó el aborto de dos corderos en dos ovejas durante el último tercio de la gestación.

De acuerdo con Vilariño *et al.* (2013), existe una relación entre las concentraciones de progesterona durante los tratamientos con CIDR reutilizados, el recambio folicular ovárico y la fertilidad en ovejas. Además, Cox *et al.* (2012) aseguran que el aumento en el tamaño de los cuerpos lúteos 10 días después del estro en ovejas tratadas con eCG está relacionado con la ovulación de un mayor número de folículos funcionales. Por otra parte, la síntesis de interferón tau (INT_{τ}) por parte del embrión está correlacionada positivamente con la producción de progesterona, por lo que cantidades altas de progesterona circulante en la hembra, mejoran el desarrollo embrionario mediante el reconocimiento de la gestación al aumentar la producción de INT_{τ} , lo que favorece la supervivencia embrionaria (Kerbler *et al.*, 1997).

7.5 Tipos de partos en ovejas primaras

Con respecto al parto doble, el tratamiento CIDR12+eCG300 obtuvo el mayor índice ($P=0.001$) con 43.75% y el menor fue de 21.43% con el tratamiento CIDR9+eCG200, sin diferencias entre el último mencionado y los grupos CIDR9+eCG300 y CIDR12+eCG200 (26.66 y 37.50%, respectivamente). Los tratamientos de 12 días de permanencia del dispositivo influyeron significativamente ($P=0.001$) en la incidencia del parto doble y la dosis de 300 UI de eCG incrementó ($P=0.044$) la aparición del parto doble, lo que puede atribuirse al mayor número de folículos maduros ovulados durante el estro. Esto contrasta con lo reportado por Swelum *et al.* (2018b) quienes obtuvieron partos dobles con CIDR nuevos (42.9%) y con CIDR reusados por segunda vez (63.16%) en combinación con 300 UI de eCG, sin diferencia estadística con dispositivos reusados hasta seis veces, los cuales sólo propiciaron la presentación de partos simples en ovejas en época reproductiva. Además, en estudios anteriores se ha demostrado que las características del folículo ovulatorio y la subsiguiente fase lútea no difieren entre ovejas tratadas con dispositivos de primer, segundo o tercer uso (Pinna *et al.*, 2012; Vilariño *et al.*, 2013). Por otra parte, la adición de eCG en programas de sincronización en ovejas aumenta la tasa de ovulación lo que desencadena partos múltiples en mayor proporción (Murphy, 2012).

VIII. CONCLUSIONES

De acuerdo a las condiciones del presente experimento se puede concluir que la reutilización del CIDR por primera ocasión en ovejas primaras libera cantidades suficientes de progesterona para bloquear la ovulación y sincronizar el estro. Los mejores resultados en la eficiencia reproductiva principalmente en el índice de prolificidad y partos dobles fueron obtenidos cuando el CIDR reutilizado fue insertado durante 12 días en combinación con una inyección de 300 UI de eCG al retiro del dispositivo.

IX. LITERATURA CITADA

- Abecia, J.A., y F. Forcada. 2010. Bases fisiológicas de la reproducción en la oveja. En: Manejo reproductivo en ganado ovino. SERVET, pp. 1-17.
- Abecia, J.A., F. Forcada, and A. González-Bulnes. 2011. Pharmaceutical control of reproduction in sheep and goats. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 27: 67-79.
- Abecia, J.A., F. Forcada, and A. González-Bulnes. 2012. Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Animal Reproduction Science*, 130 (3-4): 173-179.
- Abecia, J.A. y F. Forcada. 2017. Efectos de la nutrición sobre la reproducción en la oveja. *Revista Albéitar*, 204:22-24.
- Aké-López J.R., F.G. Centurión-Castro, J.G. Magaña-Monforte, J.R. Aké-Villanueva. 2014. Efecto del progestágeno y de la dosis de gonadotropina coriónica equina en la sincronización del estro y la tasa de gestación en ovejas pelibuey inseminadas por laparoscopia. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 1(3): 261-268.
- Aké-Villanueva, J.R., J.R. Aké-López, J.C. Segura-Correa, J.G. Magaña-Monforte, N.Y. Aké-Villanueva. 2018. Factors affecting conception rate of hair ewes after laparoscopic insemination with chilled semen under tropical conditions. *Small Ruminant Research*, 153: 114-117.
- Altınçekiç, Ş.Ö., and M. Koyuncu. 2018. Importance of characterization of the vaginal microbiota in ewes and nannies. *Journal of Animal Production*, 59(1): 59-65.
- Álvarez, L., D. Gamboa, L. Zarco, and R. Ungerfeld. 2013. Response to the buck effect in goats primed with CIDRs, previously used CIDRs, or previously used autoclaved CIDRs during the non-breeding season. *Livestock Science*, 155(2-3): 459-462.
- Amiridis, G. S., and S. Cseh. 2012. Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants. *Animal Reproduction Science*, 130(3-4): 152-161.
- Arellano-Lezama T., J.A. Hernández-Marín, C. Cortez-Romero, G. Morales-Terán, and J. Gallegos-Sánchez. 2013. "Efecto macho" en el manejo reproductivo de la oveja. *AGRO Productividad*, 6(6): 3-8.
- Arroyo, J. 2011. Estacionalidad reproductiva de la oveja en México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14(3): 829-845.

- Atuesta, J.E. y A.M.G. Diaza. 2011. Control hormonal del ciclo estral en bovinos y ovinos. *Revista Spei Domus*, 7(14): 15-25.
- Baby, T.E. and P.M. Bartlewski. 2011. Circulating concentrations of ovarian steroids and follicle-stimulating hormone (FSH) in ewes with 3 or 4 waves of antral follicle emergence per estrous cycle. *Reproductive Biology*, 11(1): 19-36.
- Barret, D.M.W., P.M. Bartlewski, M. Batista-Arteaga, A. Symington, and N.C. Rawlings. 2004. Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to a single dose of 500 UI of eCG following a 12-day treatment with progesterone releasing intravaginal sponges in the breeding and nonbreeding season in ewes. *Theriogenology*, 61(1-3): 311-327.
- Bartlewski, P.M., T.E. Baby, J.L. Giffin. 2011. Reproductive cycles in sheep. *Animal Reproductive Science*, 124(3-4):259-268.
- Bartlewski, P.M., J. Sohal, V. Paravinja, T. Baby, M.E.F. Oliveira, M. Murawski, T. Schwarz, D.A. Zieba, and D.H. Keisler. 2017. Is progesterone the key regulatory factor behind ovulation rate in sheep? *Domestic Animal Endocrinology*, 58: 30-38.
- Bazzan, A.P., D. Tedesco, A.L. Menestrina, S.A. Machado, R.X. da Rocha, and J.F.M. Bragança. 2013. Re-utilization of an intravaginal device with progesterone in the induction/synchronization of estrus in the sheep. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 108(587-588) 143-146.
- Biehl, M.V., M.V.C. de Ferraz-Junior, J.P.R. Barroso, I. Susin, E.M. Ferreira, D.M. Polizel, and A.V. Pires. 2019. The reused progesterone device has the same effect on short or long estrus synchronization protocols in tropical sheep. *Tropical Animal Health and Production*, 51(6): 1545-1549.
- Blaschi, W., P.A. Lunardelli, L.S.R. Marinho, M.C. Max, G.M.G. Santos, K.C. Silva-Santos, F.A. Melo-Sterza, H. Baldassare, T.R. Rigo, and M.M. Seneda. 2014. Effects of progesterone exposure duration on estrus synchronization and conception rates of crossbreed ewes undergoing fixed time artificial insemination. *Journal of Veterinary Science*, 15: 433-437.
- Bragança, J.F.M., J.M. Maciel, L.K. Girardini, S.A. Machado, J.F.X. da Rocha, A.A. Tonin, and R.X. da Rocha. 2017. Influence of a device intravaginal to synchronization/induction of estrus and its reuse in sheep vaginal flora. *Comparative Clinic Pathology*, 26(6): 1369-1373.
- Bruneau, G., M. Batailler, M. Belghazi, Y. Tillet, and M.R. Blanc. 2014. Evidence that histaminergic neurons are devoid of estrogen receptor alpha in the ewe diencephalon during the breeding season. *General and Comparative Endocrinology*, 199(1): 86-93.

- Capallejas, R.B. 2009. Regulación neuroendocrina del ciclo estral. En: Fisiología de la reproducción animal. Con elementos de biotecnología. Felix Valera, La Habana, pp. 63-97.
- Carlson, M.K., A.H. Pohl, J.M. Marcek, R.H. Muser, and J.E. Wheaton. 1989. Evaluation of progesterone controlled internal drug release dispensers for estrous synchronization in sheep. *Animal Reproduction Science*, 18: 205-218.
- Colazo, M.G., J.P. Kastelic, P.R. Whittaker, Q.A. Gavaga, R. Wilde, and R.J. Mapletoft. 2004. Fertility in beef cattle given a new or previously used CIDR insert and estradiol, with or without progesterone. *Animal Reproduction Science*, 81(1-2): 25-34.
- Córdova-Izquierdo, A., M.S. Córdova-Jiménez, C.A. Córdova-Jiménez, and J.E. Guerra-Liera. 2008. Procedimientos para aumentar el potencial reproductivo en ovejas y cabras. *Revista Veterinaria*, 19(1): 67-79.
- Correa, L.M. 2017. Influencia de la melatonina sobre la fisiología y la conducta de ungulados. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 19(3): 337-350.
- Cortez-Romero, C. y J. Gallegos-Sánchez. 2014. Fisiología de la reproducción en la oveja. In: Biotecnologías reproductivas, moleculares y genómicas en ovinos. Biblioteca Básica de Agricultura, pp. 23-39.
- Cox, J.F., R. Allende, E. Lara, A. Leiva, T. Díaz, J. Dorado, and F. Saravia. 2012. Follicular dynamics, interval to ovulation and fertility after AI in short-term progesterone and PGF2 α oestrous synchronization protocol in sheep. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(6): 946-951.
- Da Silva, T.B., J.F.X. da Rocha, S.A. Machado, R.X. da Rocha, P.E. Bennemann, and J.F.M. Bragança. 2014. A reutilização de um dispositivo intravaginal (CIDR-G) nas manifestações de estro e prenhez da espécie ovina. *Enciclopédia biosfera*, 10(18), 40-45.
- Darderte, H., D. Lomet, V. Robert, C. Decourt, M. Beltramo, and M.T. Pellicer-Rubio. 2016. Seasonal breeding in mammals: From basic science to applications and back. *Theriogenology*, 86:324-332.
- Dobson, H., C. Fergani, J.E. Routly, and R.F. Smith. 2012. Effects of stress on reproduction in ewes. *Animal Reproduction Science*, 130 (3-4): 135-140.
- Dos Santos-Neto, P.C., C. García-Pintos, A. Pinczak, and A. Menchaca. 2015. Fertility obtained with different progestogen intravaginal devices using short-term protocol for fixed-time artificial insemination (FTAI) in sheep. *Livestock Science*, 182: 125-128

- Echeverría, J. 2006. Endocrinología reproductiva: Prostaglandina F2 α en vacas. Revisión bibliográfica. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 7(1): 1-12.
- Escobar, E.N., E. Kassa, D. O'Brien, and H. Taylor. 2017. The induction and synchronization of estrus in sheep during the fall and late spring (season and out of season) using controlled internal drug release (CIDR) devices on Delmarva. *Journal of Animal Science*, 95(suppl_4): 39.
- Ezzat, A.A., M.N. Ahmed, M.A.E.Z. Elabdeen, A.M. Sabry. 2016. Estrus synchronization in Ossimi sheep by progestins. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*, 51(1): 207-214
- FAO, 2018. Perspectivas alimentarias. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Disponible en: www.fao.org. (Acceso agosto 2019).
- Fernandez, J., M.M. Bruno-Galarraga, A.T. Soto, R.L. de la Sota, M.I. Cueto, I.M. Lacau, and A.E. Gibbons. 2018. Hormonal therapeutic strategy on the induction of accessory corpora lutea in relation to follicle size and on the increase of progesterone in sheep. *Theriogenology*, 105(1): 184-188.
- Fierro, S., and J. Olivera-Muzante. 2017. Long interval prostaglandin as an alternative to progesterone-eCG based protocols for timed AI in sheep. *Animal Reproduction Science*, 180: 78-84.
- Fleisch, A., S. Werne, F. Heckendorn, S. Hartnack, M. Piechotta, H. Bollwein, R. Thun, and F. Janett. 2012. Comparison of 6-day progestagen treatment with Chronogest® CR and Eazi-breed™ CIDR® G intravaginal inserts for estrus synchronization in cyclic ewes. *Small Ruminant Research*, 107(2-3):141-146.
- Floriani-Ramos, A., and B.D. Marques-Silva. 2018. Hormonal protocols in small ruminants. In: *Reproduction Biotechnology in Farm Animals*. T.G. Bergstein-Galan (Ed). AvidScience. pp. 2-18.
- Franco, J. and L.F. Uribe-Velásquez. 2012. Hormonas reproductivas de importancia veterinaria en hembras domésticas ruminantes. *Biosalud*, 11(1): 41-56.
- García, E., 2004. Modifications to the system Köppen climate classification. 5th edition. Book series number 6. Institute of Geography, Universidad Autónoma de México.
- García-Pintos, C., and A. Menchaca. 2016. Luteal response and follicular dynamics induced with equine chorionic gonadotropin (eCG) administration after insemination in sheep. *Small Ruminant Research*, 136: 202-207.

- Gastal, G.D.A., C.D. Corcini, R.S. Schiavon, V.B.S. Filho, R.R. Ulguim, K.L. Goularte, and T. Lucia Jr. 2013. Reutilização de pessários vaginais após autoclavagem sobre taxas reproductivas em ovinos. *Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia*, 7(13): 2-9.
- Gatti, M., P. Zunino, and R. Ungerfeld. 2011. Changes in the aerobic bacterial mucous load after treatment with intravaginal sponges in anoestrous ewes: effect of medroxiprogesterona acetate and antibiotic treatment use. *Reproduction in Domestic Animals*, 46:205-208.
- Gómez-Chang, E., F. Larrea, and F. Martínez-Montes. 2012. Vías de señalización asociadas a la esteroidogénesis. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 15(1): 24-36.
- González-Bulnes, A., J. Santiago-Moreno, R.M. García-García, M.J. Cocero, and A. López-Sebastian. 2002. Patrones y mecanismos de control del desarrollo folicular durante la administración de protocolos superovulatorios en pequeños rumiantes. *Investigación Agraria. Producción y Sanidad Animales*, 17(1-2): 37-48.
- Goodman, R. L, and E.K. Inskeep. 2006. Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the sheep. In: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Elsevier Incorporated. pp. 2389-2447.
- Güngör, O., M. Cenesiz, S.M. Pancarci, S. Yildiz, M. Kaya, C. Kacar, N. Ozyurtlu, and K. Gurbulak. 2007. Effects of different intravaginal progesterone releasing devices on estrous synchronization and LH surge in fat-tailed ewes during non-breeding season. *Medycyna Weterynaryjna*, 63(11): 1316-1319.
- Güngör, Ö., N. Özyurtlu, S.M. Pancarci, M. Kaya, A.K. Zonturlu, H. Oral, Y. Çetin, and B. Polat. 2009. Estrous synchronization with used CIDR-G devices in ewes during non-breeding season. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15(5): 779-783.
- Hashim, N.H., Syafnir, and M. Sembiring. 2013. Time of PMSG administration: Effect on progesterone and estradiol concentration in synchronized ewes. *Biomedical Research*, 24(1): 7-12.
- Hazlerigg, D.G., H. Andersson, J.D. Johnston, and G. Lincoln. 2004. Molecular characterization of the long-day response in the Soay sheep, a seasonal mammal. *Current Biology*, 14: 334-339.
- Kerbler, T.L., M.M. Buhr, L.T. Jordan, K.E. Leslie, and J.S. Walton. 1997. Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon tau synthesis by the concepts in cattle. *Theriogenology*, 47: 703-714.

- Khan-Dawood, F.S. 2003. The ovarian cycle. In: Introduction to mammalian reproduction. Tulsiani, D. (Ed). Springer Science+Business Media, LLC. pp. 155-186.
- Kor, N.M., S. Sadeghi, and N. Ziaei. 2012. Comparison reproductive performance in Kermani ewes treated with two synchronization methods and subsequent eCG treatment out of the breeding season. International Journal of Biological & Medical Research, 3(2): 1485-1489.
- Koyuncu M. and S.O. Alticekic. 2010. Effects of progestagen and PMSG on estrous synchronization and fertility in Kivircik ewes during natural breeding season. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 23: 308-211.
- Laven, R. 2019. Pharmacological agents in the control of reproduction. 2019. In: Veterinary Reproduction and Obstetrics. Noakes, D.E., T.J. Parkinson, and C.W. England (Eds). Saunders Ltd. pp. 157-166.
- Lenz-Souza, M.I., G.F. Ramírez-Benavides, y L.F. Uribe-Velásquez. 2007. Papel del factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF-1) en la regulación de la función ovárica. Biosalud, 6: 149-159.
- Leyva, V., B. Buckrell, and J. Walton. 1998. Follicular activity and ovulation regulated by exogenous progestagen and PMSG in anestrus ewes. Theriogenology, 50: 377-393.
- Lozano-González, J.F., L.F. Uribe-Velásquez, y J.H. Osorio. 2012. Control hormonal de la reproducción en hembras ovinas (*Ovis aries*). Veterinaria y Zootecnia, 6(2): 134-147.
- Macmillan, K.L., V.K. Taufa, D.R. Barnes, and A.M. Day. 1991. Plasma progesterone concentrations in heifers and cows treated with a new intravaginal device. Animal Reproduction Science, 21: 25-40.
- Manes, J., M.A. Fiorentino, G. Kaiser, F. Hozbor, R. Alberio, E. Sanchez, and F. Paolicchi. 2010. Changes in the aerobic vaginal flora after treatment with different intravaginal devices in ewes. Small Ruminant Research, 94: 201-204.
- Manes, J., F. Hozbor, R. Alberio, and R. Ungerfeld. 2014. Intravaginal placebo sponges affect negatively the conception rate in sheep. Small Ruminant Research, 120: 108-111.
- Manes, J., y R. Ungerfeld. 2015. Sincronización de celos en ovejas y cabras con dispositivos intravaginales liberadores de progestágenos: alteraciones vaginales y su relación con la fertilidad. Revista Brasileña de Reproducción Animal, 39(1): 104-108.

- Martínez-Ros, P., S. Astiz, E. Garcia-Rosello, A. Rios-Abellan, and A. Gonzalez-Bulnes. 2018a. Onset of estrus and preovulatory LH surge and ovulatory efficiency in sheep after short-term treatment with progestagen-sponges and progesterone-CIDRs. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(2): 408-411.
- Martínez-Ros, P., M. Lozano, F. Hernández, A. Tirado, A. Rios-Abellan, M.C. López-Mendoza, and A. Gonzales-Bulnes. 2018b. Intravaginal device-type and treatment-length for ovine estrus synchronization modify vaginal mucus and microbiota and affect fertility. *Animals*, 8(12): 226-233.
- Martínez-Ros, P., A. Rios-Abellan, and A. Gonzalez-Bulnes. 2019a. Influence of progesterone-treatment length and eCG administration on appearance of estrous behavior, ovulatory success and fertility in sheep. *Animals*, 9(1): 9.
- Martínez-Ros, P., A. Gonzalez-Bulnes, E. Garcia-Rosello, A. Rios-Abellan, and S. Astiz. 2019b. Effects of short-term intravaginal progestagen treatment on fertility and prolificacy after natural breeding in sheep at different reproductive seasons. *Journal of Applied Animal Research*, 47(1): 201-205.
- Martins, L.T., dos Santos-Neto, P.C., Neto, S.G., L.P. Rauber, M. Bertolini, A.D. Vieira, and A. Mezzalira. 2010. Microbiological and functional evaluation of an alternative device (OB®) for estrous synchronization in ewes. *Ciência Rural*, 40(2): 389-395.
- Martinuk, S.D., A.W. Manning, W.D. Black, and B.D. Murphy. 1991. Effects of carbohydrates on the pharmacokinetics and biological activity of equine chorionic gonadotropin *in vivo*. *Biology of Reproduction*, 45: 598-604.
- Menchaca, A. y E. Rubianes. 2004. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*, 16: 403-413.
- Menchaca, A. y E. Rubianes. 2012. Avances en el control ovárico en la oveja. Reunión Bianual sobre Reproducción Animal, UAEM, pp.76-83. Disponible en: <https://bib.irb.hr/datoteka/598856.Compendio.pdf#page=84> (acceso agosto 2019).
- Menchaca, A., P.C. dos Santos Neto, and F. Cuadro. 2017. Estrous synchronization treatments in sheep: brief update. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 41(1): 340-344.
- Moakhar, H.K., H. Kohram, A.Z. Shahneh, and T. Saberifar. 2012. Ovarian response and pregnancy rate following different doses of eCG treatment in Chall ewes. *Small Ruminant Research*, 102: 63-67.

- Mohan, K.M. 2017a. Progesterone concentration in ewes synchronized with Controlled Internal Drug Releasing (CIDR) device. *The Pharma Innovation Journal*, 6(4): 72-74.
- Mohan, K.M. 2017b. Comparative study of reproductive efficiency in ewes synchronized with vaginal sponges and CIDR during breeding and non-breeding seasons. *The Pharma Innovation Journal*, 6(4): 75-79.
- Monniaux, D. 2016. Driving folliculogenesis by the oocyte-somatic cell dialog: Lessons from genetic models. *Theriogenology*, 86(1): 41-53.
- Morotti, F., T.R. Rigo-Barreiros, W. Blachi, and G.M. Gomes do Santos. 2016. Advances of artificial insemination in cattle. In: *Biotechnology of Animal Reproduction*. Seneda, M.M., K.C. Silva-Santos, and L.S.R. Marinho, (Eds). Nova publishers New York. pp.:47-78.
- Muñoz, C., V.H., Parraguez, y E.V. Latorre. 2002. Efecto del tiempo de inseminación artificial después de la detección de celo sobre la tasa de preñez en ovinos Corriedale. *Agricultura Técnica*, 62(4): 12-21.
- Murphy, B.D. 2012. Equine chorionic gonadotropin: an enigmatic but essential tool. *Animal Reproduction*, 9(3): 223-230.
- Muth-Spurlock, A.M., D.H. Poole, and C.S. Whisnant. 2019. Comparison of pregnancy rates in beef cattle after a fixed time AI with once- or twice- used controlled internal drug release devices. *Theriogenology*, 85: 447-451.
- Naderipour, H., J. Yadi, A.G. Shad, and M.A. Sirjani. 2012. The effects of three methods of synchronization on estrus induction and hormonal profile in Kalkuhi ewes: A comparison study. *African Journal of Biotechnology*, 11(5): 530-533.
- Nasser, S. O., H. Wahid, A.S. Aziz, A.B. Zuki, M.K. Azam, A.G. Jabbar, and M.A. Mahfoz. 2012. Effect of different oestrus synchronizations protocols on the reproductive efficiency of Dammar ewes in Yemen during winter. *African Journal of Biotechnology*, 11(37): 9156-9162.
- Nélida, R. 2000. Regulación de la expresión y liberación de la hormona liberadora (GnRH): Los glucocorticoides como inhibidores de la reproducción. Revisión. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 13(2): 136-142.
- Niswender, G.D., J.L. Juengel, P.J. Silva, M.K. Rollyson, and E.W. McIntush. 2000. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physical Review Journals*, 80: 1-29.
- Nogueira, D.M., E.S.L. Júnior, G.S. Borges, T.V.C. Nascimento, C.H.S. Costa-Barros, V.C.D. Ferrerira, and S.R. Martins. 2009. Eficiência da reutilização do

dispositivo de liberação controlada de drogas (CIDR) sobre a atividade estral e ovulatoria de ovelhas exploradas na região semi-árida: resultados parciais. 46a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. UEM, Maringá. Disponible en: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/256663> (acceso agosto 2019).

Nosrati, M., M. Tahmorespoor, M. Vatandoost, and M. Behgar. 2010. Effect of PMSG doses on reproductive performance of Kurdi ewes artificially inseminated during breeding season. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 1(2): 125-129.

Norris, D.V., and K.H. Lopez. 2011. The endocrinology of the mammalian ovary. In: *Hormone and Reproduction of Vertebrates*. Norris, D.O. and K.H. Lopez (Eds). Academic Press. pp: 59-72.

OCDE/FAO, 2017. "Carne". In: *OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2017-2026*, OECD Publishing, París. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i7465s.pdf> (acceso agosto 2019).

Olivera, M. 2007. Vías implicadas en la luteólisis bovina. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 20: 387-393.

Orizaba-Chávez, B., G.A. Alba-Jasso, y M.E. Ocharán-Hernández. 2013. Farmacocinética de la progesterona. *Revista del Hospital Juárez de México*, 80(1): 59-66.

Ozyurtlu, N., I. Kucukaslan, and Y. Cetin. 2010. Characterization of Oestrous induction response, oestrus duration, fecundity and fertility in Awassi ewes during the non-breeding season utilizing both CIDR and intravaginal sponge treatments. *Reproduction in Domestic Animals*, 45: 464-467.

Padilla-Ramírez, F.J., G.E. Mapes-Sánchez, y F. Jiménez-Krassel. 1988. Perfiles hormonales durante el ciclo estral de la oveja. *Técnica Pecuaria en México*, 26(1): 96-108.

Pak, T.R. and W.C.J. Chung. 2011. Neuroendocrine control of gonadotropins in mammals. In: *Hormones and reproduction of vertebrates*. Norris, D.O. and K.H. Lopez (Eds). Academic Press. pp: 25-43.

Pereira, P. and F. Vicente. 2013. Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet. *Meat Science*, 93(3): 586-592.

Perera-Marín, G., C. Murcia, and E. González-Padilla. 2007. Luteinizing hormone (LH) isoforms in ruminants: Characterization and physiological relevance. *Animal Reproduction Science*, 101(3-4): 187-207.

- Pinna, A.E., F.Z. Brandão, A.S. Cavalcanti, A.M. Borges, J.M.G. Souza, and J.F. Fonseca. 2012. Reproductive parameters of Santa Inês ewes submitted to short-term treatment with re-used progesterone devices. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 64(2): 33-340.
- Pinilla, L., E. Aguilar, C. Dieguez, R.P. Millar, and M. Tena-Sempere. 2012. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiological Reviews*, 92: 1235-1316.
- Pérez-Clariget, R., y A.P. Almeraya. 2008. Ovinos. En: *Reproducción de animales domésticos*. Carlos Galina y Javier Valencia (Comp). Limusa. México. pp: 457-483.
- Price, C.A., and A. Estienne. 2018. The life and death of the dominant follicle. *Animal Reproduction*, 15(Suppl. 1): 680-690.
- Rad, A.H.F., and N. Farzaneh. 2007. Effect of CIDR and different doses of PMSG on pregnancy and lambing rate out of breeding season in Balouchi ewes. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 6(10): 1157-1171.
- Rathbone, M.J., C.R. Bunt, C.R. Ogle, S. Burggraaf, K.L. Macmillan, C.R. Burke, and K.L. Pickering. 2002. Reengineering of a commercially available bovine intravaginal insert (CIDR insert) containing progesterone. *Journal of Controlled Release*, 85:105–115.
- Rosa, H.J.D. and M.J. Bryant. 2003. Seasonality of reproduction in sheep. *Small Ruminant Research*, 48: 155-171.
- Rosales-Torres, A.M., A. Guzmán-Sánchez, and C. Gutiérrez-Aguilar. 2012. Follicular development in domestic ruminant. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 15(SUP1): S147-S160.
- Rowe, J.D., L.A. Tell, and D.C. Wagner. 2009. Animal safety report on intravaginal progesterone controlled internal drug releasing devices in sheep and goats. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 32(3): 303-305.
- Russel, A.J.F., J.M. Doney, and R.G. Gunn. 1969. Subjective assessment of body fat in live sheep. *Journal of Agricultural Science*, 72: 51-54.
- Safdarian, M., M. Kafi and M. Hashemi. 2006. Reproductive performance of Karakul ewes following different oestrous synchronization treatments outside the natural breeding season. *South African Journal of Animal Science*, 36 (4): 229-234.
- SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2001. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999,

Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Diario Oficial de la Federación. 75, 113-160.

SAGARPA, 2016. Plan Rector Sistema Producto Ovinos. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación. Disponible en: http://spo.uno.org.mx/wp-content/uploads/2016/05/plan_rector_ovinos2016.pdf (acceso agosto 2019).

Sangha, G.K., R.K. Sharma, and S.S. Guraya. 2002. Biology of corpus luteum in small ruminants. *Small Ruminant Research*, 43 (1), 53-64.

Santos, M.H., M.V.C. Ferraz-Junior, D.M. Polizel, J.P.R. Barroso, A.A. Miszura, A.S. Martins, A.V. Bertoloni, G.B. Oliveira, and A.V. Pires. 2018. Decreasing from 9 to 7 days the permanence of progesterone inserts make possible their use up to 5 folds in suckled Nellore cows. *Theriogenology*, 111: 56-61.

SAS, 2010. Sistema de Análisis Estadístico. SAS Instituto de Incorporación. Cary, NC, USA.

Seekallu, S.V., B.M. Toosi, R. Duggavathi, D.M. Barret, K.L. Davies, C. Waldner, and N.C. Rawlings. 2010. Ovarian antral follicular dynamics in sheep revisited: Comparison among estrous cycles with three or four follicular waves. *Theriogenology*, 73(5): 670-680.

Senger, P.L. 2003. Regulation of reproduction. In: *Pathways to pregnancy and parturition*. Pullman (WA): Current Conceptions Inc. pp: 102-127.

Shahneh, A.Z., H.D. Tajangokeh, H.S. Panah, and A.A. Saki. 2006. Effect of controlled internal drug release device treatment duration and eCG dose on reproductive performance of seasonally anestrous fat-tailed Iranian ewes. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9(8): 1552-1555.

Shinomiya, A., T. Shimmura, T. Nishiwaki-Ohkawa, and T. Yoshimura. 2014. Regulation of seasonal reproduction by hypothalamic activation of thyroid hormone. *Frontiers in Endocrinology*, 5: 1-7.

SIAP, 2019. Expectativas de Producción Agropecuaria y Pesquera. Servicio de Información agroalimentaria y pesquera. www.siap.gob.mx

Silva-Santos, K.C., G.M.G. do Santos, P.A. Lunardelli, and C.B. Costa. 2016. Female reproductive physiology: Current concepts and advanced perspectives. In: *Biotechnology of Animal Reproduction*. Seneda, M.M., K.C. Silva-Santos, and L.S.R. Marinho (Eds). NOVA. pp. 1-25.

- Simões, J. 2015. Recent advances on synchronization of ovulation in goats, out of season, for a more sustainable production. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 4(2): 157-165.
- Simonneaux, V., and C. Ribelayga. 2003. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacological Reviews*, 55: 325-395.
- Smith, J.F., J.A. Konlechner, and J. Parr. 1991. The efficacy of used CIDR devices for synchronization of oestrus and post-mating treatment. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, 51: 111-115.
- Souza, J.M., C.A. Torres, A.L. Maia, F.Z. Brandão, J.H. Bruschi, J.H. Viana, E. Oba, and J.F. Fonseca. 2011. Autoclaved, previously used intravaginal progesterone devices induces estrus and ovulation in anestrus Toggenburg goats. *Animal Reproduction Science*, 129(1-2): 50-55.
- Souza, J.M., C.A. Torres, A.L. Maia, F.Z. Brandão, and E. Oba. 2015. Re-used progesterone device efficiently synchronises oestrus and ovulation after autoclaving process in Toggenburg goats during the breeding season. *Animal Reproduction Science*, 55: 818-822.
- Squires, E.J. 2003. Endocrine manipulation of reproduction. In: *Applied Animal Endocrinology*. CABI Publishing. pp. 154-191.
- Stenbak, T.K., A.T. Grazul-Bilska, H.R. Berginski, J.J. Bilski, A.S. Erickson, J.D. Kirsch, K.C. Kraft, C. Navanukraw, M.C. Toutges, L.P. Reynolds, D.A. Redmer. 2003. Ovulation rate in ewes synchronized with Syncro-Mate-B (SMB) and follicle stimulating hormone. *Small Ruminant Research*, 48: 1-8.
- Swelum, A.A., A.N. Alowaimer, and M.A. Abouheif. 2015a. Use of fluorogestone acetate sponges or controlled internal drug release for estrus synchronization in ewes: Effects on hormonal profiles and reproductive performance. *Theriogenology*, 85(4): 498-503.
- Swelum, A.A., A.F. Moumen, and A.N. Alowaimer. 2015b. Effect of 6 times reusing of controlled internal drug release (CIDR) for short term (6 days) on progesterone level and reproductive performance of Awassi ewes. *Reproduction Fertility Development*, 28: 136-136.
- Swelum, A.A., Moumen, A.F. and A.N. Alowaimer. 2016. The effect of withdrawal timing of controlled internal drug release (CIDR) on ewe reproductive performance. *Reproduction Fertility and Development*, 19: 119-119.

- Swelum, A.A., I.M. Saadeldin, A.F. Moumen, M.A. Ali, and A.N. Alowaimer. 2018a. Efficacy of controlled internal drug release (CIDR) treatment durations on the reproductive performance, hormone profiles, and economic profit of Awassi ewes. *Small Ruminant Research*, 166: 47-52.
- Swelum, A.A., I.M. Saadeldin, A.F. Moumen, M.A. Ali, H. Ba-Awadh, and A.N. Alowaimer. 2018b. Efficacy of using previously used controlled internal drug release (CIDR) insert on the reproductive performance, hormone profiles and economic measures of sheep. *Reproduction in Domestic Animals*, 53(5): 1114-1122.
- Tamba, S., Yodoi, R., K. Morimoto, T. Inazumi, M. Sukeno, E. Segi-Nishida, Y. Okuno, G. Tsujimoto, S. Narumiya, and Y. Sugimoto. 2010. Expression profiling of cumulus cells reveals functional changes during ovulation and central roles of prostaglandin EP₂ receptor in cAMP signaling. *Biochimie*, 92(6): 665-675.
- Turzillo, A.M., J.A. Clapper, G.E. Moss, and T.M. Nett. 1998. Regulation of ovine GnRH receptor gene expression by progesterone and oestradiol. *Journal of Reproduction and Fertility*, 113: 251-256.
- Ungerfeld R. and E. Rubianes. 1999. Effectiveness of short-term progestogen primings for the induction of fertile estrus with eCG in ewes during late seasonal anestrus. *Animal Science*, 68(3): 349-353.
- Ungerfeld, R., and E. Rubianes. 2002. Short term primings with different progestogen intravaginal devices (MAP, FGA and CIDR) for eCG-estrous induction in anestrus ewes. *Small Ruminant Research*, 46: 63-66.
- Ungerfeld, R. 2009. The induction of oestrus in ewes during the non-breeding season using pre-used CIDRs and oestradiol-17 β treatment. *Small Ruminant Research*, 84(1-3): 129-131.
- Ungerfeld, R., D. Gamboa, and L. Álvarez. 2013. Response of ewes primed with new CIDRs, previously used CIDRs, or previously used and autoclaved CIDRs to the ram effect during the non-breeding season. *Animal Reproduction*, 10(4): 704-707.
- Uribe-Velásquez, L.F., E. Oba, y M.I.L. Souza. 2008. Población folicular y concentraciones plasmáticas de progesterona (P₄) en ovejas sometidas a diferentes protocolos de sincronización. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 40: 83-88.
- Uribe-Velásquez, L.F., A. Correa-Orozco, y J.H. Osorio. 2009. Características del crecimiento folicular ovárico durante el ciclo estral en ovejas. *Biosalud*, 8: 117-131.

- Uribe-Velásquez, L.F., R. Restrepo-Cadavid, y J.H. Osorio. 2010. Cambios en la secreción de los esteroides ováricos y de la hormona luteinizante durante el ciclo estral en la oveja: una revisión. *Biosalud*, 9(1): 64-78.
- Uribe-Velásquez, L.F., J.H. Osorio y A. Correa-Orozco. 2011. El cuerpo lúteo: una visión inmunológica. *Biosalud*, 10(2): 87-100.
- Uriol, M., P. Martínez-Ros, A. Rios, T. Encinas, A. Gonzalez-Bulnes. 2019. Onset of oestrus and periovulatory events in sheep exposed to 5 and 14 days of CIDR treatment with and without eCG. *Reproduction in Domestic Animals*. (Version of record before inclusion in an issue).
- Van de Hurk, R. and J. Zhao. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, 63(6): 1717-1751.
- Vasconcelos, C.O.P., F.Z. Brandão., G.M.B. Penna., J.M.G. Souza-Fabjan, and W. Lilenbaum. 2016. Qualitative and quantitative analysis of bacteria from vaginitis associated with intravaginal implants in ewes following estrus synchronization. *Ciência Rural*, 46(4): 632-636.
- Vilariño, M., E. Rubianes, and A. Menchaca. 2013. Ovarian responses and pregnancy rate with previously used intravaginal progesterone releasing devices for fixed-time artificial insemination in sheep. *Theriogenology*, 79(1): 206-310.
- Viñoles, C., M. Forsberg, G. Banchemo, and E. Rubianes. 2001. Effect of long-term and short-term progestogen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. *Theriogenology*, 55: 993-1004.
- Weems C.W., Y.S. Weems, and R.D. Randel. 2006. Prostaglandins and reproduction in female farm animals. *The Veterinary Journal*, 171: 206-228.
- Wheaton, J.E., K.M. Carlson, H.F. Windels and L.J. Johnston. 1993. CIDR: A new progesterone-releasing intravaginal device for induction of estrus and cycle control in sheep and goats. *Animal Reproduction Science*, 33(1-4):127-141.
- Zarco, L. 2008. Endocrinología de la reproducción. En: *Reproducción de animales domésticos*. Carlos Galina y Javier Valencia (Comps). Limusa. México. pp. 59-83.
- Zelege, M., J.P.C. Greyling, L.M.J. Schwalbach, T. Muller, and J.A. Erasmus. 2005. Effect of progestagen and eCG on oestrous synchronization and fertility in Dorper ewes during the transition period. *Small Ruminant Research*, 56(1-3): 47-53.

Zuluaga, J.F., and G.L Williams. 2008. High-pressure sterilization of previously used CIDR inserts enhances the magnitude of the acute increase in circulating progesterone after insertion in cows. *Animal Reproduction Science*, 107: 30-35.

ANEXOS

Anexo A. Evaluación de protocolos hormonales con CIDR reutilizados en ovejas

Lugar	Raza	Estado fisiológico	Protocolo	Estro (%)	Gestación (%)	Prolificidad (%)	Nivel de P4 (ng/mL)	Referencia
Brasil Lat: 22° 42' S Long: 47° 37' O	Santa Inés	Epoca reproductiva multiparas	CIDR nuevo o reutilizado (primer uso de 11 días) durante 7d u 11d + 300 UI eCG y 6.70 mg Dinoprost al retiro + I.A.	Nuevo (70.3) reutilizado (70), 7d (70.8), 11d (69.6)	Nuevo (85.2), reutilizado (83.5), 7d (81), 11d (87.7).	No evaluado	No evaluado	Biehl et al. (2019)
Arabia Saudita Lat: 24° 48'N Long: 46° 31'E	Awassi	Epoca reproductiva multiparas	CIDR con uso anterior de 6, 12, 18, 24 o 30 días dentro de un protocolo de 6d + 300 UI eCG + I.A.	Nuevo (80), 6 (80), 12 (65), 18 (45), 24 (55), 30 (42).	Nuevo (68.75), 6 (81.25), 12 (53.85), 18 (44.4), 24 (54.55), 30 (37.5).	Nuevo (127.3), 6 (146.15), 12, 18, 24, 30 (100).	Nuevo (mayor nivel al tercer día), 6 (mayor nivel al retiro). Bajo nivel en los demás.	Swelum et al. (2018b)
Arabia Saudita Lat: 24° 48'N Long: 46° 31'E	Awassi	Epoca reproductiva multiparas	CIDR nuevo o segundo (6x2) o tercero (6x3) o cuarto (6x4) o quinto (6x5) o sexto (6x6) uso, durante 6 días + 300 UI eCG al retiro del dispositivo.	Nuevo (55) ^a , 6x2 (70) ^a , 6x3 (55) ^a , 6x4 (35) ^b , 6x5 (35) ^b , 6x6 (31.58) ^b .	Nuevo (-) ^a , 6x2 (65) ^a , 6x3 (30), 6x4 (30), 6x5 (30), 6x6 (15.79).	No evaluado	Nuevo (1.73), 6x2 (1.67), 6x3 (1.87), 6x4 (1.57), 6x5 (1.60), 6x6 (1.36).	Swelum et al. (2015b)

Continuación...

Lugar	Raza	Estado fisiológico	Protocolo	Estro (%)	Gestación (%)	Prolificidad (%)	Nivel de P ₄ (ng/mL)	Referencia
Uruguay 34º S Luz/obscuridad 14L:10O	Exp.1: Corriedale Exp.2: merina	Exp.1: Época reproductiva Exp.2: Anestro Multiparas	Exp.1: CIDR nuevo o 2 ^{do} uso (uso previo de 6d) o 3 ^{er} uso (uso previo de 12d) durante 6 d + 10 mg dinoprost + 300 UI eCG al retiro. Exp. 2: CIDR nuevo o 3 ^{er} uso durante 6 d + 10 mg dinoprost + 300 UI eCG al retiro + IATF.	Exp.1: Nuevo (100%), 2 ^{do} uso (77.8%), 3 ^{er} uso (80%).	Exp.2: CIDR nuevo (80.4 ^a), 3 ^{er} uso (71.4 ^b)	Exp.2: Fetos/oveja gestante 126.1% (145/115) Fetos/oveja Tratada 90.1% (145/161)	Exp.1: Mayor nivel en el nuevo y 2 ^{do} uso. Menor nivel en 3 ^{er} uso. 4 horas después de la inserción. Nuevo (24.3±3.0 ^a), 2 ^{do} uso (18.1±1.9 ^b), 3 ^{er} uso (14.4±0.7 ^b).	Vilariño et al. (2013).
Uruguay	Corriedale x Milchschat	Anestro Multiparas	CIDR nuevo (NC) o CIDR reutilizado (UC; primer uso de 10 y después de 12 días = 22 d) o esterilizado en autoclave (UAC) durante 8 d + efecto macho.	NC 17/30 (56.7) UC 8/30 (26.7) UAC 5/32 (15.6)	NC 15/30 (50.0) UC 4/30 (13.3) UAC 5/32 (15.6)	No evaluado	Mas alto en NC que en UC y UAC (p<0.001). No hubo diferencias entre UC y UAC.	Ungerfeld (2013)

Continuación...

Lugar	Raza	Estado fisiológico	Protocolo	Estro (%)	Gestación (%)	Prolificidad (%)	Nivel de P ₄ (ng/mL)	Referencia
Brasil	Santa Inés	Anestro	Exp.1: CIDR nuevo o 2 ^{do} uso o 3 ^{er} uso (primer uso de 5 d) + 300 UI eCG + 5 mg dinoprost (24h antes de la retirada del dispositivo). Exp.2: igual tratamiento + monta natural (MN) o IA laparoscópica (IAL).	Exp.2: Nuevo (92.9) 2 ^{do} uso (92.9) 3 ^{er} uso (100)	Exp.2: MN: Nuevo (78.6) 2 ^{do} uso (42.9) 3 ^{er} uso (61.5). IAL: Nuevo (23.5) 2 ^{do} uso (20) 3 ^{er} uso (33.3)	No evaluada	Exp.1: Nuevo (4.02±1.95) 2 ^{do} uso (3.03±1.58) 3 ^{er} uso (2.36±1.27).	Pinna et al. (2012).
España	Suffolk Down, Merino Alemán e híbrido de ambas razas	Anestro (Exp.1) Epoca reproductiva (Exp.2)	Exp.1: CIDR nuevo o reutilizado (primer uso de 7 d) durante 7 d + 0.125 mg de PGF _{2α} al retiro. Exp.2: CIDR nuevo o reutilizado (primer uso de 7 d) durante 7 d + 0.125 mg de PGF _{2α} y 350 UI eCG al retiro del dispositivo.	Se evaluó sólo la dinámica folicular (No hubo diferencias entre tratamientos)	No evaluada	No evaluada	Exp.1: Mas alto con el CIDR nuevo: Día 1 (5.3±1.5) Día 5 (2.5) que con el CIDR reutilizado: Día 1 (2.1±0.6) Día 7 (1.23±0.2)	Cox et al. (2012)

Continuación...

Lugar	Raza	Estado fisiológico	Protocolo	Estro (%)	Gestación (%)	Prolifricidad (%)	Nivel de P ₄ (ng/mL)	Referencia
Uruguay	Corriedale	Anestro Multiparas	CIDR (C); C12 (primer uso de 12 d) o C18 (primer uso de 18 d) o C12 + 50 µg estradiol-17β (E12) o C18 + 50 µg estradiol-17β (E18).	C12 13/33 (39.4) C18 13/43 (30.2) E12 19/19 (65.5) E18 17/53 (32.1)	C12 10/33 (76.9) C18 6/43 (14.0) E12 10/29 (34.5) E18 9/53 (17.0)	No evaluada	No evaluada	Ungerfeld (2009)
Turquia Lat.: 37°55'01" N Long.: 40°16'46" E	Awassi	Anestro Multiparas	CIDR nuevo durante 12 d + 500 UI eCG al retiro o CIDR reutilizado durante 12 d + 500 UI eCG al retiro (U-CIDR) o 500 UI eCG o 3 ml 0.9% NaCl (C).	Nuevo 13/15 (86.67) U-CIDR 10/15 (66.67) eCG 1/13 (7.69) C (0)	Nuevo 8/15 (53.33) U-CIDR 9/15 (60) eCG 1/13 (7.69) C (0)	No evaluada	Nuevo 3.28±0.28 U-CIDR 2.62±0.14 eCG 0.70±0.13 C 0.77±0.13	Güngör et al. (2009)
Uruguay	Polwarth x Ile de France	Anestro tardío Multiparas	CIDR nuevo o reutilizado: Primer uso de 6 d (U6) o de 11 d (U11) con permanencia de 6 d + 380 UI eCG en el retiro.	Nuevo 47/49 (95.9) U6 44/47 (93.6) U11 16/18 (88.9)	Nuevo 28/49 (57.1) U6 24/47 (51.1) 5/18 (27.8)	No evaluada	No evaluada	Ungerfeld y Rubianes (1999)

Anexo B. Base de datos SAS para la variable estro en ovejas primaras

```
data estro;
input animal estro tratamiento;
cards;
1 36 1
2 24 1
3 36 1
4 30 1
5 30 1
6 30 1
7 36 1
8 36 1
9 36 1
10 36 1
11 30 1
12 24 1
13 36 1
14 30 1
15 36 1
16 36 1
1 30 2
2 36 2
3 00 2
4 36 2
5 24 2
6 24 2
7 30 2
8 36 2
9 30 2
10 36 2
11 30 2
12 00 2
13 30 2
14 24 2
15 30 2
16 24 2
1 30 3
2 24 3
3 24 3
4 36 3
5 30 3
6 36 3
7 24 3
8 36 3
9 30 3
10 30 3
11 36 3
12 24 3
13 00 3
14 36 3
```

```

15 30 3
16 36 3
1 30 4
2 24 4
3 24 4
4 36 4
5 30 4
6 36 4
7 24 4
8 36 4
9 30 4
10 30 4
11 36 4
12 24 4
13 00 4
14 36 4
15 30 4
16 36 4

```

```

proc lifetest plots=(s);
time estro;
strata tratamiento;
run;

```

Anexo C. Base de datos en SAS para la variable progesterona

```

DATA IVANOVA P4 DON;
OPTIONS NODATE;
INPUT ANIMAL TRAT CONCP4 DIA;
CARDS;
1 1 1.71 2
1 1 3.12 7
1 1 1.69 13
1 1 0.66 14
1 1 1.72 16
1 1 2.8 18
1 1 3.07 20
1 1 3.49 22
1 1 3.6 24
1 1 6.65 26
1 1 5.92 28
1 1 7.39 30
2 1 0.94 2
2 1 2.93 7
2 1 1.18 13
2 1 0.89 14
2 1 1.58 16
2 1 2.25 18
2 1 3.99 20

```

2	1	5.22	22
2	1	4.99	24
2	1	4.47	26
2	1	5	28
2	1	5.75	30
3	1	1.07	2
3	1	4.26	7
3	1	1.22	13
3	1	0.25	14
3	1	1.8	16
3	1	3.54	18
3	1	4.74	20
3	1	4.47	22
3	1	5.84	24
3	1	4.77	26
3	1	5.96	28
3	1	4.95	30
4	1	1.1	2
4	1	3.54	7
4	1	0.58	13
4	1	0.25	14
4	1	1.26	16
4	1	2.32	18
4	1	4.31	20
4	1	4.4	22
4	1	3.75	24
4	1	4.61	26
4	1	5.28	28
4	1	4.05	30
5	1	0.8	2
5	1	2.67	7
5	1	0.8	13
5	1	0.64	14
5	1	1.4	16
5	1	3.07	18
5	1	4.28	20
5	1	4.35	22
5	1	4.3	24
5	1	5.38	26
5	1	5.05	28
5	1	6.09	30
1	2	0.84	2
1	2	3.84	7
1	2	0.83	13
1	2	0.67	14
1	2	1.68	16
1	2	2.69	18
1	2	5.18	20

4	1	5.28	28
4	1	4.05	30
5	1	0.8	2
5	1	2.67	7
5	1	0.8	13
5	1	0.64	14
5	1	1.4	16
5	1	3.07	18
5	1	4.28	20
5	1	4.35	22
5	1	4.3	24
5	1	5.38	26
5	1	5.05	28
5	1	6.09	30
1	2	0.84	2
1	2	3.84	7
1	2	0.83	13
1	2	0.67	14
1	2	1.68	16
1	2	2.69	18
1	2	5.18	20
1	2	6.21	22
1	2	4.83	24
1	2	6.54	26
1	2	8.57	28
1	2	5.77	30
2	2	1.25	2
2	2	1.93	7
2	2	0.66	13
2	2	0.34	14
2	2	1.61	16
2	2	2.07	18
2	2	2.93	20
2	2	4.18	22
2	2	4.04	24
2	2	4.01	26
2	2	3.24	28
2	2	3.63	30
3	2	2.71	2
3	2	4.47	7
3	2	1.48	13
3	2	0.96	14
3	2	1.32	16
3	2	1.78	18
3	2	2.43	20
3	2	2.92	22
3	2	4.33	24
3	2	2.98	26
3	2	3	28
3	2	3.43	30

4	2	0.88	2
4	2	3.45	7
4	2	0.89	13
4	2	0.46	14
4	2	1.22	16
4	2	4.31	18
4	2	2.77	20
4	2	2.86	22
4	2	2.43	24
4	2	3.72	26
4	2	3.28	28
4	2	1	30
5	2	0.85	2
5	2	2.85	7
5	2	0.85	13
5	2	0.49	14
5	2	1.98	16
5	2	2.27	18
5	2	6.12	20
5	2	6.18	22
5	2	5.71	24
5	2	5.33	26
5	2	5.72	28
5	2	6.67	30

```

PROC MIXED;
CLASS ANIMAL TRAT DIA;

MODEL CONCP4= TRAT ANIMAL(TRAT) DIA DIA*TRAT;
LSMEANS DIA TRAT DIA*TRAT/PDIFF ADJUST=TUKEY SLICE=DIA;
RUN;

/*PROC MIXED;
CLASS ANIMAL TRAT DIA;
MODEL CONCP4=TRAT ANIMAL(TRAT) DIA DIA*TRAT;
REPEATED DIA/SUB=ANIMAL (TRAT) TYPE= AR(1);
LSMEANS DIA TRAT DIA*TRAT/PDIFF ADJUST=TUKEY SLICE=DIA;
RUN;*/

/*PROC MIXED;
CLASS ANIMAL TRAT DIA;
MODEL CONCP4= TRAT ANIMAL DIA DIA*TRAT;
RANDOM ANIMAL (TRAT);
REPEATED DIA/SUB=ANIMAL (TRAT) TYPE= AR(1);
LSMEANS DIA TRAT DIA*TRAT/PDIFF ADJUST=TUKEY SLICE=DIA;
RUN;*/

PROC GLM;
CLASS ANIMAL TRAT DIA;
MODEL CONCP4=TRAT ANIMAL (TRAT) DIA DIA*TRAT;
TEST h=TRAT e=ANIMAL (TRAT);
MEANS TRAT/duncan e=ANIMAL (TRAT);
MEANS DIA/TUKEY;
LSMEANS TRAT/STDERR e=ANIMAL (TRAT);
LSMEANS DIA TRAT*DIA/STDERR;
RUN;

```