

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA



TESIS DOCTORAL

**Nuevos métodos de inducción y sincronización de celos y
ovulaciones en ganado ovino**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Zurisaday Santos Jiménez

Directores

M^a Teresa Encinas Cerezo
Antonio González de Bulnes López
Paula Martínez Ros

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA



TESIS DOCTORAL

**NUEVOS MÉTODOS DE INDUCCIÓN Y SINCRONIZACIÓN DE
CELOS Y OVULACIONES EN GANADO OVINO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Zurisaday Santos Jiménez

Directores

M^a Teresa Encinas Cerezo

Antonio González de Bulnes López

Paula Martínez Ros

Madrid, 2022

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA



TESIS DOCTORAL
NUEVOS MÉTODOS DE INDUCCIÓN Y SINCRONIZACIÓN DE
CELOS Y OVULACIONES EN GANADO OVINO

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Zurisaday Santos Jiménez

Directores

M^a Teresa Encinas Cerezo

Antonio González de Bulnes López

Paula Martínez Ros

Madrid

“Nunca, nunca tengas miedo de hacer lo correcto, especialmente si el bienestar de una persona o animal está en juego. Los castigos de la sociedad son pequeños en comparación con las heridas que infligimos a nuestra alma cuando miramos para otro lado”

Martin Luther King

DEDICATORIAS

*A mis amadas hijas Gianna y Scarlett;
y a mi esposo Manuel Guillén.
Sin ustedes, no hay inspiración.♥*

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada, quiero agradecer a ese poder superior que siempre me acompaña y me llena de bendiciones: Jehová Dios.

Por otro lado, quiero agradecer a mi comité de directores que siempre estuvieron al pendiente de mí, con sus conocimientos y paciencia me han impulsado a mejorar en cada aspecto de mi vida profesional. Gracias a la Dra. Teresa Encinas por haber aceptado ser mi tutora y directora.

Gracias a la Dra. Paula Martínez por haberme recibido siempre con gusto para trabajar en la granja experimental, donde obtuve grandes aprendizajes, quiero externarle mi admiración es una gran veterinaria e investigadora.

Y gracias al Dr. Antonio González, que le puedo decir que no ya le haya dicho; desde un principio me ayudo con el papeleo y siempre gustoso con hacerlo (o eso quiero pensar jaja). Me ha encantado conocerlo, poder trabajar con usted y aprender tantas cosas de la investigación, de lo que se debe y no se debería hacer. Gracias por siempre haber tenido tiempo para resolver mis dudas. A pesar de que teníamos un desfase horario de 7 horas. Mi querido senséi.

Gracias por todo, ha sido maravilloso haberles conocido siempre estaré eternamente agradecida. Gracias por haberme abierto las puertas de su corazón y de su hogar. Los quiero y admiro mucho. No me despidan por sé que seguiremos trabajando en conjunto.

Agradezco también a mis queridos amigos principalmente a Aitor por haberme siempre guiado con todo el trámite. Por todos los favores que me hiciste con mi matrícula, el papeleo, entre otras cosas. Gracias Aito por todo tu apoyo.

A Amparito quien siempre hizo muy amenos mis días en la granja, después de horas de trabajo, siempre me sacabas una sonrisa con tus ocurrencias. A Paquito y a Javi.

A mi Martuca, aunque solo fueron unos cuantos meses, sabes que iniciamos una hermosa amistad, eres una excelente persona, tan trabajadora y dedicada; te mereces todas las cosas hermosas con las que sueñas.

A todos los chicos de la granja que colaboraron en mis experimentos, me quede tan sorprendida por su manera de trabajar. Espero que el día de hoy ya sean grandes veterinarios, donde quiera que estén.

Gracias a mi familia por que lograron sobre llevar mi ausencia, a mis niñas que tan pequeñas las tuve que dejar; Scarlett y Gianna, gracias por haber sido fuertes saben que son la luz en el camino. Y gracias a mi adorado esposo Manuel Guillen, por tu apoyo, tus porras, y por tu ayuda en todo; gracias por ser un excelente esposo y papa, los amo.

A mis papas Ma. Guadalupe Jiménez y Francisco Santos y a mis hermanas; Rubí, Johanis y Karen, por todo su apoyo,

A mis suegros y cuñado: Manuel Guillen, Minerva Muñoz y Pablo Guillen; siempre estuve tranquila porque sé que mis hijas estaban bien con ustedes. Gracias por cuidarlas en mi ausencia siempre estaré agradecida.

A mi amiga Josefina siempre presente en las peores batallas. Brillaremos juntas no lo olvides.

¡Termino esta tesis doctoral enamorada de las ovejas!

RESUMEN

El objetivo general de la presente Memoria de Tesis fue evaluar la efectividad de los tratamientos a base de dispositivos intravaginales de liberación controlada de progestágenos (CIDR®) en combinación con hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), como alternativa al uso actual de gonadotropina coriónica equina (eCG), en ovejas en la estación de anestro y reproductiva. Para ello, se estudiaron los efectos producidos por distintos protocolos de administración de esta hormona o sus análogos sobre los parámetros reproductivos que indican el inicio y la sincronización de la actividad estral y la ovulación. Además, la influencia de distintas variables como la paridad de las hembras tratadas (nulíparas o multíparas), momento de administración (estación del año; temporada reproductiva o anestro), temporalización de la administración de los distintos preparados hormonales (duración del tratamiento con progestágenos/CIDR, separación entre retirada del CIDR® y administración de la GnRH) y utilización de diferentes vehículos en el preparado de GnRH. En el primer experimento se evaluó la respuesta reproductiva a la inducción de celos y ovulaciones en ovejas con diferente paridad (nulíparas vs multíparas). Los resultados indicaron que las ovejas nulíparas mostraron peor respuesta reproductiva durante la estación de anestro que las hembras multíparas y, ello puede condicionar la respuesta reproductiva y fertilidad tras el uso de tratamientos de sincronización de celos y ovulaciones. En base a estos resultados, en los siguientes estudios, utilizamos ovejas multíparas. En ellos, el segundo experimento tuvo como objetivo comparar el efecto del uso de un tratamiento a base de CIDR® en combinación con GnRH y un tratamiento tradicional a base de CIDR® más eCG, tanto durante la estación reproductiva como en anestro estacional. En los resultados se pudo observar que en el grupo control, que fue tratado con el protocolo tradicional, basado en eCG, no existieron diferencias en la respuesta al tratamiento por efecto de la estación; en promedio se observó una respuesta de un 93% de animales mostrando signos de celo y ovulación. Sin embargo, los protocolos basados en la administración de GnRH ofrecen rendimientos similares a los protocolos basados en eCG durante la temporada reproductiva, pero la aparición de celo se observa en menor porcentaje

durante el anestro estacional. En el tercer experimento, las ovejas fueron sincronizadas con dos dosis de prostaglandinas F2 α en un intervalo de 7 días (Grupo CON) para después dos grupos ser tratados con GnRH 32h después de la segunda administración, ya sea con GnRH en agua destilada (WAT) o GnRH en propilenglicol (PPG). Se observó que la respuesta estral en el grupo CON fue de 100%, mientras que alcanzó el 83% en el grupo PPG y el 66.7% en el grupo WAT ($p < 0.05$). La efectividad del tratamiento de GnRH en propilenglicol se probó posteriormente bajo un esquema de tratamiento con utilización de progesterona (CIDR®) por 5 días más eCG en el grupo control (Grupo eCG) o administración de GnRH en propilenglicol a 24 y 36 después de la retirada (Grupos PPG24 y PPG36), o en solución salina 56 h después de la retirada del CIDR® (Grupo GnRH56). En lo que respecta a los resultados se pudo observar que en el grupo PPG24, solo 2 de 11 ovejas (18.2%) mostraron signos de celo, lo que es estadísticamente diferente a los resultados obtenidos en los grupos PPG36 (80%), eCG (87.5%) y GnRH56 (100%). Los resultados obtenidos en el grupo PPG36 indicaron un buen agrupamiento de celos y ovulaciones, ya que el 75% de las hembras mostraron actividad estral entre las 36 y 48h y ovulación entre las 72 y 84h tras la retirada del CIDR®. En un cuarto desarrollo experimental, realizado durante el anestro estacional de acuerdo con los datos obtenidos durante la estación reproductiva, se determinó la respuesta a tratamientos con CIDR® por 7 días y posteriormente con eCG o GnRH en propilenglicol a las 36 horas (Grupo eCG vs GnRH-PPG). En el grupo tratado con eCG, el 100% de las hembras mostraron actividad estral y el 84% de ellas presentó ovulación. Sin embargo, observamos que las ovejas en el grupo GnRH-PPG no mostraron actividad estral y solo el 58% de los animales presentó ovulación. Una posible alternativa para una liberación más sostenida en el tiempo que permitiese estimular los folículos adecuadamente durante la estación no reproductiva sería ralentizar aún más la liberación de GnRH mediante el uso de geles por vía vaginal (OvuGel®). Por ello, se desarrolló un primer estudio con administración de GnRH vehiculada en gel a las 24 y 36 horas de la retirada del CIDR. Los resultados mostraron que el grupo OVG24-1 presentaba un 44% de hembras en celo y 66% ovuladas, mientras que el grupo OVG36-1 presentaba un 66% de ovejas en celo y un 77% ovuladas. Una posible hipótesis es que la liberación de GnRH fue

excesivamente temprana en el caso del grupo PPG24-1. Por ello, se realizó un segundo experimento, valorando la respuesta a una administración de OvuGel® más tardía (48 horas). En este segundo ensayo, el grupo tratado con GnRH a las 36 h fue utilizado como control (OVG36-2) para el grupo tratado a las 48h (OVG48-2). Observamos una respuesta baja al tratamiento; sólo el 40% de las hembras tratadas a las 48 h de la retirada del CIDR presentaron sintomatología de celo. En este sentido, las hembras de los grupos OVG-1, 24 y 36; tratadas con gel vaginal de GnRH durante el primer ensayo no mostraron actividad hasta 42 horas después de retirar el dispositivo, mientras que el grupo control (eCG), presentaba la actividad estral desde las 30 horas. Asumimos que la falta de un grupo control positivo tratado con eCG repercutió negativamente en la aparición de celo en las ovejas tratadas con GnRH del segundo ensayo. Resulta interesante que, independientemente del momento de aplicación de OvuGel®, de la aparición de síntomas de celo y del experimento en el que se incluyeron las hembras, los tratamientos produjeron un elevado porcentaje de ovulaciones (entre el 66,7 y el 90,0%), con una tendencia a aumentar en los tratamientos más tardíos (36 y 48 h) respecto a la retirada del CIDR®.

En conclusión, de acuerdo con los estudios realizados, determinamos que la administración de GnRH en solución salina o propilenglicol, previo a un tratamiento de progesterona, durante la estación reproductiva, puede ser una opción viable al uso de eCG, ya que induce la aparición de celos y sincroniza la ovulación. Por otro lado, la respuesta puede ser menor y con baja sintomatología de celo en caso de utilizarse en hembras fuera de la estación reproductiva, pero se puede adaptar este tratamiento a inseminación a tiempo fijo.

ABSTRACT

The general objective of this Thesis Report was to evaluate the effectiveness of treatments based on intravaginal progestogen controlled release devices (CIDR®) in combination with gonadotropin-releasing hormone (GnRH), as an alternative to the current use of equine chorionic gonadotropin (eCG) in ewes in the anestrus and reproductive season. For this purpose, the effects induced by different administration protocols of this hormone, or its analogues, on reproductive parameters in ewes were studied, and the influence of different variables such as the reproductive status of the treated females (nulliparous or multiparous), time of administration (time of the year; reproductive season or anestrus), timing of administration of the different hormonal preparations (duration of treatment with progestogens/CIDR, interval between withdrawal of CIDR® and administration of GnRH) and use of different vehicles in the GnRH preparation. The first experiment evaluated the reproductive response to estrus and ovulation induction in ewes with different parity (nulliparous vs. multiparous). The results indicated that nulliparous ewes showed worse reproductive response during the anestrus period than multiparous ewes, and this may condition the reproductive response and fertility after the use of synchronization of estrus and ovulation treatments. Based on these results, we used multiparous ewes in the following studies. The objective of the second experiment was to compare the effect of the use of a treatment based on CIDR® in combination with GnRH and a traditional treatment based on CIDR® plus eCG, both during the reproductive season and during seasonal anestrus. The results showed that there were no differences in the response to treatment due to seasonal effects in the control group, which was treated with the traditional eCG-based protocol; on average, 93% of animals showed signs of estrus and ovulation. However, protocols based on GnRH administration offer similar performances to eCG-based protocols during the breeding season, but the occurrence of estrus is greatly compromised during seasonal anestrus. In the third experiment, ewes were synchronized with two doses of prostaglandin F₂α at a 7-day interval (CON group) and then two groups were treated with GnRH 32h after the second administration with either GnRH in distilled water (WAT) or GnRH in propylene glycol (PPG). It was observed that the estrous response in the CON group was 100%, while it

reached 83% in the PPG group and 66.7% in the WAT group ($p < 0.05$). The effectiveness of GnRH treatment in propylene glycol was subsequently tested under a treatment scheme using progesterone (CIDR®) for 5 days plus eCG in the control group (eCG group) or administration of GnRH in propylene glycol at 24 and 36 after withdrawal (PPG24 and PPG36 groups), or in saline 56 h after withdrawal of CIDR® (GnRH56 group). Regarding the results, in the PPG24 group, only 2 of 11 ewes (18.2%) showed signs of estrus, which is statistically different from the results obtained in the PPG36 (80%), eCG (87.5%) and GnRH56 (100%) groups. The results obtained in the PPG36 group indicated good grouping of estrus and ovulation, since 75% of the females showed estrous activity between 36 and 48h and ovulation between 72 and 84h after CIDR® withdrawal. In a fourth experimental development, carried out during the seasonal anestrus according to the data obtained during the reproductive season, the response to treatment with CIDR® for 7 days and subsequently with eCG or GnRH in propylene glycol at 36 hours was assessed (eCG vs. GnRH-PPG group). In the group treated with eCG, 100% of the females showed estrous activity and 84% of them presented ovulation. However, we observed that ewes in the GnRH-PPG group did not show estrous activity and only 58% of the animals showed ovulation. A possible alternative for a more sustained over time release of GnRH to stimulate the follicles adequately during the non-reproductive season would be to further slow down the release of GnRH by using vaginal gels (OvuGel®). Therefore, a first study was carried out with the administration of GnRH in gel at 24 and 36 hours after the withdrawal of the CIDR; the results showed that the OVG24-1 group had 44% of females in estrus and 66% ovulated, while the OVG36-1 group had 66% of ewes in estrus and 77% ovulated. One possible hypothesis is that GnRH release was excessively early in the case of the PPG24-1 group. Therefore, a second experiment was performed, assessing the response to a later OvulGel® administration (48 h). In this second trial, the group treated with GnRH at 36 h was used as a control (OVG36-2) for the group treated at 48h (OVG48-2). We observed a low response to treatment; only 40% of the females treated at 48 h after CIDR withdrawal showed estrus signs. In this regard, females treated with GnRH vaginal gel during the first trial (OVG-1, 24 and 36 groups) did not show estrous activity until 42 h after device removal, while the control group

(eCG) presented estrous activity from 30 h onwards. We assumed that the lack of a positive control group treated with eCG in the second trial had a negative impact on the appearance of estrus in the GnRH-treated ewes. Interestingly, the treatments produced a high percentage of ovulations (between 66.7 and 90.0%), with a tendency to increase in the later treatments (36 and 48 h) with respect to the withdrawal of CIDR®. regardless of the time of application of OvuGel®.

In conclusion, we determined that the administration of GnRH in saline or propylene glycol solution during the reproductive season can be a viable option to the use of eCG, since it induces the onset of estrus and synchronizes ovulation. On the other hand, the response may be lower and with low estrus signs outside the reproductive season, but the treatment can be adapted to fixed-time insemination without estrus detection.

ÍNDICE

1.INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. IMPORTANCIA DE LA PRODUCCIÓN DE OVINOS EN EL MUNDO.....	1
1.1.1. PRODUCCIÓN DE OVINOS EN EUROPA.....	4
1.1.2. PRODUCCIÓN DE OVINOS EN LATINOAMÉRICA.....	9
1.2. BASES FISIOLÓGICAS Y MANEJO DE LA REPRODUCCIÓN EN GANADO OVINO ...	14
1.2.1. INICIO DE LA ACTIVIDAD REPRODUCTIVA.....	14
1.2.2. ACTIVIDAD CÍCLICA ESTACIONAL.....	17
1.3. FISIOLOGÍA DEL CICLO ESTRAL.....	21
1.3.1. FASE FOLICULAR. DESARROLLO Y CRECIMIENTO.....	22
1.3.2. FASE LÚTEA. FORMACIÓN DEL CUERPO LÚTEO.....	24
1.4. CONTROL DEL CICLO ESTRAL MEDIANTE TRATAMIENTOS HORMONALES.....	27
1.4.1. PROGESTERONA Y SUS ANÁLOGOS SINTÉTICOS MÁS eCG.....	27
1.4.2. USO DE eCG, OPINIÓN PÚBLICA Y BIENESTAR ANIMAL.....	31
1.5. TRATAMIENTOS ALTERNATIVOS AL USO DE eCG.....	33
1.5.1. ANÁLOGOS DE HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROPINAS (GnRH) ..	33
1.5.2. PROSTAGLANDINA F _{2α} Y SUS ANÁLOGOS.....	41
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	45
2.1. JUSTIFICACIÓN.....	45
2.2. OBJETIVO GENERAL.....	46
2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	46
3. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	48
4. DISCUSIÓN GENERAL.....	96
5. CONCLUSIONES GENERALES.....	105
6. REFERENCIAS.....	107
7. ANEXO 1. Otros trabajos científicos relacionados con la tesis doctoral.....	121

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de la población ovina en el mundo.	2
Figura 2. Tendencia de la producción mundial de leche de oveja desde 1960 hasta 2016 (línea continua) y pronóstico hasta 2030 utilizando un modelo de serie temporal (línea discontinua)	3
Figura 3. Censo total de la distribución de ovinos en los países pertenecientes a la Unión Europea (UE)	5
Figura 4. Representación gráfica de las explotaciones de ganado ovino en España	5
Figura 5. Representación gráfica de la distribución de carne de ovino	7
Figura 6. Representación gráfica de la producción de lana en España desde 2014-2020. .	8
Figura 7. Representación gráfica de los estados con mayor producción de carne de ovino para el año 2021 en México.	11
Figura 8. Estados con mayor producción de lana en México en el año 2021.	11
Figura 9. Regulación por retroalimentación de las funciones testicular (A) y ovárica (B)..	14
Figura 10. Cambios en la secreción hipotalámica de GnRH antes y después de la pubertad.	15
Figura 11. Las corderas nacidos en primavera alcanzaron la pubertad a una edad mucho más joven (6-7 meses) pero menos sincronizada (66 días) entre el primer y último ciclo de los corderos. Por otro lado, todos (100%) de las corderas nacidos en otoño comenzaron a ciclar con 17 días de diferencia entre los 12 y 12,5 meses de edad.	16
Figura 12. Reproducción estacional en la oveja. Durante la temporada de reproducción, se producen ovulaciones fértiles, con apareamiento y preñez; durante el anestro las ovejas no ovulan hasta la próxima temporada de cría.....	18
Figura 13. Representación esquemática de una sección sagital del cerebro de una oveja. La línea punteada negra representa el camino de información de la luz del ojo (1) hacia la glándula pineal (5) a través del núcleo supraquiasmático (2), el núcleo paraventricular del hipotálamo (3) y los ganglios cervicales superiores (4). Área preóptica (APO), comisura anterior (CA), ventrículo lateral (VL), eminencia media (EM), glándula pineal (GP), bulbo olfatorio (BO), cuarto ventrículo (4V).	20
Figura 14. Representación esquemática de los perfiles hormonales y el desarrollo folicular durante el ciclo estral de la oveja FSH. (hormona estimulante del folículo), LH (hormona luteinizante), PGF _{2α} (Prostaglandinas F _{2α}).....	22
Figura 15. Cambios que tienen lugar en las células de la granulosa durante la foliculogénesis. La progresión de los folículos desde el estadio primordial al pre-antral depende de factores intra ováricos y no requiere gonadotropinas. Los procesos de formación del antro y diferenciación de las células de la granulosa hasta la etapa de folículo preovulatorio están regulados por la FSH. La LH controla la ovulación y la luteinización.	26
Figura 16. Puntuación del flujo vaginal en el momento de la extracción del dispositivo intravaginal: 0: flujo insignificante o sin flujo; 1—alguna cantidad, pero descarga clara; 2—cantidades abundantes y hemorrágicas o purulentas	29
Figura 17. Representación esquemática del protocolo de progesterona a corto plazo para inducir / sincronizar el estro.....	30

Figura 18. Representación esquemática de un tratamiento OVSYNCH en ovejas	34
Figura 19. Esquema representativo de la respuesta inducida con Syncrhovine® en ovejas ciclando. Tras la primera dosis de PGF _{2α} se induce la luteólisis y la ovulación ocurre 2-4 días más tarde, en respuesta a la presencia de un folículo en crecimiento (Panel A) o en regresión (Panel B). Al administrar la segunda dosis de PGF _{2α} estaremos en presencia de un folículo de 3-5 días y entonces la ovulación ocurre de manera sincronizada a las 60 h. .	42
Figura 20. Diseño experimental del experimento 1. Durante el anestro estacional todas las ovejas fueron inducidas a la actividad estral mediante la inserción de un CIDR® durante 7 días y la administración de 300 UI de eCG a la retirada del dispositivo. El efecto del tratamiento se evaluó mediante el seguimiento, durante 5 días, del desarrollo folicular y la aparición del estro.	49
Figura 21. Diseño experimental del experimento 2. Todas las hembras recibieron el mismo tratamiento con CIDR® (5 días) y PGF _{2α} intramuscular a la retirada del dispositivo en dos estaciones diferentes del año (anestro estacional y estación reproductiva). En los grupos problema se administró adicionalmente, por vía intramuscular, GnRH en dosis única (56 h después de la retirada del dispositivo de progesterona), grupo CIDR-GnRH, o en dos dosis (en el momento de la inserción o a las 56 h de la retirada del dispositivo), grupo GnRH-CIDR-GnRH.	63
Figura 22. Diseño del primer ensayo donde se sincronizó la actividad estral de ovejas con dos dosis de 5 mg de PGF _{2α} para después a las 32 h administrar a los grupos CON; agua destilada; WAT GnRH más agua destilada y PGG GnRH más propilenglicol.	71
Figura 23. Diseño del segundo ensayo experimental. Todas las hembras fueron sincronizadas con un CIDR® por 7 días; para después dividirse en tres grupos experimentales (Grupo eCG: que recibieron 300 UI de eCG al momento de la retirada del dispositivo; grupos PPG24 y PPG36: recibieron 50 µg de GnRH en propilenglicol 24 y 36 h; y grupo GnRH56 recibió 50 µg de GnRH después de la retirada del dispositivo, respectivamente.....	72
Figura 24. Representación gráfica del momento de aparición de la sintomatología de celo, en ovejas de raza Segureña bajo un tratamiento de inducción y sincronización de la actividad estral basado en administración de progesterona (CIDR) y PGF _{2α} a su retirada. Adicionalmente se administró eCG al momento del retiro del dispositivo u OvuGel® a las 24 (OVG24) o 36 (OVG36) horas tras el retiro del dispositivo.....	93

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cabezas de ovinos en América Latina (2004-2019).	9
Tabla 2. Producción láctea total (PLT), producción al pico de lactación (PPL) y tiempo al pico de lactación (TPL) de diferentes genotipos en sistemas convencionales y orgánicos	13
Tabla 3. Protocolos utilizados con GnRH como componente principal o complementario, en tratamientos a base de progesterona (CIDR y/o esponja).....	37
Tabla 4. Efecto de la administración de diferentes dosis e intervalo de inyección (días) de análogos de prostaglandinas $F_{2\alpha}$ sobre la respuesta estral y tasa de fertilidad en ovejas durante la estación reproductiva.....	43
Tabla 5. Respuesta reproductiva en ovejas de raza Dorper a la administración de un tratamiento de sincronización de celos y ovulaciones basado en la administración de CIDR en combinación con eCG o GnRH vehiculada en propilenglicol (GnRH-PPG).	89
Tabla 6. Resultados de las variables reproductivas evaluadas en ovejas de raza Segureña sometidas a un tratamiento de inducción y sincronización de celo a base de progesterona y $PGF_{2\alpha}$ suplementado con eCG (eCG) vs OvuGel® a las 24 (OVG24) y 36 (OVG36) horas después de la retirada del dispositivo (CIDR).	92
Tabla 7. Respuesta reproductiva de las variables evaluadas en ovejas de raza Segureña bajo un esquema de tratamiento de inducción y sincronización de la actividad estral a base de OvuGel® por vía vaginal, a las 36 y 48 horas después del retiro del dispositivo (CIDR®)..	94
Tabla 8. Resumen de los estudios realizados sobre hembras multíparas en estación reproductiva y en anestro con diferentes protocolos de sincronización de celo basados en la administración de GnRH (como alternativa a la eCG), en diferentes formulaciones hormonales, por diferentes vías y en distintos tiempos después del tratamiento, bien con $PGF_{2\alpha}$ o con progestágenos (CIDR®).....	100

1. INTRODUCCIÓN

La producción de pequeños rumiantes representa un eslabón importante en la economía y alimentación de la humanidad por la gran adaptabilidad de estas especies a ambientes desfavorables en diferentes regiones a nivel mundial (Haenlein *et al.*, 2001; Naitana & Ledda, 2020). La cría y producción de pequeños rumiantes se beneficia de diversas ventajas como la alta prolificidad de algunas razas y el requerimiento mínimo de espacio, manejo y alimentación, con una relación 1 a 10 en comparación con el ganado vacuno. En algunos países en vías de desarrollo, los productores crían a sus ovejas y cabras en corrales de “traspatio” en zonas rurales y peri-urbanas, para facilitar el manejo y la obtención de productos como carne y/o leche. Otras ventajas son el coste mínimo inicial que se necesita para su producción (González-Mendoza, 2011; Carias, 2013) y su contribución de manera indirecta en el control de las malezas y plantas invasivas (Carias, 2013).

1.1. IMPORTANCIA DE LA PRODUCCIÓN DE OVINOS EN EL MUNDO

La domesticación de los ovinos (*Ovis aries*) se llevó a cabo hace 9.000-11.000 años aproximadamente (Zeder, 2008) y se sabe que es una de las especies que más diversificación ha sufrido, debido a la selección genética y adaptación a diferentes climas. Así, se estima que existen a nivel mundial aproximadamente 1.400 razas de ovinos de las que el 83% son autóctonas de su región (Meadows *et al.*, 2014; Aguilar-Martínez *et al.*, 2017).

La producción de ovejas se encuentra localizada en diferentes regiones del mundo. Además, es importante por la calidad de sus productos en la cadena comercial (leche, carne, piel, lana y estiércol); sin embargo, la mayoría de los pequeños productores de los países en vías de desarrollo crían ovejas por su carne o para la venta como ganado vivo en los mercados locales (FAOSTAD, 2021).

Según la última actualización de la FAO (2020), la población mundial de ovejas para el periodo 2016-2018 comprende 1.200 millones de cabezas; el mayor número se encuentra en Asia con un 43% de los efectivos, seguida de África con un 33% (Figura 1). La producción de leche de oveja está liderada por Turquía, China, Grecia, República Árabe Siria, España e Italia. Por otro lado, los países con mayor producción de carne de oveja son China, Australia, Nueva Zelanda, Turquía, Argelia y Reino Unido. El consumo de carne y leche (caprina u ovina) representa el 4,8 y 3,4 % del consumo total a nivel mundial, respectivamente (Carias, 2013). La industria lechera se encuentra principalmente en Francia, Grecia, Italia, España y en algunos lugares de México (Simões *et al.*, 2021).



Figura 1. Distribución de la población ovina en el mundo (FAO, 2020).

En los últimos años, las proyecciones apuntan a que, para el año 2050, la población humana mundial será de aproximadamente 9.500 millones de personas. En consecuencia, también se prevé una demanda creciente de alimentos de origen animal, pero a la vez nos enfrentamos a la escasez de recursos y el calentamiento global. Por ello, se necesita que la producción animal implique menos alteraciones al medio ambiente y favorezca los parámetros de bienestar animal, es decir, producir “más con menos”. Asimismo, se espera que las industrias ofrezcan

soluciones “limpias, verdes y éticas” (Martin *et al.*, 2004; Martin & Kadokawa, 2006; Montossi *et al.*, 2013; Redden & Thorne, 2020; Menchaca, 2021; Rivero *et al.*, 2021).

Pulina *et al.*, (2018) mencionan que en los últimos 50 años la producción de leche de oveja se ha duplicado y se espera que esta se incremente hasta un 26% más para el año 2030 (Figura 2). Este aumento de la producción ovina merece atención en cuanto a la mejora de los sistemas de producción sobre la base de parámetros que se relacionan entre sí, como son nutrición, reproducción, sanidad, manejo y genética. Por el contrario, se prevé que el calentamiento global, con escasez de lluvias y desertificación, sea una de las principales causas de influencia/influjo negativo en los sistemas de producción ovinos.

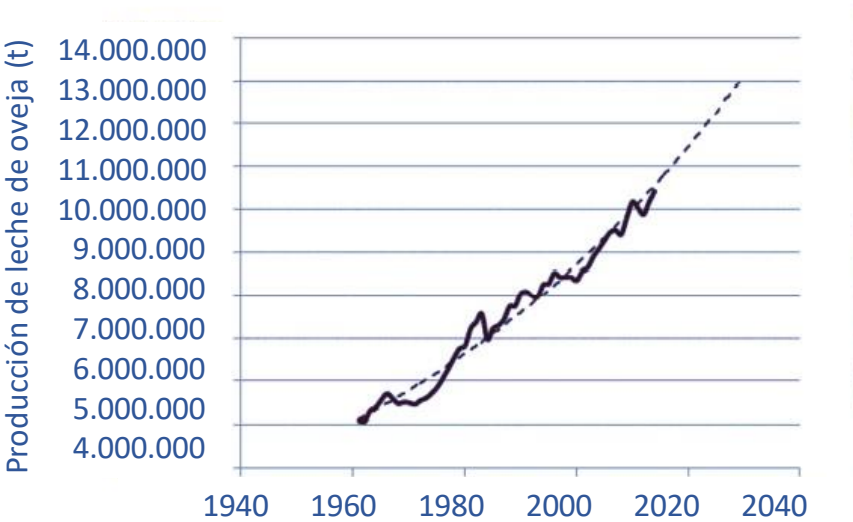


Figura 2. Tendencia de la producción mundial de leche de oveja desde 1960 hasta 2016 (línea continua) y pronóstico hasta 2030 utilizando un modelo de serie temporal (línea discontinua) (tomado de Pulina *et al.*, 2018 datos tomados de FAO, 2018).

1.1.1. PRODUCCIÓN DE OVINOS EN EUROPA

En Europa se cuenta con más de 70 millones de cabezas de ganado ovino y caprino (85 % de ovejas y 15 % de cabras) que suelen criarse en regiones económicamente vulnerables, como las zonas montañosas. Dentro de las cuales destacan en cuanto a producción de ovejas Reino Unido, España, Rumania, Grecia, Italia y Francia. El principal país en cuanto al censo de cabezas de ovino es Reino Unido con 21,2 millones de cabezas de ovino y participa con un porcentaje del 23,8%. España ocupa el segundo lugar con una participación del 22% y un censo próximo a los 20 millones de cabezas (MAPA, 2023). Por lo general, los corderos pesados (de más de 13 kg) se crían en Irlanda y los corderos ligeros en los países meridionales como Grecia e Italia, mientras que la producción de España y Francia es mixta (COMISIÓN EUROPEA, 2020).

Producción de ovinos en España

La importancia de la producción de ovinos en España se debe, en gran medida, a que es una actividad que se desarrolla en zonas donde no existen otras alternativas de producción agropecuaria (García-Díaz *et al.*, 2012). Según el último censo del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA 2020a), España encabeza la lista de los países de la Unión Europea con una población total de 15.439.218 de cabezas de ganado ovino, con el cual aporta el 25% del censo ovino europeo, seguido de Rumania con 10.464 y Grecia con 8.260, tal como se muestra en la (Figura 3).

DISTRIBUCIÓN DEL CENSO DE OVINO POR PAISES EN LA UE-27 2020*

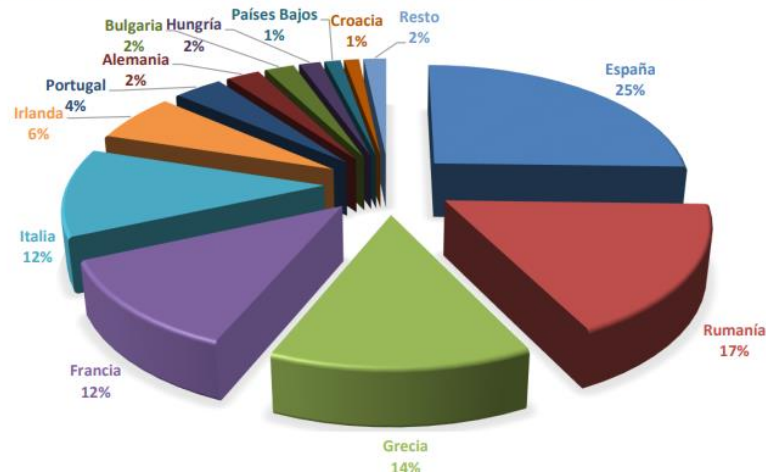


Figura 3. Censo total de la distribución de ovinos en los países pertenecientes a la Unión Europea (UE) (Tomado de EUROSTAT, 2020).

En cuanto a la distribución por comunidades autónomas, los ovinos se encuentran distribuidos principalmente en Extremadura (24%), Castilla y León (16%), Castilla La Mancha (16%), Andalucía (16%) y Aragón (10%). En el año 2020 se contabilizaron 114.035 explotaciones de ganado ovino, en las que la principal actividad zootécnica era el cebo, seguido por reproducción para carne, sistema mixto y producción de leche. De estas granjas, el 79% (90.281 explotaciones) son de producción cárnica y el 9% para producción mixta (Figura 4). Para la producción de leche solo corresponde el 6% y los cebaderos solo el 1%.

Clasificación zootécnica de las explotaciones de ganado ovino en España (Enero 2020)

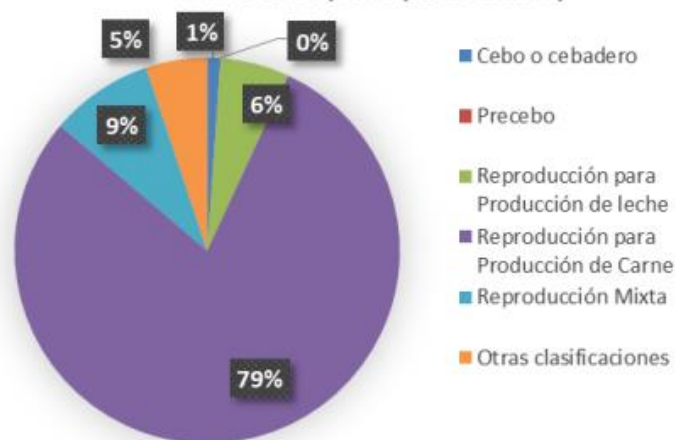


Figura 4. Representación gráfica de las explotaciones de ganado ovino en España (Tomado de MAPA, 2020b).

Producción de leche

Se ha observado, en los últimos años, que el aumento en la producción de leche se debe principalmente a la introducción de razas de genética especializada en dicha actividad como son las razas Assaf y Lacaune y de la evolución hacia explotaciones intensivas con estabulación permanente.

Según datos del sistema unificado de información del sector lácteo (INFOLAC), en el año 2020 se produjeron unos 527,4 millones de litros de leche de oveja, que en términos económicos se corresponden con 490 millones de euros que, junto con la producción de leche de cabra, suman el 26% del valor lácteo en España. Sin embargo, cabe mencionar que esta producción se caracteriza por un comportamiento cíclico estacional, con mayores volúmenes de producción en los meses de marzo a julio.

Esta producción de leche se destina principalmente a la elaboración de quesos y otros productos lácteos. España cuenta con más de 150 variedades de queso. Muchas de estas variedades se encuentran protegidas por figuras de calidad diferenciada como Denominaciones de Origen Protegida (DOP) e Indicaciones Geográficas Protegidas (IGP), lo cual lo convierte en uno de los países con mayor variedad de tipos de queso en todo el mundo, con una producción de 427.000 toneladas para el 2020; de ellas, el 15% fue queso puro de oveja, el 14% fue queso puro de cabra, el 31% fue queso de mezcla y el resto a otros tipos de queso.

Producción de carne

Según datos del MAPA para 2020, el número de ovinos sacrificados en España alcanzó las 9.563.679 cabezas para un total de producción de 115.117 toneladas de carne. Las regiones de Castilla y León, Castilla la Mancha, Cataluña, Aragón y Murcia concentran alrededor del 76% de los sacrificios totales de ovino en España (Figura 5).

Cabe destacar que el 92% de los ovinos sacrificados fueron corderos, de los cuales, el 39% corresponden a corderos recientes con un peso aproximado de entre 10-13 kg, seguidos por corderos pascuales (>13 kg) con el 25%, corderos lechales (<7 kg) y corderos ligeros (7-10 kg). Por otro lado, el 8% de los animales sacrificados se

correspondieron con animales que finalizaron su vida reproductiva (MAPA, 2020b).

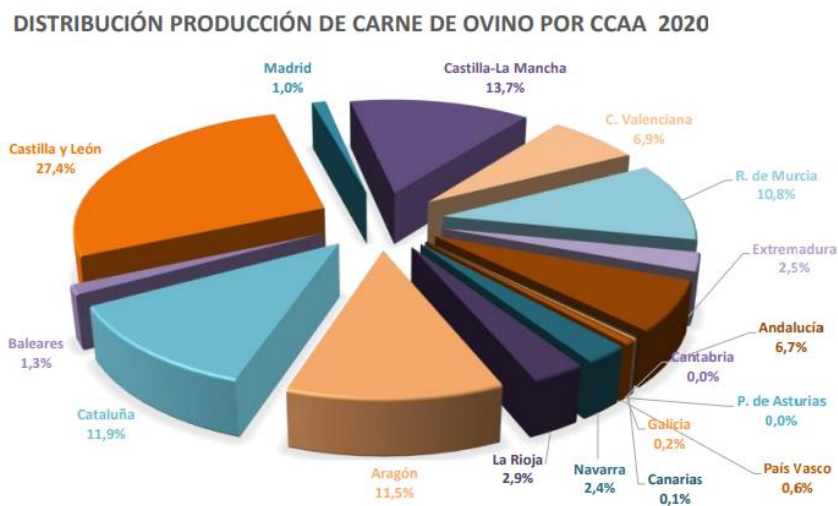


Figura 5. Representación gráfica de la distribución de carne de ovino (Tomado de MAPA, 2020c).

Producción de lana

En lo que respecta a la producción de lana en datos actualizados para el 2020 (Figura 6), España alcanzó las 23.121 toneladas, lo que representa aproximadamente 12,45 millones de ovinos esquilados. Las comunidades autónomas de España que más lana produjeron en 2020 fueron Extremadura (27,8%), Castilla y León (18,6%), Andalucía (16,1%) y Castilla La Mancha (14,3%). Respecto al tipo de lana, la más producida fue la entrefina (11.708 toneladas) destacando en Castilla La Mancha (24,2%), Andalucía (22,7%), Castilla y León (16,8%) y Aragón (16,5%). La producción de lana fina se concentró mayoritariamente en Extremadura (82,6%).

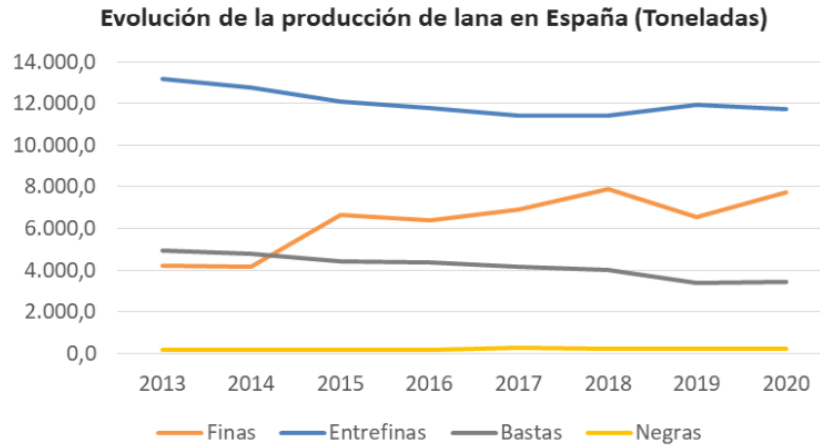


Figura 6. Representación gráfica de la producción de lana en España desde 2014-2020 (MAPA, 2020c).

En cuanto a las exportaciones, España exportó 13.844 toneladas de su producción total en 2020, que se corresponde con un 60%. Esta actividad, como muchas otras, también se vio afectada por los efectos colaterales de la COVID-19, disminuyendo a cifras oficiales de 7.788 toneladas para ese mismo año.

1.1.2. PRODUCCIÓN DE OVINOS EN LATINOAMÉRICA

En América Latina, se estima una población de 80 millones de cabezas; la mayoría concentradas en países como Brasil, Argentina, Perú, Bolivia, México y Uruguay (Tabla 1). Su cría constituye una actividad que genera gran impacto en la economía y alimentación de comunidades indígenas y pequeños campesinos (Revisado por Cardona-Tobar *et al.*, 2020).

Tabla 1. Cabezas de ovinos en América Latina (2004-2019) (Tomado de Cardona-Tobar *et al.*, 2020).

País	Población de ovinos
Brasil	17.976.367
Argentina	14.866.000
Perú	12.415.395
Bolivia	9.499.147
México	8.575.908
Uruguay	6.567.000
Cuba	2.173.400
Chile	2.037.400
Colombia	1.578.684
Ecuador	739.475
Guatemala	692.900
Venezuela	550.000
Republica Dominicana	123.000
Costa Rica	35.800
Panamá	18.665
Honduras	16.000
Nicaragua	13.800
El salvador	11.493
Puerto Rico	10.759

La base racial de los ovinos de lana y pelo que existen en América Latina está compuesta principalmente por genotipos traídos durante la estación de la

colonización española, hace más de 500 años. Esta situación produjo un mestizaje que perduró por siglos y que dio origen a una variedad de ovinos adaptados a diversos ecosistemas y a condiciones especiales de cada región, denominados criollos (Aguilar-Martínez *et al.*, 2017).

Los principales países productores de carne de oveja en América Latina son: Brasil, México y Argentina con un 21,13%, 14,26% y 12,05%, respectivamente, del total de la producción; mientras que para lana son Argentina con un 30,59% y Uruguay con un 24,47%. Por otro lado, la producción de leche de oveja en el continente americano representa sólo el 0,9% del total del mundo. La FAO (2017) reportó para el año 2017 datos de producción solamente para México (57.754 Tm), Bolivia (35.000 Tm) y Ecuador (4.300 Tm).

Producción de ovinos en México

El inventario nacional de México en el año 2020, según datos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), se cifra en 8.725.882 de cabezas de ganado ovino, con un cierre productivo de 64.758 Tm de carne de ovino. Los estados con mayor número de ovejas son Edo. de México e Hidalgo, con 1.355.113 y 1.128.198 ovejas, respectivamente. Para algunas regiones como la Comarca Lagunera, la producción de carne y leche de oveja no es una actividad prioritaria; por ello, sólo representan el 13% del censo nacional (11.812 ovejas). En México, en general, el ganado ovino es de tipo criollo y un porcentaje bajo son de razas puras como: Suffolk, Hampshire, Rambouillet y Corriedale.

Producción de carne

La principal actividad ovina en México es la producción de carne. En el año 2021, se produjeron un total de 65.845,71 Tm, con un valor de 5.091.383,72 MXN (27.003.745,45 USD). Los estados que más contribuyen son Edo. de México, Hidalgo y Veracruz (Figura 7).

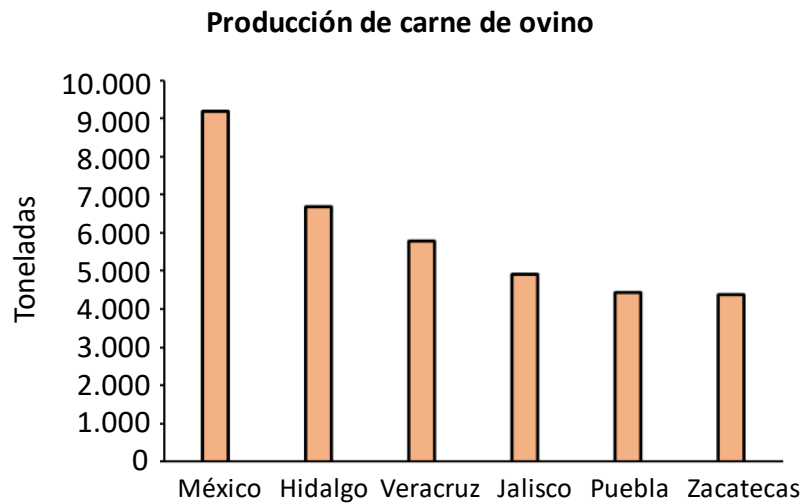


Figura 7. Representación gráfica de los estados con mayor producción de carne de ovino para el año 2021 en México (Datos tomados del SIAP, 2020).

Producción de lana

En cuanto a la producción de lana, son muy pocos los estados de México que contribuyen a esta actividad. Así, datos recientes del Sistema Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera mencionan que, para el año 2021 (Figura 8), la producción total de lana fue de 4.123,66 toneladas, con un valor promedio de 21.719,72 MXN (115.172,57 USD) . Las principales razas que se crían para producción de lana son Debouillet, Merino Australiano y Lincoln.

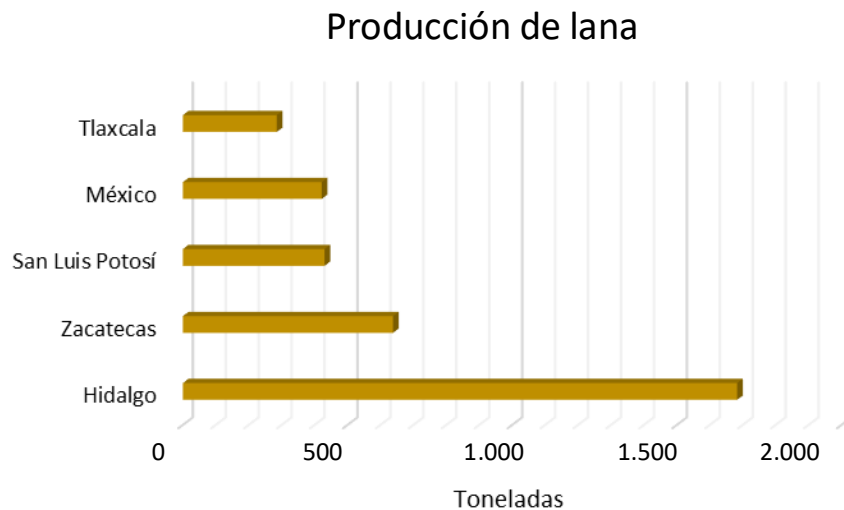


Figura 8. Estados con mayor producción de lana en México en el año 2021 (Datos tomados del SIAP, 2020).

Producción de leche

El consumo de leche de oveja en la República Mexicana es relativamente bajo en los sistemas convencionales; esto es debido al coste de producción ya que la leche de oveja se destina para la producción de queso (Gómez-Hernández, 2022).

Actualmente no existen datos en los informes nacionales sobre la producción de leche de oveja, siendo esta una actividad muy limitada. Sin embargo, estudios de campo han determinado que la producción lechera ovina se ha diversificado hacia mercados emergentes como es el sistema “orgánico”, donde los rendimientos lácteos promedios de este sistema en México son de aproximadamente 89,8 kg/lactación. Estos rendimientos son inferiores a los obtenidos en sistemas convencionales de producción láctea con razas especializadas. Estos rendimientos de la ganadería orgánica coinciden con rendimientos de rebaños ovinos orgánicos de producción láctea en Grecia y España (Tabla 2), adaptado de Ángeles-Hernández *et al.*, 2014).

Tabla 2. Producción láctea total (PLT), producción al pico de lactación (PPL) y tiempo al pico de lactación (TPL) de diferentes genotipos en sistemas convencionales y orgánicos (tomado de Ángeles-Hernández *et al.*, 2014).

	PLT (l)	PPL (l)	TPL (días)	Referencia
Sistema convencional				
Comisana				
Otoño	136	1,4	10,5	
Invierno	94	1,8	15,0	Portolano <i>et al.</i> (1996)
Maseese	173	1,9	17,8	Franci <i>et al.</i> (1999)
Awassi (Intensivo)	506	3,4	45,0	Pollott y Gootwine (2001)
Awassi (Extensivo)	107	0,9	26,8	Dag <i>et al.</i> (2005)
Sistema orgánico				
Manchega	97	-	-	Toro-Mujica <i>et al.</i> (2011)
Autóctonas (Grecia)	84	-	-	Tzouramani <i>et al.</i> (2011)
F1 México	89	0,9	25,3	Ángeles-Hernández <i>et al.</i> (2013)

1.2. BASES FISIOLÓGICAS Y MANEJO DE LA REPRODUCCIÓN EN GANADO OVINO

1.2.1. INICIO DE LA ACTIVIDAD REPRODUCTIVA

La actividad reproductiva en mamíferos se inicia con la pubertad. Esta se desencadena en base a cambios en la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), secretada por neuronas presentes en el hipotálamo. La GnRH actúa sobre la hipófisis anterior estimulando la liberación de las hormonas gonadotrópicas (LH y FSH). Las hormonas gonadotrópicas actúan sobre las gónadas estimulando la espermatogénesis en el macho y la ovogénesis en la hembra, además de la producción de esteroides gonadales, los cuales, mediante un *feedback*, regulan la secreción de GnRH, LH y FSH (Figura 9; d'Anglemont & Colledge, 2010).

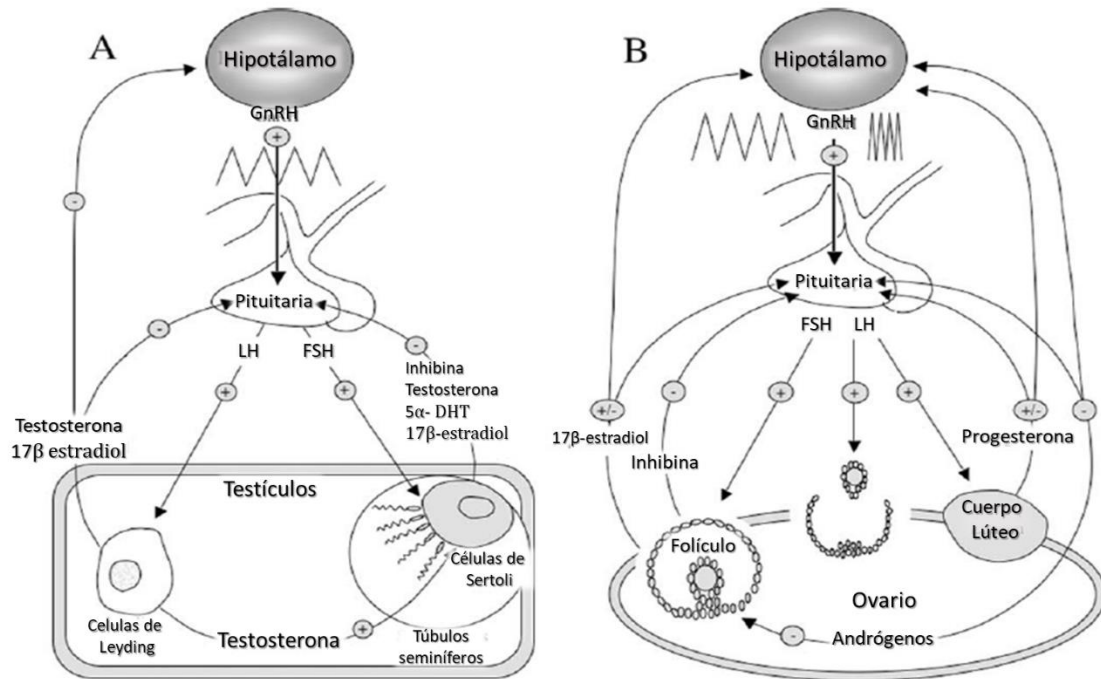


Figura 9. Regulación por retroalimentación de las funciones testicular (A) y ovárica (B); (Tomado y adaptado de Chedrese, 2009).

Antes de la pubertad, las neuronas secretoras de GnRH, presentes tanto en el centro tónico como en el centro cíclico del hipotálamo, liberan pulsos de GnRH de baja amplitud y frecuencia. En la hembra, después de la pubertad, el centro tónico que controla los niveles basales de GnRH aumenta la frecuencia de los pulsos y el centro cíclico que controla el aumento preovulatorio de GnRH. El macho no desarrolla un centro cíclico (Figura 10; Senger, 2005).

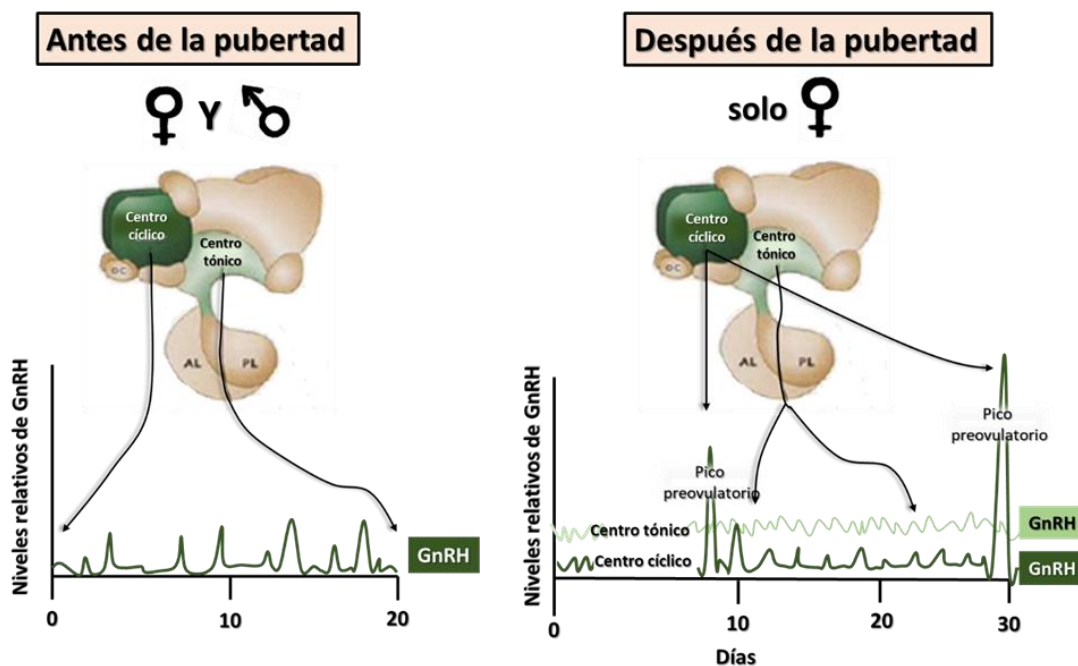


Figura 10. Cambios en la secreción hipotalámica de GnRH antes y después de la pubertad. (Tomado y adaptado de Senger, 2005).

Las corderas alcanzan la pubertad en el momento de la primera ovulación fértil, siempre y cuando hayan alcanzado el 50-70% de su peso corporal adulto. Los principales factores que pueden afectar el inicio de la pubertad son: la nutrición en el periodo de crecimiento, la raza, la estacionalidad y el momento del nacimiento (Gootwine, 2011).

Es importante mencionar que la edad de aparición de la pubertad puede variar sustancialmente entre razas; se puede presentar entre los 4 o 5 meses en corderas

de razas prolíficas y retrasarse hasta los 1,5 años en corderas de razas estacionales. Por ejemplo, la oveja de lana fina o merina no alcanza la pubertad durante la primera estación sexual (Jainudeen *et al.*, 2000). El inicio de la actividad estral también depende de cuándo ocurrió el nacimiento de las hembras ya que si nacieron durante el otoño deberían iniciar su actividad estral cerca del inicio o a mitad del anestro estacional el cual inhibe la inducción de la actividad estral (Figura 11; Senger, 2004).

Las ovejas nacidas en primavera presentan secreción del centro tónico de LH y esto hace que alcancen la pubertad a las 20 semanas de edad, pero la estación retrasa la pubertad hasta otoño, cuando tienen entre 30 a 35 semanas. Por otro lado, las corderas nacidas en otoño tienen 30 semanas de edad durante la temporada de anestro de los adultos, pero las ovulaciones se retrasan hasta poco después del inicio de la temporada de reproducción, momento en el que tienen 50 semanas (Jainudeen *et al.*, 2000).

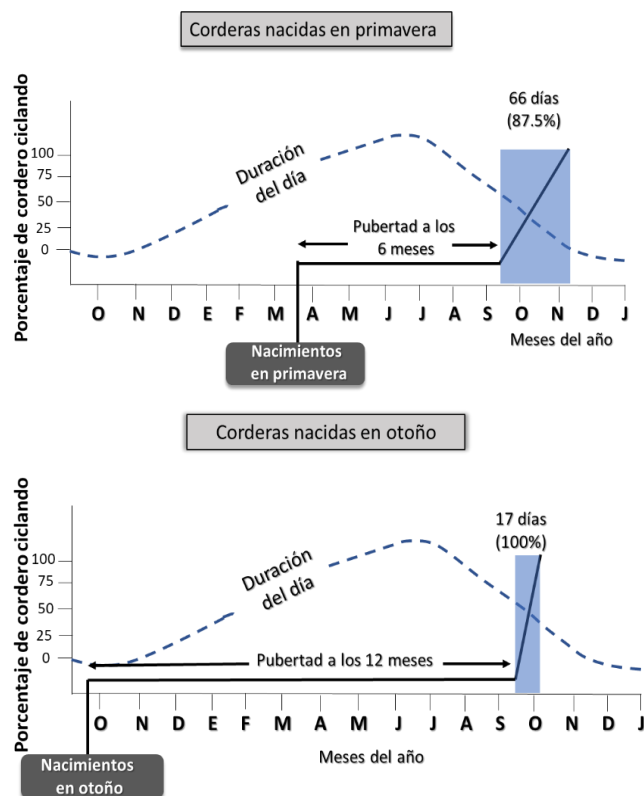


Figura 11. Las corderas nacidas en primavera alcanzaron la pubertad a una edad mucho más joven (6-7 meses) pero menos sincronizada (66 días) entre el primer y último ciclo de las corderas. Por otro lado, todos (100%) de las corderas nacidas en otoño comenzaron a ciclar con 17 días de diferencia entre los 12 y 12,5 meses de edad (Tomado y adaptado de Senger, 2004).

1.2.2. ACTIVIDAD CÍCLICA ESTACIONAL

Las ovejas rigen su ciclo reproductivo principalmente por el fotoperiodo; cuando los días comienzan a acortarse y por ende existe una menor duración de horas luz, comienzan a estimular su actividad reproductiva. Por otro lado, en días de mayor duración de horas luz, como en la primavera y parte del verano, presentan una disminución de su actividad estral, lo que se conoce como anestro estacional (Foster *et al.*, 1986; Arroyo, 2011; Figura 12). Sin embargo, el efecto del fotoperiodo en el anestro estacional puede ser modulado por otros factores como son la temperatura ambiental, el estado nutricional y las interacciones sociales. (Wayne *et al.*, 1989; Rosa & Bryant, 2003). El objetivo del patrón reproductivo estacional es facilitar que las hembras tengan sus partos cuando las condiciones ambientales y de alimentación son las óptimas para el mantenimiento y preservación de sus crías; es decir, alrededor de la primavera (Malpaux *et al.*, 1996; Weems *et al.*, 2015). A diferencia de la vaca y la cerda, la domesticación no ha logrado romper este patrón reproductivo estacional.

El efecto de la latitud juega un papel muy importante en la regulación del ciclo estacional de las ovejas; a mayor latitud, mayor será el periodo de anestro estacional (Ramírez-Ramírez *et al.*, 2021). Por ejemplo, algunas razas europeas criadas en latitudes superiores a 60°N muestran actividad estral sólo entre los meses de noviembre y junio mientras que en latitudes de 35° N presentan anestro sólo entre los meses de marzo y junio (Gómez-Brunet & Lopez-Sebastián, 1991). En regiones tropicales, los efectos del fotoperiodo pueden ser escasos o nulos en algunas razas de pelo (Arroyo *et al.*, 2011). En latitudes inferiores a los 30°N (tropicales o subtropicales) existen otros factores ambientales que determinan la actividad reproductiva de los ovinos; principalmente los relacionados con la época de lluvia y la temperatura y, con ello, la disponibilidad de alimento (Rosa & Bryant, 2003; Ramírez-Ramírez *et al.*, 2021).

Durante la estación reproductiva, un aumento en la frecuencia de pulsos de GnRH/LH provoca el “pico preovulatorio”. Este mecanismo se da gracias a la disminución de la producción de progesterona, por el efecto luteolítico de la PGF_{2α}.

Esta disminución de progesterona circulante favorece la secreción tónica de LH, hasta llegar a un pulso o más por hora y este aumento sostenido de LH estimula la secreción de estradiol en los folículos en maduración. El incremento progresivo en los niveles de E₂, ejercido por un mecanismo de retroalimentación positiva a nivel hipotalámico, estimula la secreción hormonal y esto origina las descargas preovulatorias de la dupla GnRH/LH (Goodman, 1994; Arroyo, 2006).

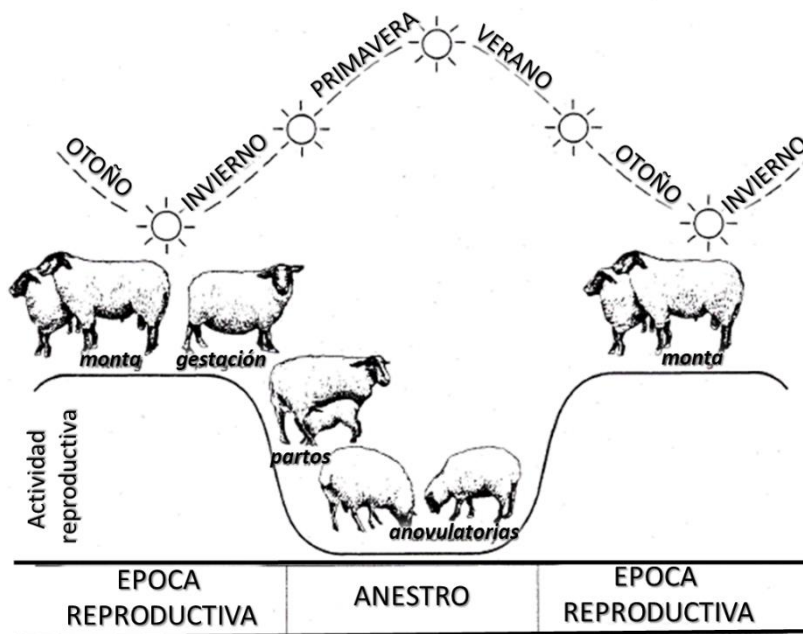


Figura 12. Reproducción estacional en la oveja. Durante la temporada de reproducción, se producen ovulaciones fértiles, con apareamiento y preñez; durante el anestro las ovejas no ovulan hasta la próxima temporada de cría (Tomado y adaptado de Foster *et al.*, 1986).

El mecanismo endocrino por el que se regula el ciclo reproductivo estacional de los pequeños rumiantes se relaciona con la producción de melatonina. La retina capta las señales lumínicas y el nervio óptico, a través del tracto retino-hipotalámico, las envía hasta el núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo y el ganglio superior del cerebro posterior (Arent, 1998). Posteriormente, esta señal neuronal se convierte en una señal química; el ganglio cervical superior libera noradrenalina que es captada por los receptores α y β adrenérgicos de los

pinealocitos de la glándula pineal (Legan & Karsch, 1979; Malpaux *et al.*, 1997; Arroyo, 2011), donde se realiza la producción de melatonina a partir de triptófano.

La melatonina podría definirse como el "lector" endocrino de la relación de horas luz y oscuridad que constituyen el fotoperíodo y, en base a ello, envía señales a los sistemas neuroendocrinos que controlan la reproducción (Arendt, 1998; Clarke *et al.*, 2009). También actúa sobre el hipotálamo, a través de los receptores MT1 de la *pars tuberalis* como un potente regulador estacional de la liberación de la kisspeptina para la secreción de GnRH y la inhibición de la liberación neuronal de dinorfinas para iniciar la actividad reproductiva (Li *et al.*, 2012). Durante la estación reproductiva, un aumento en la frecuencia de pulsos de GnRH/LH provoca el "pico preovulatorio". En todas las especies, el generador de pulsos de GnRH juega un papel importante en la liberación de gonadotropinas ya que favorece el aumento de la secreción de estradiol al final de la fase folicular. Esta mayor liberación de estradiol provoca la aparición del pico preovulatorio de LH (Senger, 2005; Plant, 2015).

Sin embargo, esto no ocurre durante la época de anestro estacional. La secreción de melatonina es menor cuando las horas luz van en aumento por lo que inhibe los pulsos de GnRH y por ende de LH, por lo que las hembras no manifiestan signos de celo (Chemineau, 1993; Malpaux *et al.*, 1997). El efecto de retroalimentación negativa del E₂ a nivel hipotalámico está regulado por neuronas dopaminérgicas a nivel de la eminencia media (núcleo donde llegan las proyecciones de GnRH desde el área preóptica; POA), que inhiben la secreción de GnRH y se identifican como el mecanismo responsable de la estacionalidad (Figura 13; Clarke, 1988; Karsch *et al.*, 1984; Malpaux *et al.*, 1999; Weems *et al.*, 2015). Durante el periodo de anestro, los niveles bajos de estradiol inhiben la secreción de LH de la hipófisis. el desarrollo de los folículos puede continuar en algunas especies durante el período de anestro, pero los niveles de LH son insuficientes para las etapas finales del desarrollo folicular y producir un aumento sostenido en la concentración de estrógenos que active el mecanismo de aumento preovulatorio (Squires, 2010; Smith & Clarke, 2010).

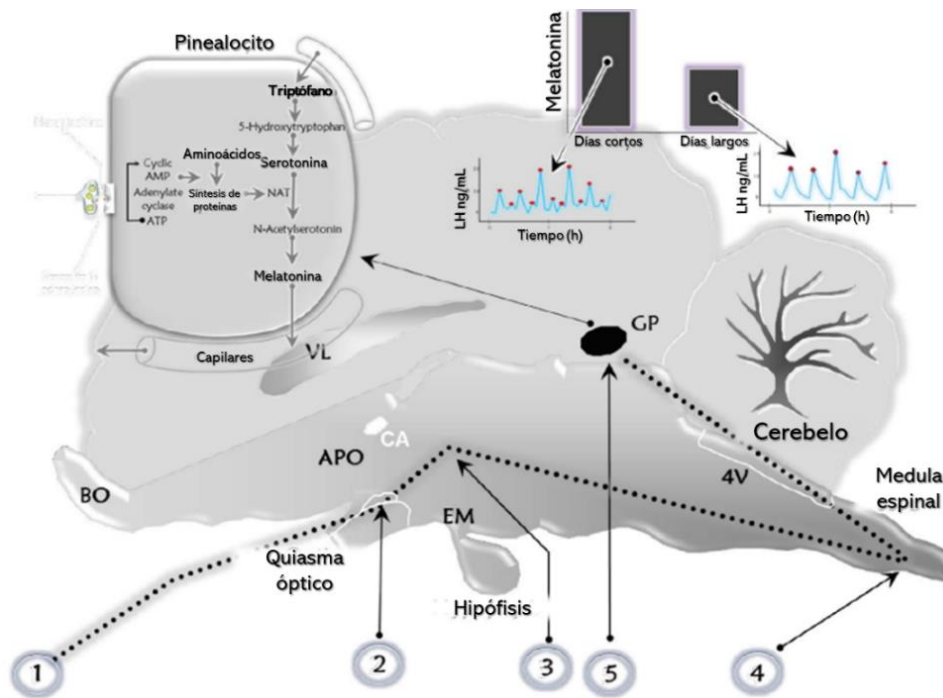


Figura 13. Representación esquemática de una sección sagital del cerebro de una oveja. La línea punteada negra representa el camino de información de la luz del ojo (1) hacia la glándula pineal (5) a través del núcleo supraquiasmático (2), el núcleo paraventricular del hipotálamo (3) y los ganglios cervicales superiores (4). Área preóptica (APO), comisura anterior (CA), ventrículo lateral (VL), eminencia media (EM), glándula pineal (GP), bulbo olfatorio (BO), cuarto ventrículo (4V). (Modificado de Malpaux *et al.*, 1997 y tomado de Ramirez-Ramirez *et al.*, 2021).

Foster (1986), sugiere que la transición de la temporada no reproductiva (anestro) a la temporada reproductiva representa un mecanismo similar al que ocurre en la pubertad. Existe evidencia de que, al no haber existido cuerpo lúteo y por lo tanto progesterona de una ovulación anterior, la primera ovulación (en la pubertad y al comienzo de la temporada de reproducción o después de un ciclo corto) generalmente no va acompañada de manifestaciones de celo (Robinson, 1974). Por lo tanto, en ovejas prepuberales, así como en anestro estacional, no se producen picos preovulatorios de LH, que son los que provocan la ovulación. En ambos casos los patrones neuroendocrinos están presentes, pero parecen estar suprimidos (Clark, 1988; Smith & Clarke, 2010).

1.3. FISIOLÓGÍA DEL CICLO ESTRAL

La oveja presenta un ciclo estral de una duración promedio de 17 días (con un rango de 15-19 días) y se divide en una fase lútea desde el día 2 hasta el día 14-15, (tomando como referencia día 0 al inicio del celo) y una fase folicular desde el día 14 hasta el día 1. Los signos de celo pueden durar entre 18 y 48 horas y la ovulación se produce antes de finalizar la actividad estral; alrededor de 25 a 30 h después del inicio de la actividad estral (Goodman, 1994; Gootwine, 2011; Bartlewski *et al.*, 2011; de Castro *et al.*, 2014).

El ciclo estral está asociado con una secuencia de eventos endocrinos regulados por el hipotálamo que produce GnRH; la glándula pituitaria que secreta FSH, LH y oxitocina; folículos antrales ováricos que secretan estrógenos e inhibina; el cuerpo lúteo (CL) secretor de progesterona y oxitocina; y el endometrio uterino que produce PGF_{2α} (Scaramuzzi *et al.*, 1993a). El desarrollo y la maduración del folículo ovárico, la esteroidogénesis, la ovulación y la formación de CL están controlados principalmente por las gonadotropinas hipofisarias (Figura 14; Bartlewski *et al.*, 2011).

Existen dos fases que marcan el inicio de la actividad reproductiva. En primer lugar, la fase de proceptividad, que consiste en la búsqueda y la estimulación del carnero pero sin la aceptación de la monta; esta fase ocurre durante el proestro. Por otro lado, la fase de receptividad, que consiste en la expresión del reflejo de inmovilización en respuesta de aproximaciones con contacto, la aceptación de la monta y la cópula. Signos observables que nos dicen que la hembra se encuentra en estro (Fabre-Nys & Gelez, 2007).

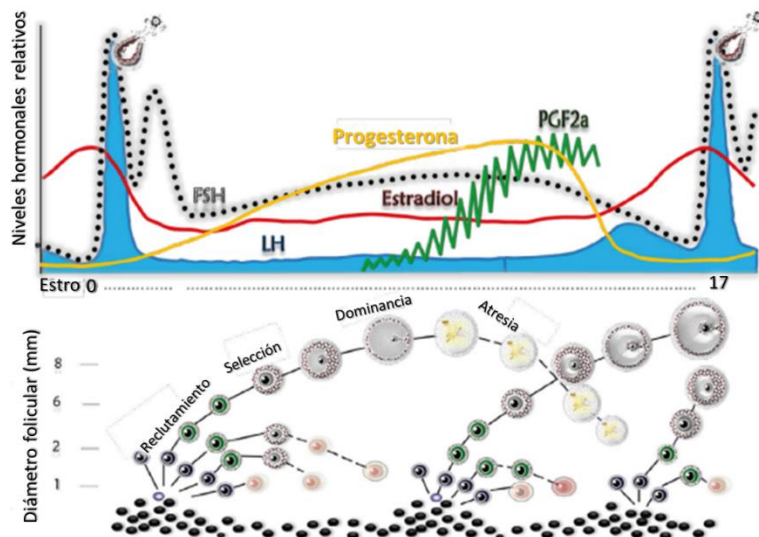


Figura 14. Representación esquemática de los perfiles hormonales y el desarrollo folicular durante el ciclo estral de la oveja. FSH (hormona estimulante del folículo), LH (hormona luteinizante), $PGF_{2\alpha}$ (Prostaglandinas $F_{2\alpha}$) (Tomado de Reyes-Ramirez *et al.*, 2021).

1.3.1. FASE FOLICULAR. DESARROLLO Y CRECIMIENTO

Esta fase comprende el periodo desde la regresión del cuerpo lúteo hasta la siguiente ovulación; esta fase es relativamente corta (2-3 días). Sin embargo, la presencia de folículos antrales durante la fase lútea sugiere una duración real mayor de 2 a 5 días, por lo que la fase folicular como tal comprende desde la formación del folículo antral hasta la ovulación (Hafez, 2000).

Este crecimiento se produce por medio de las llamadas ondas foliculares, las cuales se relacionan con el crecimiento de un grupo de pequeños folículos que da origen a uno o más folículos ≥ 5 mm de diámetro (García-Pintos & Menchaca, 2016). Por otra parte, Bartlewskli *et al.* (1999), definieron una onda folicular como un grupo de folículos que crece sincrónicamente de 2 a 3 mm y hasta 5 mm de diámetro antes

de la regresión u ovulación; de ellos, uno o más folículos continúan creciendo (folículos dominantes), mientras que otros folículos regresan (folículos subordinados; Souza *et al.*, 1997; Ramos & Silva, 2018).

Las células pregranulosas y los ovocitos de los folículos primordiales corticales permanecen latentes durante varios meses en roedores y humanos. Durante la transición de folículos primordiales a primarios, la capa única de células aplanadas de la granulosa cambia de morfología para convertirse en células de la granulosa cuboideas. Esta conversión es independiente del estímulo de las gonadotropinas liberadas por la hipófisis, ya que está regulado por factores producidos dentro del ovario y requiere la interacción entre las células pregranulosas y el ovocito. Uno de los principales factores a nivel ovárico en animales adultos es el FOXL2. En estudios en ratones con ausencia de este factor se ha determinado que las células permanecen aplanadas, lo que da como resultado una ausencia de crecimiento folicular. De manera similar, la inhibición de MTORC1 en las células de la granulosa bloquea la activación del folículo latente, mientras que su sobre activación acelera este proceso. Otro sistema de ligandos especial para este crecimiento es el KIT y KITL. El ovocito expresa en su superficie el ligando KIT, un receptor de la tiroxina quinasa, mientras que las células aplanadas de la granulosa expresan KITL, que es capaz de unirse a KIT para promover la activación del folículo. A medida que el crecimiento del folículo sigue su paso de la etapa primaria a preantral la capa de las células cuboideas prolifera para formar múltiples capas. Se sabe que uno de los factores que contribuyen a la diferenciación del crecimiento es el factor de crecimiento 9 (GDF9). Así mismo las conexas 43 y 37 (CX43 Y CX37) son componentes de las uniones gap entre el ovocito y las células de la granulosa circundantes, detienen la foliculogénesis en la etapa primaria y alteran la diferenciación de las células de granulosa (Baumgarten & Stocco, 2018).

La formación del antro folicular (cavidad llena de líquido) ocurre durante la progresión de folículo preantral hasta la fase preovulatoria. El crecimiento folicular final está impulsado principalmente por la expansión del líquido dentro del antro. La formación del antro es dependiente de las gonadotropinas. Hacia el final de las primeras etapas de la foliculogénesis, los folículos ováricos (2-3 mm) se vuelven sensibles a las hormonas gonadotrópicas, lo cual es un requisito previo para el

crecimiento y maduración folicular antral (Driancourt *et al.*, 1985; Campbell, 1999; Bartlewski *et al.*, 2011). El papel que desempeña el antro es el de estimular la producción y secreción de polisacáridos y proteínas secretadas por las células de la granulosa. Estas células producen hialuronano y versicano, un proteoglicano de condroitínsulfato que viaja hacia el espacio extracelular. La acumulación y los enlaces cruzados de estas moléculas generan un gradiente osmótico, que a su vez extrae líquido de la vasculatura tecal (Figura 15). El antro separa las células de la granulosa en dos poblaciones de células con funciones distintas: del cúmulo y murales. Las células del cúmulo de la granulosa rodean al ovocito y participan activamente en la maduración del ovocito. En cambio, las células murales están cerca de la pared del folículo y son el sitio principal de síntesis de hormonas esteroideas sexuales como el estradiol, que se produce cuando ocurre la maduración folicular o fase preovulatoria (Figura 15; Baumgarten & Stocco, 2018).

1.3.2. FASE LÚTEA. FORMACIÓN DEL CUERPO LÚTEO

La formación del cuerpo lúteo ocurre después del pico de LH y de la ovulación. Inmediatamente, la membrana basal entre la teca interna y las células de la granulosa comienza a descomponerse, ocurre una extravasación de glóbulos rojos hacia la cavidad antral y esta se llena de sangre. Los vasos sanguíneos de la teca invaden la capa de células de la granulosa luteinizante y, bajo la influencia de factores angiogénicos, se desarrollan estructuras vasculares más extensas (Duncan, 2019). Las células de la teca-luteínica forman pequeños grupos en la periferia de las células de la granulosa-luteínica (Devoto *et al.*, 2009). Finalmente, cada célula de la granulosa-luteínica colinda con una célula endotelial vascular y hay tantas células endoteliales como células esteroideogénicas. Las células de la granulosa-luteínica continúan expresando CYP19 y las células de la teca-luteínica continúan expresando CYP17, por lo que el cuerpo lúteo produce tanto andrógenos como estrógenos, así como otras hormonas peptídicas como inhibina A, relaxina y oxitocina.

La función del cuerpo lúteo depende de LH, al expresar en las células de la granulosa-luteínica y teca-luteínica receptores a LH y no a FSH. Aunque la LH es necesaria para la función luteal, los niveles circulantes de LH son bajos durante la fase lútea y no son paralelos a la producción de progesterona (Duncan, 2019). Por ello, se ha sugerido que la acción de la LH sobre las células luteales esteroideogénicas también esté modulada por factores reguladores paracrinos locales de la esteroideogénesis en el cuerpo lúteo. Se ha hipotetizado que la inhibina, activina, diferentes citoquinas, factores de crecimiento, eicosanoides, esteroides y otras moléculas podrían actuar como posibles reguladores locales de la función lútea (Duncan, 2009).

Los niveles de progesterona suelen ser indetectables al inicio del ciclo estral para después incrementar gradualmente entre los días 2 y 8 hasta, que alcanzan una concentración máxima de 1,5 a 3 ng/mL, a medida que se completa la luteogénesis (Ramos & Silva, 2018). Durante el inicio de la fase lútea, el aumento de las concentraciones periféricas de progesterona producida por el cuerpo lúteo disminuye la frecuencia de los pulsos de GnRH y LH (revisado por Caraty & Skinner, 1999).

La producción de la progesterona se deriva principalmente del colesterol y la evidencia sugiere que el colesterol en el cuerpo lúteo se deriva directamente del plasma y de la movilización de las reservas intracelulares. El colesterol se transporta en el plasma como complejos de lipoproteínas y se utiliza inmediatamente para la esteroideogénesis o se esterifica y se almacena en gotitas de lípidos dentro de la célula (luteína); ello sería responsable del color y textura característicos del cuerpo lúteo.

El primer paso para la síntesis de la progesterona es la movilización del colesterol desde el citoplasma hasta la membrana citoplasmática interna de la mitocondria. La proteína STAR cuando es estimulada por la LH, transporta el colesterol. Posteriormente, la escisión de la cadena lateral del colesterol (CYP11A), convierte el colesterol en pregnolona, que se convierte en progesterona por la acción de la HSB3B1 (Duncan, 2019).

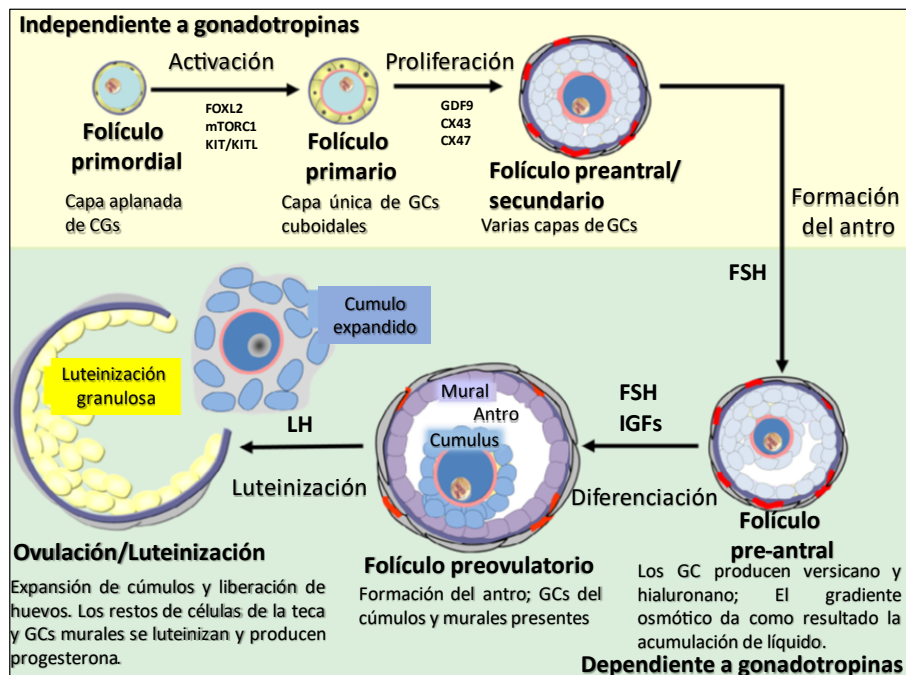


Figura 15. Cambios que tienen lugar en las células de la granulosa durante la foliculogénesis. La progresión de los folículos desde el estadio primordial al pre-antral depende de factores intra ováricos y no requiere gonadotropinas. Los procesos de formación del antro y diferenciación de las células de la granulosa hasta la etapa de folículo preovulatorio están regulados por la FSH. La LH controla la ovulación y la luteinización (Adaptado y modificado de Baumgarten & Stocco, 2018).

Posteriormente, sólo 2-3 folículos alcanzan los 4 mm de diámetro para entrar a la fase de dominancia, en que se vuelven dependientes de las gonadotropinas en especial de LH. En presencia de LH alcanzan un tamaño preovulatorio de 6-9 mm. Se sabe que el aumento de E₂, que produce el folículo pre-ovulatorio, induce el comportamiento estral y al mismo tiempo actúa en la retroalimentación positiva para que se aumente la secreción de GnRH. El cambio en la secreción de GnRH induce el pico preovulatorio de LH, que provoca la ovulación entre 20-26 horas de iniciado el estro (Fatet *et al.*, 2011).

1.4. CONTROL DEL CICLO ESTRAL MEDIANTE TRATAMIENTOS HORMONALES

Los avances en fisiología reproductiva ofrecen alternativas para inducir la pubertad y el estro mediante la utilización de hormonas exógenas (Ronquillo *et al.*, 2010). Estas hormonas permiten el control del ciclo reproductivo e inducen o sincronizan el estro (Estrada *et al.*, 1993); su uso posibilita una serie de ventajas.

Así, permite elegir con anticipación el periodo de partos y ajustarlo a la disponibilidad de alimento o a las facilidades para la crianza y la adaptación a una posible estacionalidad en el mercado (Martemucci & Alessandro, 2011). Una técnica de sincronización de celos efectiva debe inducir una respuesta estral fértil y altamente sincronizada en un porcentaje importante de las hembras tratadas. Los parámetros para evaluar los resultados de un programa de sincronización de celos incluyen: respuesta estral (porcentaje de hembras en celo sobre hembras tratadas), tasa de concepción (proporción de hembras que conciben sobre hembras inseminadas o montadas) y, la tasa de preñez (proporción de hembras gestantes sobre hembras destinadas a la reproducción) (Menchaca & Rubianes, 2014). Es importante tener en cuenta que es necesario maximizar los resultados de la sincronización del estro para igualar la relación coste/beneficio (Macmillan, 1999).

1.4.1. PROGESTERONA Y SUS ANÁLOGOS SINTÉTICOS MÁS eCG

El uso de progesterona en la reproducción es de gran importancia en los tratamientos de inducción y sincronización en pequeños rumiantes. La explicación fisiológica para su uso es que se trata de simular la acción negativa que ejerce la P₄, durante la fase lútea, a nivel hipotalámico, para inhibir los pulsos de GnRH/LH, estimulando la liberación de dinorfina de las neuronas KNDy, mientras que el E₂ inhibe la amplitud del pulso de GnRH al inhibir la secreción de Kp en las neuronas de GnRH (Goodman *et al.*, 2002). Por otro lado, la disminución de las concentraciones de P₄ estimula y permite que se incremente la frecuencia de los pulsos de GnRH/LH y por ende aumente la concentración de E₂ (Arroyo-Ledezma

et al., 2006), efecto que se consigue cuando se elimina la fuente exógena de progesterona.

En los últimos 70 años se han utilizado tratamientos a base de progesterona (P₄) y hormona coriónica equina (eCG), para mejorar la respuesta estral y ovulatoria en hembras tratadas. Estos tratamientos consisten principalmente en la administración de un análogo de la progesterona, como pueden ser el uso de esponjas vaginales, de las cuales se pueden encontrar en el mercado principalmente son acetato de fluorogestona (FGA) y acetato de medroxiprogesterona (MPA). Estos tratamientos se comenzaron a utilizar basándose en la duración de la fase lútea del ciclo estral de las ovejas que comprendía entre 12 a 14 días. Para completar el efecto ovulatorio, tras este tratamiento se administra eCG. En ovejas fuera de su estación reproductiva, el uso de progestágenos sin administración conjunta de eCG se relaciona con un bajo número de los animales que respondan al tratamiento (Boland *et al.*, 1978; Umberger *et al.*, 1994). debido a la falta del estímulo gonadal necesario para la ovulación. Dosis de 100 a 750 UI de eCG pueden generar una respuesta estral similar, pero la tasa ovulatoria es significativamente mayor cuando la gonadotropina se inyecta en mayor cantidad (Oliveira *et al.*, 2001; Boland *et al.*, 1981). La gonadotropina tiene un efecto primordial FSH y secundariamente un efecto LH, y actúa directamente a nivel de los ovarios para dar paso a un ovocito apto para ser fecundado (Oliveira *et al.*, 2001).

Sin embargo, algunos autores indican que el uso repetido de la eCG provoca descensos en la fertilidad. Tal efecto se ha atribuido a la presencia de anticuerpos anti-eCG que se producen como respuesta inmune desde el primer tratamiento (Baril *et al.*, 1996; Bodin *et al.*, 1997; Chemineau *et al.*, 1999; Maurel *et al.*, 2003). Además, en cuanto fue avanzando la investigación, se encontró que el uso de esponjas vaginales provocaba adherencias e inflamación, siendo un factor predisponente para la aparición de infecciones vaginales mucopurulentas (Figura 16; Ungerfeld & Rubianes, 2002; Martínez-Ros *et al.*, 2018a).



Figura 16. Puntuación del flujo vaginal en el momento de la extracción de la esponja intravaginal: 0: flujo insignificante o sin flujo; 1—alguna cantidad, pero descarga clara; 2—cantidades abundantes y hemorrágicas o purulentas (Tomado de Martínez-Ros *et al.*, 2018a).

Posteriormente, en los años 80, se comenzó a comercializar un dispositivo intravaginal de liberación controlada (CIDR®), hecho a base de silicona inerte, que contiene progesterona natural, con el que se logró disminuir la aparición de infecciones vaginales (Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2020). Con la incorporación de la ecografía transrectal y el conocimiento del desarrollo folicular, se logró determinar que el crecimiento de los folículos se producía en ondas foliculares, como hemos descrito anteriormente, (presentándose de 3 a 4 en ovejas), con un intervalo de 5 a 7 días, por lo que se comenzó a estudiar el implementar tratamientos de progesterona a tiempo corto (5 y 7 días) vs tratamientos de larga duración (12 o 14 días). Estos tratamientos mostraban resultados similares a los tratamientos largos tradicionales, promocionando el uso de tratamientos cortos a base de CIDR y administración de eCG, con inseminación a tiempo fijo (IATF) (Figura 17; Menchaca & Rubianes, 2014). En los últimos años este protocolo ha constituido en un tratamiento muy utilizado en los sistemas de producción, ya que se puede utilizar para la inducción y sincronización estral, tanto en anestro estacional como en estación reproductiva. También permite reutilizar el dispositivo hasta 3 veces disminuyendo el coste, sin comprometer la respuesta reproductiva (Vilariño *et al.*, 2011).

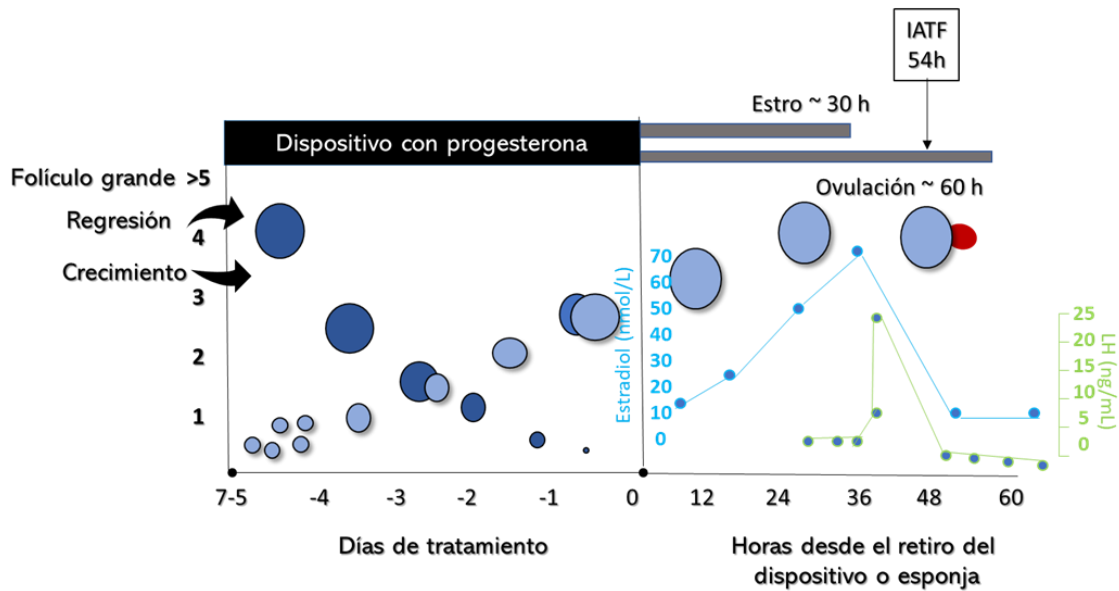


Figura 17. Representación esquemática del protocolo de progesterona a corto plazo para inducir / sincronizar el estro (Adaptado y modificado de Rubianes & Menchaca, 2003; Menchaca & Rubianes, 2014).

La efectividad de los tratamientos progestativos depende tanto de factores intrínsecos como extrínsecos. Entre los factores intrínsecos que modulan la respuesta se mencionan el genético o racial (Kareta *et al.*, 2006), la edad de la hembra (Ainsworth & Wolynetz, 1982) y el estado nutricional (Scaramuzzi *et al.*, 2006). Todos ellos, ya sea de forma aislada o en conjunto, establecen o definen el estatus ovárico en el momento de aplicar los protocolos de sincronización y, en consecuencia, la respuesta a éstos (González-Bulnes & Contreras-Solís, 2012). Entre los factores extrínsecos que afectan la efectividad de los tratamientos progestativos destacan el tipo de principio activo (Rhodes & Nathanielsz, 1988; Lopez-Sebastian *et al.*, 1993), la estación de aplicación del tratamiento (Rhodes & Nathanielsz, 1988; Walker *et al.*, 1989), la dosis empleada (Simonetti *et al.*, 2000) y la duración o tipo de protocolo empleado (Ungerfeld & Rubianes, 2002).

1.4.2. USO DE eCG, OPINIÓN PÚBLICA Y BIENESTAR ANIMAL

Los parámetros productivos y reproductivos son parte clave del manejo exitoso de los pequeños rumiantes y debe estar respaldado por estándares transparentes que promuevan un alto bienestar para mantener la producción más limpia y ética de las industrias (Nardone *et al.*, 2004; Sevi *et al.*, 2007; Council, 2009). En los últimos 70 años, los tratamientos a base de progesterona y eCG han sido los protocolos de elección en las explotaciones ovinas y caprinas (Abecia *et al.*, 2012; Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2020), ya que la hormona eCG permite un alto grado de inducción y sincronización. Con su uso se aumenta también la prolificidad, sobre todo durante el anestro estacional, debido a su actividad biológica similar a FSH y su interacción similar y potente con los receptores de LH (Murphy & Martinuk, 1991).

Sin embargo, en los últimos años, las nuevas tendencias van encaminadas a producir de manera ética, verde y limpia (Martin & Vercoe, 2017). En lo que respecta a las cuestiones éticas, la creciente influencia de la opinión pública, potenciada por las redes sociales, conduce a nuevas fuerzas en el mercado. En este marco, se está cuestionando el uso de los protocolos de sincronización con preocupaciones sobre la salud, el bienestar de los animales, la seguridad alimentaria y el impacto ambiental, como está sucediendo con muchas otras intervenciones estratégicas en el manejo del ganado (Martin *et al.*, 2004).

Los veterinarios e investigadores se enfrentan a un gran reto sobre el manejo y cuidado de los animales. La opinión pública cobra peso sobre cómo se deberían realizar los procedimientos de obtención de algunas hormonas. Así pues, se sabe que, para la obtención de la hormona gonadotropina coriónica equina, las yeguas deben estar entre el día 40 y 120 de gestación, ya que durante este periodo las copas endometriales, por medio de las células epiteliales trofoblásticas de origen fetal, son capaces de producir la hormona, para lo cual se extraen grandes cantidades de sangre de la vena yugular (Allen & Stewart, 1993; Manteca-Vilanova *et al.*, 2019; González-Bulnes *et al.*, 2020). Dicha técnica ha causado opiniones divididas en cuanto al cumplimiento de las normas de bienestar animal para las hembras que son utilizadas para dicho fin, por lo cual es probable que la comercialización de esta hormona pueda verse comprometida (Decourt & Beltramo, 2018).

Debido a lo anterior, diversos grupos de investigación han evaluado el uso de una glicoproteína sintética, con efectos similares a los obtenidos con la eCG producida de manera natural, mostrándose una respuesta favorable cuando se utiliza en ganado ovino y bovino (Moscoso *et al.*, 2022; Cuadro *et al.*, 2022). Si bien esta hormona se encuentra en su fase de estudio (Crispo *et al.*, 2021), aún no está disponible en el mercado. Por consiguiente, el papel del investigador es la búsqueda de alternativas viables, sustituyendo el uso de eCG por otras hormonas, pero sin alterar los resultados ya existentes.

1.5. TRATAMIENTOS ALTERNATIVOS AL USO DE eCG

1.5.1. ANÁLOGOS DE HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROPINAS (GnRH)

Dentro de las hormonas que se pueden utilizar para suplir el uso de la eCG se encuentran sus análogos sintéticos de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). La administración de GnRH exógena se une a los receptores a nivel del hipotálamo para estimular la liberación de FSH y LH, lo que favorece el crecimiento folicular y esto induce la ovulación en fase folicular o la atresia del folículo de mayor tamaño (Lone *et al.*, 2016), seguida de una nueva onda folicular (Peters *et al.*, 1999), en fase lútea.

La administración exógena de 100 µg de GnRH (dosis estándar en bovinos), ejerce un pico de LH de mayor amplitud, aunque de menor duración que el producido de manera endógena, que es de menor amplitud, pero de mayor duración. A pesar de estas diferencias, tanto un pico endógeno como exógeno serían suficientes para producir ovulación de un folículo dominante (Wiltbank & Haughian, 2003). Una dosis de GnRH puede, por una parte, aumentar el número de folículos dependientes a gonadotropinas que crecen hasta la fase preovulatoria en respuesta a la FSH (Lopez-Alonso *et al.*, 2005) y, por otra, inducir un pico preovulatorio de LH, tanto en vacas (Peters *et al.*, 1985; Twagiramungu *et al.*, 1994, 1995) como en ovejas (Rubianes, 1997; 2000).

La vida media de la GnRH endógena es de 2 a 4 minutos, para después ser degradada por peptidasas y eliminada por filtración glomerular. Se han sintetizado análogos con efecto agonista o antagonistas, con el fin de aumentar el efecto y la duración (Kumar & Sharma, 2014). Se pueden encontrar diferentes análogos para el uso de tratamientos en ovejas como son: Buserelina (Beck *et al.*, 1993; Titi *et al.*, 2010), Gonadorelina (Sirjani *et al.*, 2011; Martinez-Ros & González-Bulnes, 2019) o Lecirelina (Kaya *et al.*, 2008).

En un principio se creía que los tratamientos de GnRH eran efectivos sólo para mejorar la implantación embrionaria, debido a que incrementaban considerablemente los niveles de progesterona que son necesarios para mantener

la gestación temprana (Sreenan *et al.*, 1996). Es por eso por lo que se utilizaron en pequeños rumiantes de 10 a 12 días después de la inseminación artificial y/o monta natural, tal como han publicado Cam & Kuran (2004), que obtuvieron un aumento considerable del 80% de gestaciones en ovejas tratadas con 4 µg de GnRH, 12 días después de la monta natural en comparación con el grupo control que solo fue del 60%.

Sin embargo, se han incorporado también en los tratamientos de control de ovulaciones en ovejas, mediante el protocolo *Ovsynch*. Este consiste en una administración de GnRH el día del inicio del protocolo (día 0) para propiciar la ovulación de los folículos dominantes, seguida de una inyección de PGF_{2α} en el día 5 o 7 para inducir la luteólisis, para finalizar con una administración de GnRH, en el día 7 o 9 (Figura 18; Ashmawy, 2011; Yadav *et al.*, 2020).

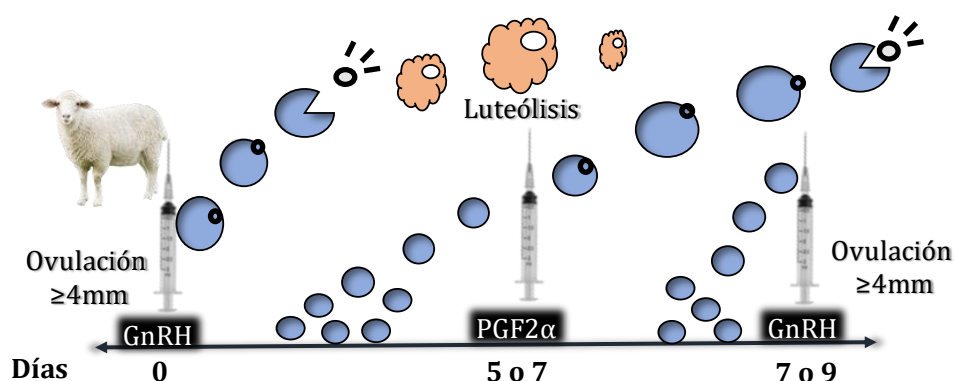


Figura 18. Representación esquemática de un tratamiento OVSYNCH en ovejas (Adaptado de Ashmawy, 2011).

Yadav *et al.* (2020), realizaron un estudio en el que evaluaron el protocolo *Ovsynch* donde observaron que la actividad estral durante la estación reproductiva puede ser de un 66,67% y puede inducir un 50% de actividad durante el anestro estacional. La baja respuesta se le atribuye a la baja capacidad de la primera inyección para inducir la ovulación y la formación del cuerpo lúteo sobre el que posteriormente actúa la PGF_{2α} (Hashem *et al.*, 2015b).

Se observó que, dependiendo de la etapa del ciclo en que se encontraran las hembras, la respuesta ovulatoria variaba. En vacas, por ejemplo, se ha observado que en las etapas finales del estro las hembras no ovularon en respuesta a la GnRH (Geary *et al.*, 2000). Se sugirió que, si se agregaba la inserción de una esponja intravaginal impregnada con un análogo sintético de progesterona, más la administración de GnRH, se podrían mejorar los resultados. En una investigación realizada en ovejas Awassi, se comparó el uso del protocolo *Ovsynch* en un intervalo de administración a 5 días *vs* la inserción de una esponja intravaginal con FGA durante 5 días, combinada con GnRH en el momento de la inserción de la esponja y una dosis de PGF_{2α} al momento de la retirada. En los resultados se observó que las ovejas mostraron un 77% de actividad estral y presencia de partos múltiples (Titi *et al.*, 2008). Por ello, se estableció que el uso de un progestágeno mejora los resultados, ya sea en el momento de la inserción del CIDR o como presincronizador antes del tratamiento con GnRH (Husein & Kridli, 2003).

Reyna *et al.*, (2007), utilizaron una administración de GnRH 36 h después de la retirada de la esponja vaginal impregnada con FGA y la aplicación de eCG, durante la temporada reproductiva y anestro estacional. Se concluyó que la aplicación de GnRH mejoró la sincronización de la ovulación, pero no mejoró las tasas de fertilidad después de la IA.

Kaya *et al.*, (2013), también evaluaron el uso de la GnRH administrada al momento de la inserción de esponjas impregnadas con FGA, *vs* 2 aplicaciones en un intervalo de 7 días con 8,5 µg de Buserelina (análogo sintético de la GnRH) durante el anestro estacional. En los resultados, el 66% de las hembras de ambos grupos mostraron actividad estral.

Por otro lado, Martínez-Ros & González-Bulnes, (2019) realizaron un estudio en el que se evaluó el uso de GnRH al inicio del tratamiento con CIDR y/o a las 56 horas después de la retirada. Los resultados fueron similares cuando compararon estos protocolos con los tratamientos tradicionales CIDR-eCG, en los cuales el 85% de las hembras tratadas mostraron respuesta estral y ovulación del 100%, independientemente del tratamiento administrado, por lo que se concluyó que el uso de 50 µg de Gonadorelina (GnRH) es igual de efectivo que el tratamiento con

eCG para sincronizar la actividad estral en ovejas. Se puede observar que existe una variabilidad en la respuesta reproductiva cuando se utilizan tratamientos a base de GnRH (Tabla 3), ya sea para inducir, sincronizar o mejorar la implantación embrionaria por lo cual se requiere más investigación para determinar la eficacia de este tratamiento.

Tabla 3. Protocolos utilizados con GnRH como componente principal o complementario, en tratamientos a base de progesterona (CIDR y/o esponja).

Objetivo	Tratamiento	Análogo	Dosis	Intervalo/duración/administración	Estación	Servicio	Estro (%)	Gestación (%)	Referencia
Mejorar la fertilidad	GnRH+PGF _{2α} +GnRH	Buserelina	4 µg	7 días	Anestro	MN	53,33	62,50	Yadav <i>et al.</i> , 2020
					Reproductiva	MN	66,67	70,0	
Mejorar las tasas de gestación	PGF _{2α} +GnRH+PGF _{2α} +GnRH	Gonadorelina	200 µg	7 días	Reproductiva	IATF	NR	50	Vallejo <i>et al.</i> , 2019
	GnRH+PGF _{2α} +GnRH					IATF	NR	29	
Sincronización de la ovulación	GnRH+CIDR+GnRH	Gonadorelina	50 µg	5 días	Reproductiva	MN	84,2	68,4	Martínez-Ros & González-Bulnes 2019
	CIDR+GnRH			Dosis única a las 56 h después del retiro		MN	89,5	57,9	
			50 µg	Dosis única al momento de la inserción del CIDR		MN	77,8	NR	

Inducción celo y ovulación	GnRH+CIDR+ eCG+PGF _{2α}	Gonadorelina	100 μg		Anestro	MN	77,8	NR	Martinez <i>et al.</i> , 2015
Mejorar la implantación	PGF _{2α} + PGF _{2α} +GnRH	Buserelina	4 μg	Dosis única en el día del celo	Reproductiva	MN	100	75	Hashem <i>et al.</i> , 2015
				7 días después de la monta		MN		70	
				Dosis única seguida por una administración de PGF _{2α} 5 días después		MN		81	
Sincronización de la ovulación	PGF _{2α} +PGF _{2α} +GnRH	Buserelina	8,4 μg	Dosis única 24h después de la segunda aplicación de PGF _{2α}	Reproductiva	IATF	NR	10	Olivera-Muzante <i>et al.</i> , 2013
				Dosis única 36h después de la segunda aplicación de PGF _{2α}		IATF		36,7	
Inducción	GnRH+FGA+GnRH+PGF _{2α} al retiro	Buserelina	8,5 μg	14 días	Anestro	MN	66,6	66,6	Kaya <i>et al.</i> , 2013
Mejorar la implantación	CIDR+eCG + GnRH,	Gonadorelina	50 μg	Dosis única 24h después del retiro del dispositivo	Reproductiva	MN	NR	162	Sirjani <i>et al.</i> , 2011
	PGF _{2α} + FGA + GnRH			Dosis única 30h después del retiro	Anestro	MN	66,6	33,3	

Inducir y Sincronizar la ovulación	GnRH + PGF _{2α} + eCG	Gonadorelina	100 μg	Dosis única al inicio del experimento		MN	91,7	66,7	Martemucci & D'Alessandro, 2011
	FGA+ PGF _{2α} + GnRH			Dosis única 30h después del retiro	Reproductiva	IA 52/60h	NR	40/20	
	FGA + PGF _{2α} +eCG +GnRH					IA 52/60h	NR	20/60	
Sincronización	GnRH+FGA+PGF _{2α} al retiro.	Buserelina	100 μg	Dosis única al inicio del experimento	Reproductiva	MN	NR	47	Titi <i>et al.</i> , 2008
	GnRH+PGF _{2α}					MN		20	
Sincronización de la ovulación	FGA+ PGF _{2α} + GnRH	Gonadorelina	40 μg	Dosis única 36h después del retiro	Reproductiva	IA	NR	46,6	Reyna <i>et al.</i> , 2007
	FGA + PGF _{2α} + eCG + GnRH			Dosis única 36h después del retiro	Anestro	IA		26	
Sincronizar celo y ovulación	GnRH+PGF _{2α}	Buserelina	4 μg	Dosis única seguida por una administración de PGF _{2α} 5 días después	Reproductiva	MN	91	88,8	Beck <i>et al.</i> , 1996

PGF_{2α}: prostaglandinas F_{2α}; FGA: esponjas con acetato de fluorogestona; CIDR: dispositivo intravaginal de liberación controlada; GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas; eCG: gonadotropina coriónica equina; MN: monta natural; IATF: inseminación artificial a tiempo fijo. NR: no reportado.

1.5.2. PROSTAGLANDINA F_{2α} Y SUS ANÁLOGOS

Durante la década de los 70's del siglo pasado, después de determinar la potente actividad de la prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) como factor luteolítico, se comenzó la producción de análogos sintéticos de la misma. Estos son más económicos que la PGF_{2α} natural y se logra el efecto luteolítico con dosis menores. La aplicación de estos tratamientos induce la lisis del cuerpo lúteo y, en consecuencia, la aparición de una fase folicular acompañada de celo y ovulación (Acriptopoulou *et al.*, 1977). Obviamente, debe aplicarse en hembras cíclicas y su eficacia depende del estado funcional del CL, ya que, como concepto general, se ha aceptado que el tejido luteal durante su fase de formación (primeros días del ciclo) no es sensible a la PGF_{2α} (Rubianes *et al.*, 2003). La principal ventaja del tratamiento con prostaglandinas F_{2α} es la facilidad de la aplicación de la inyección intramuscular, así como el manejo y el bienestar de los animales, en comparación con los dispositivos intravaginales. Además, la producción de residuos químicos disminuye, ya que el producto es de rápida eliminación y casi totalmente (99%) metabolizado en los pulmones (Light *et al.*, 1994; Fierro *et al.*, 2013).

Sin embargo, cuando no se conoce la fase del ciclo en que se encuentran las hembras, una sola inyección no permite controlar el momento de la ovulación (Whitley & Jackson, 2004; Holtz, 2005). Por ello, se hace necesaria una segunda dosis en los siguientes 8-15 días (Ogunbiyi *et al.*, 1980; Ahmed *et al.*, 1998; Wildeus, 2000; Ramírez *et al.*, 2014; Andrabi *et al.*, 2015); momento en el que, con certeza, existirá un cuerpo lúteo sensible a la PG (Abecia *et al.*, 2012).

Se estudiaron variaciones de los tratamientos a base de prostaglandinas, por lo que surgió la propuesta de utilizar el protocolo Synchronvine®, que consiste en 2 dosis de PGF_{2α} separadas por 7 días, seguida de una IATF a las 42 h de la segunda dosis por vía cervical (Figura 19). Fue desarrollado con el objetivo de aumentar el grado de sincronización de la ovulación después de las inyecciones de PGF_{2α}, promoviendo una mayor fertilidad en la inseminación artificial a tiempo fijo (Álvarez, 2015). Se partió del conocimiento de que, cuando se aplica la primera

dosis de $\text{PGF}_{2\alpha}$, la ovulación ocurre en los 2-4 días siguientes, lo que inducirá la aparición de la primera oleada folicular del siguiente ciclo. El folículo dominante de dicha oleada se desarrollaría durante 4-7 días junto con el cuerpo lúteo de la ovulación. Al administrar una segunda dosis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ en el día 7 (días 3-5 desde la ovulación) en lugar del día 11, se coincide con el momento en que el cuerpo lúteo es sensible y el folículo aún está desarrollándose (Rubianes *et al.*, 2003; Menchaca & Rubianes, 2004).

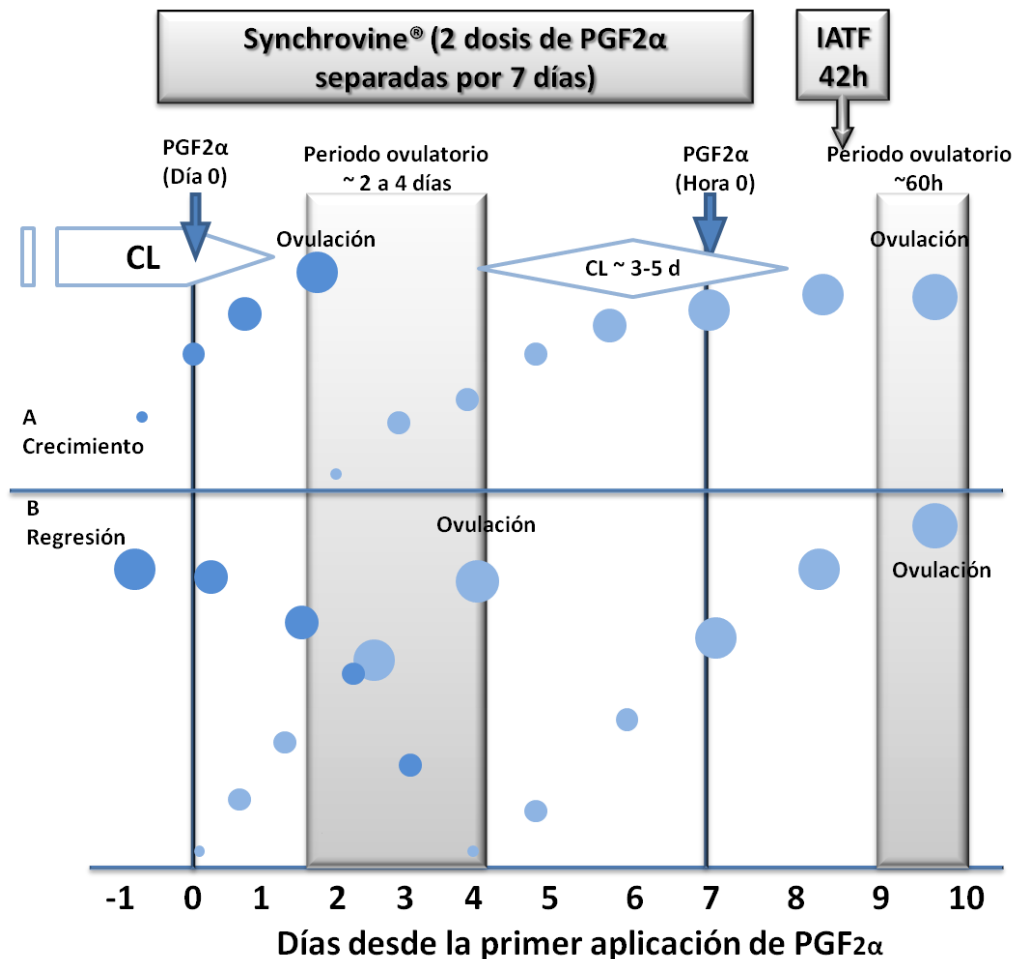


Figura 19. Esquema representativo de la respuesta inducida con Synchronovine® en ovejas ciclando. Tras la primera dosis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ se induce la luteólisis y la ovulación ocurre 2-4 días más tarde, en respuesta a la presencia de un folículo en crecimiento (Panel A) o en regresión (Panel B). Al administrar la segunda dosis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ estaremos en presencia de un folículo de 3-5 días y entonces la ovulación ocurre de manera sincronizada a las 60 h (Adaptado de Menchaca & Rubianes, 2004).

El uso de las prostaglandinas suele combinarse exitosamente también con administración de progesterona intravaginal, con el objetivo de incrementar el grado de sincronización, eliminando un posible cuerpo lúteo al retirar el progestágeno (Leboeuf *et al.*, 2003; Holtz *et al.*, 2008). Las dosis probadas y que han mostrado buenos resultados varían de acuerdo con la prostaglandina que se esté utilizando (3,75mg luproliol; 2,5-10mg dinoprost; 62,5mg cloprostenol; Bretzlaff & Ott, 1983; Nuti *et al.*, 1992; Holtz *et al.*, 2008). Aunque se han probado varias vías de administración, la intramuscular resulta la más práctica (Mgongo, 1987; Whitley & Jackson, 2004).

Los animales pueden ser observados en celo desde las 24-48 horas después de la segunda inyección y la actividad ovárica en respuesta llega a ser de hasta el 100% (Tabla 4; Bretzlaff *et al.*, 1983; Ahmed *et al.*, 1998; Romano, 1998).

Tabla 4. Efecto de la administración de diferentes dosis e intervalo de inyección (días) de análogos de prostaglandinas $F_{2\alpha}$ sobre la respuesta estral y tasa de fertilidad en ovejas durante la estación reproductiva. (Tomado y adaptado de Hameed *et al.*, 2021).

Hormona	Dosis	Intervalo en días	Tipo de servicio	ER%	PR%	Referencia
Cloprostenol	120 µg	7	Natural	91	73,3	Souza-Fabjan <i>et al.</i> (2018)
		9		91	75,9	
		11		94	75,9	
Delprostenate	160 µg	12	IATF	NR	39,7 ^a	Fierro & Olivera-Muzante (2017)
		13			40,0 ^a	
		14			48,7 ^{ab}	
		15			82,9 ^{bc}	
		16			59,7 ^{bc}	
Delprostenate	160 µg	7	IATF	100	NR	Vilarino <i>et al.</i> (2017)
D-cloprostenol	75 µg	SD		86.7		
DL-Cloprostenol	125 µg	7		NR	63 ^b	Fierro <i>et al.</i> (2011)

Control (estro natural)					88 ^a	
Dinoprost	10 mg	SD	Natural	NR	55	Risvanli <i>et al.</i> (2010)
Cloprostenol sodium	150 µg				70	
D-cloprosternol	150 µg				70	
Cloprostenol	126 µg	9	NR	100	NR	Contreras-Solis <i>et al.</i> (2009a,b)
	68,25 µg	9		75		
	38,5 µg	9		87,5		

ER, respuesta estral; PR, Tasa de gestaciones; NR, No reportado; SD, Dosis única; IATF, inseminación a tiempo fijo; Natural, monta natural por el macho.

Se ha demostrado que el uso de PGF_{2α} puede no ser tan viable para implementarlo bajo esquemas de inseminación artificial a tiempo fijo, ya que se ha observado que sincroniza la actividad estral pero no la ovulación (González-Bulnes *et al.*, 2020). Por lo anterior, se han realizado estudios en los cuales después de un tratamiento a base de dos dosis de prostaglandinas F_{2α} se aplica una administración de GnRH (Olivera-Muzante *et al.*, 2013; Nasheim *et al.*, 2015) o eCG (Cueto *et al.*, 2020) con el fin de sincronizar la ovulación y mejorar la tasa de gestación en las hembras tratadas.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1. JUSTIFICACIÓN

El objetivo principal de los protocolos experimentales descritos en esta Memoria de Tesis Doctoral es el diseño y validación de métodos de inducción y sincronización de celo y ovulación en ovino, que puedan ser utilizados tanto en estación reproductiva como en anestro estacional y que no sean dependientes del uso de gonadotropina coriónica equina (eCG).

La eCG es obtenida de sangre periférica en yeguas gestantes, ya que es secretada por las copas endometriales entre los 40 y 120 días de gestación. Esta práctica ha generado rechazo por parte de grupos de movimiento animalista y la campaña realizada por los mismos en contra de esta hormona ha provocado que los laboratorios disminuyan su producción.

Esta situación supone un grave problema para el sector de la producción animal, ya que la administración de eCG es imprescindible en los tratamientos de inducción y de sincronización de celos y ovulaciones realizados en anestro estacional o en aquellos protocolos que impliquen inseminación artificial. La eCG, gracias a su efecto biológico similar al de las hormonas foliculoestimulante (FSH) y luteinizante (LH), estimula el crecimiento y maduración de los folículos ovulatorios y, posteriormente, su ovulación.

En los últimos años se han llevado a cabo diferentes estudios para buscar una hormona que induzca la ovulación. Entre ellas, destaca el uso de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la gonadotropina coriónica humana (hCG) y la gonadotropina menopáusica humana (hMG); si bien todas ellas presentan inconvenientes en cuanto a su actividad, aplicación práctica o costes.

En base a estas consideraciones, la hipótesis de esta Memoria de Tesis Doctoral se relaciona con la posible utilidad de la administración de GnRH como una alternativa al uso de la eCG en protocolos de inducción y sincronización de celos y ovulaciones, tanto en estación reproductiva como en anestro estacional. Estudios previos han establecido su posible utilidad durante la estación reproductiva pero

no se conoce la respuesta en animales en anestro estacional, cuando la actividad del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal se encuentra disminuida. Para ello, se establecieron los siguientes objetivos general y específicos.

2.2. OBJETIVO GENERAL

Evaluar, en ovejas, la respuesta reproductiva a tratamientos basados en la aplicación de CIDR® en combinación con una dosis de GnRH y, basándonos en los resultados obtenidos, determinar su posible optimización mediante la administración de GnRH en formulaciones de liberación lenta.

2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el **efecto de la paridad** (ovejas nulíparas vs multíparas) sobre la respuesta ovárica, la fertilidad y la prolificidad, después de un tratamiento con CIDR® a corto plazo, en combinación con eCG, administrado durante el anestro estacional.
- Analizar la respuesta reproductiva a la **administración de GnRH en agua destilada** en protocolos de inducción de celo y ovulación con progesterona **durante la estación de anestro estacional.**

Los resultados obtenidos determinaron el desarrollo de los objetivos particulares:

- Analizar la respuesta reproductiva a la **administración de GnRH, utilizando propilenglicol como vehículo de liberación lenta**, en protocolos de sincronización de celo y ovulación con prostaglandinas o progesterona **durante la estación de actividad reproductiva.**

- Analizar la respuesta reproductiva a la **administración de GnRH, vehiculizada en propilenglicol**, en protocolos de inducción de celo y ovulación con progesterona **durante la estación de anestro estacional**.
- Analizar la respuesta reproductiva a la **administración de GnRH por vía vaginal** (OvuGel®), en protocolos de inducción de celo y ovulación con progesterona **durante estación de transición anestro/estación reproductiva**.

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Los experimentos se realizaron en México (granja comercial Ejido La Partida; Coahuila, latitud 25°N), utilizando ovejas de raza Dorper y en España (granja experimental de la Universidad CEU Cardenal Herrera, Valencia; latitud 39°N), utilizando ovejas de raza Segureña. Ambas razas son utilizadas para la producción de carne.

En ambos casos, los experimentos se llevaron a cabo bajo las normas nacionales e internacionales para el cuidado y protección éticos de los animales utilizados en investigación y fueron evaluados y aprobados específicamente por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad CEU Cardenal Herrera (informe CEEA17/019).

Para el cumplimiento de los objetivos de la tesis doctoral fue necesario comprobar que las hembras utilizadas en los protocolos se encontraban completamente sanas. Por ello, antes de iniciar los experimentos se realizaron valoraciones clínicas de todos los animales, para descartar que las hembras estuvieran gestantes y la presencia de alteraciones en el aparato reproductor o patologías sistémicas.

En todos los experimentos se sincronizó el celo y la ovulación mediante dispositivos intravaginales de progesterona (CIDR®) y se consideró un grupo tratado con una dosis de gonadotropina coriónica equina (eCG) como “grupo control”, frente a los grupos experimentales tratados con GnRH en diferentes formulaciones y con distintos regímenes posológicos (vías y momento de administración). En todos los experimentos las variables evaluadas para valorar el efecto del tratamiento consistían principalmente en determinar la actividad reproductiva, la ovulación y la tasa de gestación. El tipo de servicio que recibieron las hembras en todos los experimentos fue, mediante monta natural, con la ayuda de carneros entrenados.

Experimento 1. Efecto de la paridad (ovejas nulíparas vs multíparas) sobre la respuesta ovárica, la fertilidad y la prolificidad después de un tratamiento con CIDR® a corto plazo, en combinación con eCG, administrado durante la estación de anestro estacional.

El experimento se llevó a cabo durante la estación no reproductiva (marzo) en una finca del Ejido La Partida, Coahuila, México. Se utilizaron 24 ovejas de raza Dorper divididas en dos grupos, uno de ellos de hembras nulíparas (n=13), con una edad promedio de 12 meses, peso corporal de 35,7±0,1 kg y condición corporal de 3,1±0,2 (escala de 0: muy delgada y 5: muy engrasada; Russel *et al.*, 1969) y otro grupo de hembras multíparas (n=11) con un rango de 2 a 4 partos, un peso corporal promedio de 44,0±0,1 Kg y condición corporal de 2,5±0,1. A todas las hembras se les colocó un dispositivo CIDR® intravaginal con 0,3 g de progesterona (CIDR® Ovis, Zoetis, Ciudad de México, México) durante siete días (Figura 20). En el momento de la retirada del CIDR®, todas las hembras fueron tratadas por vía intramuscular con 5 mg de un análogo de prostaglandina F_{2α} (Dinoprost, Lutalyse®, Zoetis, Ciudad de México, México) y 300 UI de eCG (GonActive® eCG, Virbac, Zapopan, México).

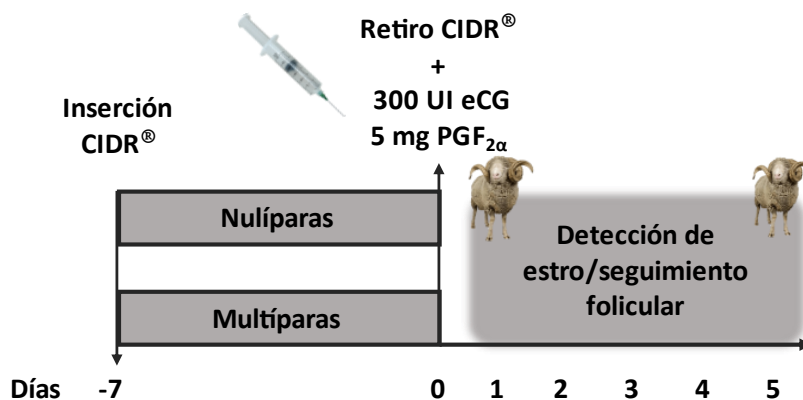


Figura 20. Diseño del experimento 1. Durante el anestro estacional todas las ovejas fueron inducidas a la actividad estral mediante la inserción de un CIDR® durante 7 días y la administración de 300 UI de eCG y 5 mg de PGF_{2α} a la retirada del dispositivo. El efecto del tratamiento se evaluó mediante el seguimiento, durante 5 días, del desarrollo folicular y la aparición del estro.

Las variables evaluadas fueron: porcentaje de aparición y momento de aparición de los signos de celo (tras la retirada del CIDR®); porcentaje y momento de

aparición de la ovulación; tasa de ovulación en el día 11 del ciclo sexual inducido, además de la tasa embrionaria y porcentaje de hembras gestantes todo mediante un transductor transrectal lineal en modo B de 7,5 MHZ (Eco 5, Chison Co., Wusi, China).

Los resultados mostraron que el 100% de las ovejas multíparas presentaron manifestaciones de celo (como fueron movimiento de cola, acercamiento al macho, vulva enrojecida y aceptación de la monta), una cifra muy superior al 54% encontrado en las ovejas nulíparas ($p < 0,05$). La fertilidad también fue baja en las ovejas nulíparas (30,8 frente a 72,7% en ovejas multíparas). Sin embargo, la observación de la ovulación mostró que el 81,8% de las ovejas multíparas y el 100% de las nulíparas habían ovulado. Los resultados de nuestra investigación muestran que, durante el anestro estacional, la expresión externa de celo de las ovejas nulíparas se ve reducida, por lo que se necesita desarrollar estudios complementarios para determinar si una dosis más alta de eCG, pudiera mejorar esta respuesta.

Los resultados de esta investigación se encuentran publicados en la revista *Veterinary Science*.

Información de la Revista

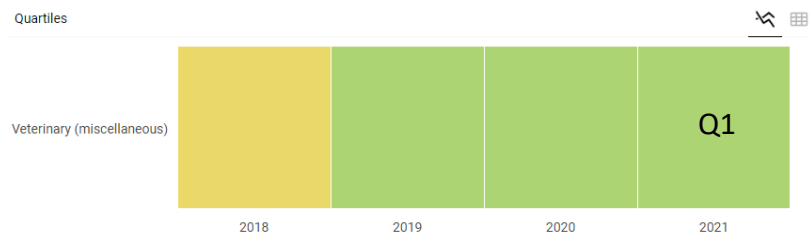
Tomado de Scimago Journal & Country Rank

Factor de Impacto: 2.518 (2021)



Veterinary Sciences publica artículos originales de investigación, revisiones, comunicaciones y notas breves que son relevantes para cualquier campo de las ciencias veterinarias, incluyendo la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades, trastornos y lesiones en los animales.

Type	↓ SJR	H index	Total Docs. (2021)	Total Docs. (3years)	Total Refs. (2021)	Total Cites (3years)	Citable Docs. (3years)	Cites / Doc. (2years)	Ref. / Doc. (2021)
Veterinary Sciences 	0.520 Q1	19	331	406	17239	1045	396	2.44	52.08 



Article

Ovarian Response and Fertility after Short-Term Progestagen/eCG Treatments Are Compromised in Nulliparous Sheep during Non-Breeding Season

Zurisaday Santos-Jimenez ¹, Paula Martínez-Ros ^{2,*}, Teresa Encinas ¹, Juan Luis Morales-Cruz ³, Hugo Zuriel Guerrero-Gallegos ³, Ramiro Gonzalez-Avalos ³, Antonio Gonzalez-Bulnes ^{1,2} and Juan Manuel Guillen-Muñoz ^{3,*}

¹ Departamento de Farmacología y Toxicología, Facultad de Veterinaria, UCM, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, Spain

² Departamento de Producción y Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Cardenal Herrera-CEU, CEU Universities, C/Tirant lo Blanc 7, Alfara del Patriarca, 46115 Valencia, Spain

³ Unidad Laguna, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Torreón 25315, Coahuila, Mexico

* Correspondence: paula.martinez@uchceu.es (P.M.-R.); jmanuel.guillenm@uaaan.edu.mx (J.M.G.-M.)

Citation: Santos-Jimenez, Z.; Martínez-Ros, P.; Encinas, T.; Morales-Cruz, J.L.; Guerrero-Gallegos, H.Z.; Gonzalez-Avalos, R.; Gonzalez-Bulnes, A.; Guillen-Muñoz, J.M. Ovarian Response and Fertility after Short-Term Progestagen/eCG Treatments Are Compromised in Nulliparous Sheep during Non-Breeding Season. *Vet. Sci.* **2022**, *9*, 663. <https://doi.org/10.3390/vetsci9120663>

Academic Editor: Fred Sinowatz

Received: 20 October 2022

Accepted: 23 November 2022

Published: 28 November 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: The application of treatments based on controlled dose progesterone intravaginal devices (CIDR) plus equine chorionic hormone (eCG) has been favored in recent years for the induction and/or synchronization of estrus activity and ovulation in the breeding and the non-breeding seasons. In anestrus mature ewes, short-term treatments are equally effective as long-term treatments, but information on the effects of such treatments for maiden sheep is scarce.

Abstract: The objective of this investigation was to determine the ovarian response, fertility, and prolificacy of nulliparous sheep when compared to multiparous sheep after a short-term (7 days) CIDR/eCG treatment which was administered during the non-breeding season. All the multiparous sheep, whereas only 54% of the nulliparous ewes, showed signs of estrus. However, 81.8% of the multiparous sheep and 100% of the nulliparous ewes ovulated. Fertility was also low after short-term progesterone treatments during the anestrus season in maiden sheep (30.8 vs. 72.7% in multiparous ewes). Such results indicate significant differences in the response to CIDR/eCG protocols for induction and synchronization of estrus and ovulation between nulliparous and multiparous sheep during the non-breeding season.

Keywords: anestrus sheep; nulliparous sheep; induction estrus

1. Introduction

The global human population has been significantly growing in recent years and, by the year 2050, will be approximately 9.5 billion people. Such population growth encompasses an increasing demand for food of animal origin. However, keeping in mind the problems related to the scarcity of resources and global warming, the high demand for food needs to be fulfilled with fewer alterations to the environment and to taking care of animal welfare parameters [1–4].

In such a scenario, small ruminants are a major economical and sustainable resource for rural people living in developing regions and transition countries [5] and in adverse climatic conditions or in harsh and sub-fertile areas, where the breeding of other animals is highly inefficient [6].

In such conditions, health, nutrition, and reproductive efficiency are critical issues for sheep breeding. Sheep are a short-day, seasonally polyestrous species, [3,7,8], with

periods of anestrus, which are modulated by exogenous factors (environmental temperature, nutritional status, and social interactions) [9–11].

Such patterns affect the availability of sheep products during the year and make necessary the induction of reproductive activity during the seasonal anestrus. [12]. The reproductive management during non-reproductive seasons is mainly based on the use of exogenous progesterone during 12–14 days, combined with equine chorionic gonadotrophin (eCG) for the stimulation of terminal follicular development [13–15] and the avoidance of influence of anestrus [16,17].

Currently, ultrasonographic evidence on follicle growth patterns along with health and welfare issues have resulted in the shortening of progesterone-based protocols (5–7) regarding days of treatment [18–20]. Short-term protocols are now frequently used for artificial insemination of sheep under field conditions, although they are still far less popular among producers than classical long-term treatments [21]. The main causes for the reluctance of breeders to use short-term protocols are the need for a PGF2a injection, which causes additional costs (although costs imposed by longer treatment periods and reproductive cycles are not considered) and their own routine using yearly long-term treatments. However, short-term protocols are as effective as long-term protocols for inducing fertile estrous and ovulation in both breeding and non-breeding seasons [18–20].

These data were, however, obtained in multiparous sheep and there is, to the best of our knowledge, a lack of data for nulliparous sheep. The success of protocols for cycle management during the non-breeding season may be compromised in maiden females [22]. First, there are problems associated with the effects of the photoperiod at the hypothalamic level, which is reflected in the absence of endogenous LH during anestrus [23], which may be also compromised by the maturational changes associated with puberty [17,24–27]. Second, initial ovulations at the onset of puberty are generally not accompanied by estrus [16], nor occur after very short-in-duration estrus [28]. Progesterone inhibits the pulsatile secretion of the gonadotrophin releasing hormone (GnRH), and thus LH, in an opposite effect to the positive feedback of estradiol (E2) on the secretion of GnRH and LH [29]. Hence, during the luteal phase of the cycle, when progesterone concentrations are high, the frequency of the GnRH/LH pulses is low. The decrease in progesterone concentration after luteolysis allows the GnRH/LH pulse frequency to increase when stimulated by increased estrogen concentrations [30]. We hypothesize that the use of progesterone-based devices for a short time should overcome this lack of endogenous progesterone, and in a similar way as described for long-term treatments [31,32]. However, there is no previous knowledge on the yields obtained after using such short-term treatments.

Therefore, the objective of this present study was to determine the ovarian response, fertility, and prolificacy of nulliparous sheep when compared to multiparous sheep, after the administration of a short-term CIDR treatment during the non-breeding season.

2. Materials and Methods

2.1. Animals, Ethical Issues, and Experimental Design

All the experimental procedures in the current study were performed according to national and international standards [33] and [34], respectively, for the ethical care and protection of animals used in research.

The trial was carried out during the non-breeding season (March) under natural photoperiod conditions in an intensive production system in a commercial farm (Coahuila, Mexico; latitude 25°37' N and longitude 103°23' W). The rainfall in the month of the experiment was 0.2 mm with maximum average temperatures of 28.4 °C and minimum average temperatures of 11.2 °C. Twenty-four clinically healthy Dorper ewes were involved in the study, being either nulliparous ($n = 13$; around one year-old with no previous births, an average body-weight of 35.7 ± 0.8 kg, and a body condition score of 3.1 ± 0.20 ; mean \pm S.E.M) or multiparous, with a range of 2 to 4 births, and having an interval to the previous lambing that was greater than three months ($n = 11$; average body weight of 44.0 ± 0.15 kg

and body condition score of 2.5 ± 0.10 ; on a scale of (0 = very thin, and 5 = very fat) [35]. The sheep were housed in shaded pens. The males were separated from the females in individual pens 500 m away from the females. All animals had free access to water and alfalfa (comprising 17% crude protein and 1.95 Mcal metabolizable energy).

Seasonal anestrus was confirmed in all sheep by ultrasonographic ovarian scanning with a B-mode 7.5 MHz transrectal linear transducer (Eco 5, Chison Co., Wusi, China). The technician introduced the transducer rectally, previously lubricated with a water-based lubricant, at an angle of 45° . Assessment of the ovaries and characterization of the ovarian structures was performed as described by González-Bulnes et al. [36] for ruling out the presence of corpora lutea. Two scans were performed with an interval of 7 days, with the second before the insertion of the device to ensure that the sheep were anovulatory, according to previous studies in the region [37]. The treatment included the insertion of one intravaginal CIDR device containing 0.3 g of progesterone (CIDR® Ovis, Zoetis, Mexico City, Mexico) for seven days. On CIDR withdrawal, all the females were i.m. treated with 5 mg of prostaglandin F 2α (Lutalyse, Zoetis, Mexico City, Mexico) and 300 I.U. of eCG (GonActive® eCG, Virbac, Zapopan, México).

The variables evaluated during the induced follicular phase and the subsequent luteal phase were the percentage of animals displaying estrus and the timing of estrous behavior, development of ovulatory follicles, and the timing of their ovulations, number of induced corpora lutea and pregnancy rate, and number of embryos in response to the treatment.

2.2. Occurrence and Timing of Estrous Behavior

Signs of estrus behavior were determined twice daily (every 12 h) for five days after CIDR removal. A trained ram was introduced to the group of females for around 15 min. Each female that was identified as being in estrus was taken out of the pen and led to be mated by another male on a one ram/one ewe basis. The intervals from treatment to the onset and ending of the estrus, and therefore the duration of estrus, were defined by the time of the first accepted mating to the first refusal for mating.

2.3. Occurrence and Timing of Ovulation

The females that showed signs of estrus underwent assessment of the number and development of follicles by transrectal ultrasonography (Eco 5, Chison Co., Wusi, China). Once the ovary was located, the disappearance of a large ovulatory follicle (circular anechoic structures representative of follicles with ≥ 4 mm in size) was used as marker of occurrence of ovulation [38]. Ovarian observations were carried out every 12 h; from 36 to 84 h after CIDR removal.

2.4. Ovulation Rate

On day 10, after device removal, presence and number of corpora lutea compatible with ovulation after the treatment were recorded by transrectal ultrasonography in all females [36].

2.5. Fertility and Prolificacy

The occurrence of pregnancy and the number of embryos were evaluated by transrectal ultrasound on day 35 after CIDR removal. In this observation, the anechoic structures in the uterus, compatible with embryo sacs were counted, so females with these characteristics were considered pregnant.

2.6. Statistical Analysis

Data were firstly analyzed by a Shapiro test to determine the normality, and afterwards, the homogeneity of variances was analyzed by a Bartlett test. The data that did not follow a normal distribution were transformed using the cosine function. The statistical model to analyze the variables of duration of estrus (h), time of onset of estrus after CIDR removal (h), ovulation time after CIDR removal (h), ovulation rate (*n*), diameter (mm), and number of follicles (*n*) were analyzed by a comparison of means through a Student's *t*-test. Occurrence of estrous behavior (%), distribution of females showing estrus (%), occurrence at ovulation (%), fertility rate with respect to treated females (%), and fertility rate with respect to females that ovulated (%) were analyzed using a chi-square test. All results in the main text and tables are expressed as mean ± S.E.M. and statistical significance was accepted from *p* < 0.05. All the procedures were executed with the R program Version 4.0.5 (The R Foundation for Statistical Computing, Boston, MA, USA).

3. Results

There were significant differences in the response of nulliparous and multiparous females to the treatment for estrus synchronization (Table 1). In brief, all the multiparous ewes showed estrous activity whereas only around half of the maiden ewes responded to the treatment displayed heat signs. There were no significant differences in the timing of onset and duration of such estrus signs between groups, but the distribution of estrus onset was narrower in maiden ewes (24 to 36 h after CIDR removal) than in adults (24 to 60 h after CIDR removal), as depicted in Figure 1.

Table 1. Percentage and timing (± S.E.M.) of occurrence of estrus in multiparous and nulliparous ewes after a short-term treatment with a controlled internal drug release (CIDR) and equine chorionic gonadotrophin (eCG) during seasonal anestrus.

	Multiparous	Nulliparous
Occurrence of estrous behavior (%)	100 (11/11) ^a	53.9 (7/13) ^b
Estrus duration (h)	29.5 ± 4.08	24.0 ± 2.52
Time of onset of estrus after CIDR removal (h)	41.5 ± 3.4	36.0 ± 1.9

Different letters indicate significant differences between groups (*a* ≠ *b*: *p* < 0.05).

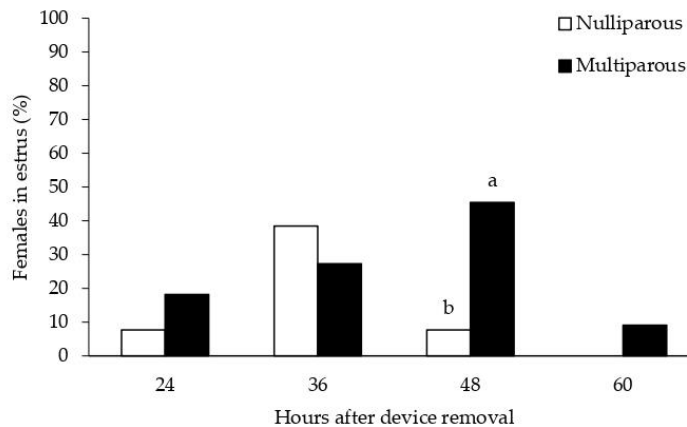


Figure 1. Distribution (%) of sheep showing appearance of estrous behavior over time after CIDR removal. Different letters indicate statistical differences between groups (*a* ≠ *b*: *p* < 0.05).

These features also correspond to differences in the patterns of preovulatory follicle development between nulliparous and multiparous sheep (Figure 2). All the maiden ewes showed a disappearance of preovulatory follicles after 60 h from CIDR removal. The mean diameter of the preovulatory follicle at the time of ovulation showed no statistical differences between multiparous and nulliparous groups (5.33 ± 0.20 and 5.46 ± 0.18 , respectively; $p > 0.059$). Hence, evidence of ovulation was found in all the nulliparous ewes, and without significant differences with multiparous sheep in timing of such ovulation and in the number of corpora lutea.

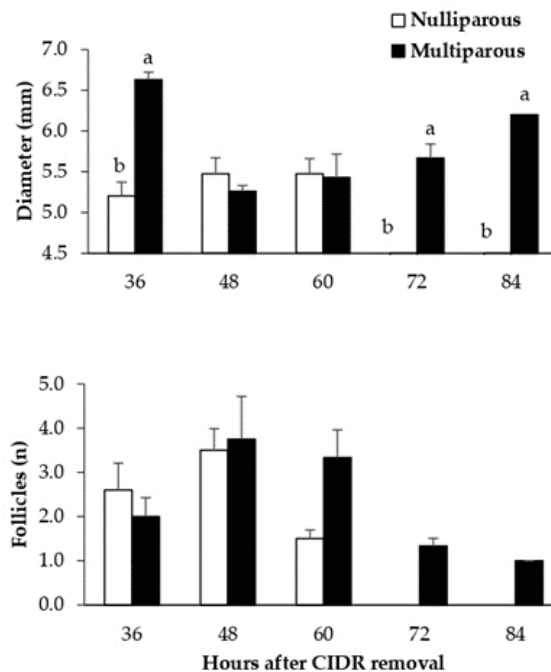


Figure 2. Mean (\pm) follicle number and diameter in ewes that showed estrous activity after CIDR removal. Different letters indicate statistical differences between groups ($a \neq b$; $p < 0.05$).

Our data show that 46.1 (5/13) of nulliparous ewes had a silent estrus, which was confirmed when assessing ovulation, because all the nulliparous ewes showed a corpus luteum (Table 2). Corpora luteum diameter was greater by 0.35 mm between multiparous vs. nulliparous ewes ($p < 0.05$). Finally, the assessment of pregnancies evidenced a significant drop in the fertility and number of embryos in the nulliparous sheep.

Table 2. Percentage and timing (\pm S.E.M.) of occurrence of ovulation, number of corpora lutea and fertility, and number of embryos in multiparous and nulliparous ewes after a short-term treatment with a controlled internal drug release (CIDR) and equine chorionic gonadotrophin (eCG) during seasonal anestrus.

Variables Evaluated	Multiparous	Nulliparous
Occurrence of ovulation (%)	81.8 (9/11)	100 (13/13)
Time of ovulation after CIDR removal (h)	70.9 ± 3.0	63.4 ± 1.6
Ovulation rate (number of corpora lutea)	1.7 ± 0.3	2.2 ± 0.2
Diameter CL (mm)	12.31 ± 0.5^a	11.96 ± 0.28^b

Fertility rate with regard to ewes treated (%)	72.7 (8/11) ^a	30.77 (4/13) ^b
Fertility rate with regard to ewes estrus (%)	72.7 (8/11)	57.1 (4/7)
Fertility rate with regard to ewes ovulating (%)	88.9 (8/9) ^a	30.77 (4/13) ^b
Numbers of embryos	1.6 ± 0.2	1.1 ± 0.1

Different letters indicate significant differences between groups (a ≠ b: $p < 0.05$).

4. Discussion

The results of our current study indicate significant differences in the response of nulliparous females to progesterone-based treatments for the synchronization of estrus and ovulation when compared to multiparous sheep. These results are opposite to data published by Ungerfeld and Rubianes [39], who reported a similar response in nulliparous and multiparous sheep with both short- and long-term progestagen treatments during seasonal anestrus.

In our study, performed during the anestrus season, multiparous ewes showed a good ovarian response to the treatment, with all of them displaying estrus after treatment removal, around 82% of them displaying corpora lutea indicative of a good ovulatory process, and with around 75% of them becoming pregnant (around 90% of the multiparous sheep ovulated in response to the treatment). These results are similar to available data in other studies with the same or other breeds [31,32,40,41] and support a good response of Dorper sheep to short-term, progesterone-based protocols when including eCG during the anestrus season [37]. Conversely, other studies have shown that the pregnancy rate may be improved by a longer progesterone imprinting by using long-term protocols (83.3% after 14 days of treatment vs. 60% after 9 days vs. 47.8% after 5 days) [23].

Conversely, a high percentage of the nulliparous sheep failed to develop estrous behavior after progesterone removal (around 45% of them), despite all the treated maiden ewes ovulating afterwards. Hence, the treatment that included progesterone and eCG was successful for inducing estrous behavior and ovulation in adult ewes during the anestrus season, but the response of maiden ewes was affected by occurrence of silent ovulations. Silent ovulations are usual in sheep, and even more in nulliparous sheep at the onset of estrous activity after seasonal anestrus [9,42,43], as it happened in our current study. This event has also been reported even after long-term treatments [44] and is hypothesized to be related to deficiencies in the terminal follicular growth [45]. In the present study, a significantly small size of the preovulatory follicles in maiden sheep at the start of the study supports such a hypothesis, which has been related to a lack of progesterone signaling during the transition of anestrus to ovulatory cyclic activity [46]. We observed that nulliparous ewes showed a smaller corpus luteum size at the time of ovarian assessment at day 10. It is well studied that an inadequate follicular development leads to the formation of a subnormal corpus luteum, which results in low levels of progesterone secretion [47].

Obviously, such silent estruses affected fertility rate and only 30% of the sheep in the group were found to be pregnant. Moreover, we must remark that (a) around half of the maiden sheep displaying estrus signs and being mated failed to become pregnant, and (b) that the relationship between the number of corpora lutea and the number of embryos was low by itself and clearly lower than in multiparous sheep. Such features may be also related to the lack of progesterone signaling, which characterizes the first cycles of maiden ewes. In this sense, the low fertility of young ewes after progesterone treatments is well known, even during the reproductive season [48]. This event has been related to a dramatic decrease in the developmental competence of the oocytes for developing a viable embryo in the maiden ewes when compared to mature sheep [49].

It is also well known that as sheep mature and the effect of the photoperiod decreases (from longer to shorter days), the frequency of GnRH and LH pulses increases, which increases the synthesis and secretion of estradiol by the ovaries [27], which is, in turn, necessary for the manifestation of estrus. Such a photoperiodic pattern affects spontaneous reproductive activity during the year by modifying the functionality of the hypothalamus–hypophysis–ovarian axis by a significant decrease in luteinizing hormone (LH) secretion which, in turn, impedes cyclic ovulatory activity [24,50] and female fertility by affecting the functionality of the hypothalamus–hypophysis–ovarian axis, cyclic ovulatory activity, the quality of preovulatory follicles/oocytes/embryos, and/or subsequent embryo/fetal viability [51]. Although nulliparous ewes were exposed to a pretreatment of progesterone plus eCG, the effects of the photoperiod decreased the reproductive response of the young females in our study.

5. Conclusions

Our results indicate a disturbed ovarian response and a low fertility of maiden sheep after a short-term progesterone treatment during the anestrus season. Such results preclude the use of these protocols for induction and synchronization of estrus and ovulation in nulliparous sheep during the non-breeding season under the conditions of our experiment.

Author Contributions: Conceptualization, Z.S.-J., P.M.-R., A.G.-B., and J.M.G.-M.; methodology, Z.S.-J., P.M.-R., A.G.-B., and J.M.G.-M.; formal analysis, P.M.-R., J.M.G.-M.; investigation, Z.S.-J., J.L.M.-C., H.Z.G.-G., R.G.-A., A.G.-B., and J.M.G.-M.; data curation, A.G.-B. and J.M.G.-M.; writing—original draft preparation, Z.S.-J., P.M.-R., A.G.-B., and J.M.G.-M.; writing—review and editing, Z.S.-J., P.M.-R., T.E., J.L.M.-C., H.Z.G.-G., R.G.-A., A.G.-B., and J.M.G.-M.; supervision, A.G.-B. and J.M.G.-M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki; besides, the specific international and national guidelines as well as institutional approval was declared in the Material and Methods Section 2.1. General. The experimental procedures were assessed and approved by the Ethic Committee of the University (UAAAN-UL (CCI) with Approval Code 38111-425501002-2760 and Approval Date: 22/03/21.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Data are contained within the article.

Acknowledgments: The authors thank the commercial farm (Ejido Granada, Matamoros, Coahuila de Zaragoza, Mexico) for the facilities for carrying out this research.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Montossi, F.; Font-i-Furnols, M.; Del Campo, M.; San Julián, R.; Brito, G.; Sañudo, C. Sustainable sheep production and consumer preference trends: Compatibilities, contradictions, and unresolved dilemmas. *Meat Sci.* **2013**, *95*, 772–789. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.04.048>.
2. Menchaca, A. Sustainable food production: The contribution of genome editing in livestock. *Sustainability* **2021**, *13*, 6788. <https://doi.org/10.3390/su13126788>.
3. Redden, R.; Thorne, J.W. Reproductive management of sheep and goats. In *Animal Agriculture; Sustainability, Challenges and Innovations*; Fuller, W., Bazer, G., Lamb, C., Wu, G., Eds.; Department of Animal Science, Texas A&M University: College Station, TX USA, 2020; pp. 211–230. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817052-6.00012-4>.
4. Rivero, M.J.; Lopez-Villalobos, N.; Evans, A.; Berndt, A.; Cartmill, A.; Neal, A.L.; McLaren, A.; Farruggia, A.; Mignolet, C.; Chadwick, D.; et al. Key traits for ruminant livestock across diverse production systems in the context of climate change: Perspectives from a global platform of research farms. *Reprod. Fertil. Dev.* **2021**, *33*, 1–19. <https://doi.org/10.1071/RD20205>.
5. FAO. Available online: <https://www.fao.org/dairy-production-products/production/dairy-animals/small-ruminants/en/> (accessed on 5 May 2022).

6. Amiridis, G.S.; Cseh, S. Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants. *Anim. Reprod. Sci.* **2012**, *130*, 152–161. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.01.009>.
7. Foster, D.L.; Karsch, F.J.; Olster, D.H.; Ryan, K.D.; Yellon, S.M. Determinants of puberty in a seasonal breeder. In *Proceedings of the 1985 Laurentian Hormone Conference*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 1986; pp. 331–384. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-571142-5.50012-4>.
8. Arroyo, J. Estacionalidad reproductiva de la oveja en México. *Trop. Subtrop. Agroecosystems* **2011**, *14*, 829–845. Available online: <https://www.scielo.org.mx/pdf/tsa/v14n3/v14n3a1> (accessed on 15 February 2022).
9. Rosa, H.J.; Bryant, M.J. Seasonality of reproduction in sheep. *Small Rumin. Res.* **2003**, *48*, 155–171. <https://doi.org/10.1016/S0921-448800038-5>.
10. Scaramuzzi, R.J.; Campbell, B.K.; Downing, J.A.; Kendall, N.R.; Khalid, M.; Muñoz-Gutiérrez, M.; Somchit, A. A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reprod. Nutr. Dev.* **2006**, *46*, 339–354. <https://doi.org/10.1051/rnd:2006016>.
11. Kareta, W.; Korman, K.; Cegla, M. Ovulation level and prolificacy in ewes depending on their age, birth type and percentage of prolific genotype. *Reprod. Biol.* **2006**, *6*, 73–78. Available online: <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.640.867&rep=rep1&type=> (accessed on 5 May 2022).
12. Martemucci, G.; D'Alessandro, A.G. Synchronization of oestrus and ovulation by short time combined FGA, PGF2 α , GnRH, eCG treatments for natural service or AI fixed-time. *Anim. Reprod. Sci.* **2011**, *123*, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.11.007>.
13. Abecia, J.A.; Forcada, F.; Gonzalez-Bulnes, A. Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Anim. Reprod. Sci.* **2012**, *130*, 173–179. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.01.011>.
14. Wildeus, S. Current concepts in synchronization of estrus: Sheep and goats. *J. Anim. Sci.* **2000**, *77*, 47–53. <https://doi.org/10.2527/jas2000.00218812007700E50040x>.
15. Menchaca, A.; Miller, V.; Salveraglio, V.; Rubianes, E. Endocrine, luteal and follicular responses after the use of the short-term protocol to synchronize ovulation in goats. *J. Anim. Sci.* **2007**, *102*, 76–87. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.10.001>.
16. Gallegos-Sánchez, J.; Malpoux, B.; Thiéry, J.C. Control of pulsatile LH secretion during seasonal anoestrus in the ewe. *Reprod. Nutr. Dev.* **1998**, *38*, 3–15. <https://doi.org/10.1051/rnd:19980101>.
17. Lozano, H.; Raes, M.; Vargas, J.J.; Ballieu, A.; Grajales, H.; Manrique, C.; Beckers, J.F.; Kirschvink, N. Onset of puberty and regularity of oestral cycles in ewe lambs of four breeds under high-altitude conditions in a non-seasonal country. *Trop. Anim. Health Prod.* **2020**, *52*, 3395–3402. <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02372-w>.
18. Santos-Jimenez, Z.; Guillen-Gargallo, S.; Encinas, T.; Berlinguer, F.; Veliz-Deras, F.G.; Martinez-Ros, P.; Gonzalez-Bulnes, A. Use of propylene-glycol as a cosolvent for GnRH in synchronization of estrus and ovulation in sheep. *Animals* **2020**, *10*, 897. <https://doi.org/10.3390/ani10050897>.
19. Martínez-Ros, P.; Astiz, S.; García-Rosello, E.; Rios-Abellan, A.; Gonzalez-Bulnes, A. Effects of short-term intravaginal progestagens on the onset and features of estrus, preovulatory LH surge and ovulation in sheep. *Anim. Reprod. Sci.* **2018**, *197*, 317–323. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.08.046>.
20. Martínez-Ros, P.; Gonzalez-Bulnes, A.; García-Rosello, E.; Rios-Abellan, A.; Astiz, S. Effects of short-term intravaginal progestagen treatment on fertility and prolificacy after natural breeding in sheep at different reproductive seasons. *J. Appl. Anim. Res.* **2019**, *47*, 201–205. <https://doi.org/10.1080/09712119.2019.1599899>.
21. Gonzalez-Bulnes, A.; Menchaca, A.; Martin, G.B.; Martinez-Ros, P. Seventy years progestagen treatments for management of the sheep oestrous cycle: Where we are and where we should go. *Reprod. Fertil. Dev.* **2020**, *32*, 441–452. <https://doi.org/10.1071/RD18477>.
22. Leboeuf, B.; Manfredi, E.; Boue, P.; Piacere, A.; Brice, G.; Baril, G.; Terqui, M. Artificial insemination of dairy goats in France. *Livest. Prod. Sci.* **1998**, *55*, 193–203. <https://doi.org/10.1016/S0301-622600140-7>.
23. Joseph, I.B.J.K.; Currie, W.D.; Rawlings, N.C. Effects of time after ovariectomy, season and oestradiol on luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion in ovariectomized ewes. *J. Reprod. Fertil.* **1992**, *94*, 511–523. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0940511>.
24. Smith, J.T.; Clarke, I.J. Seasonal breeding as a neuroendocrine model for puberty in sheep. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2010**, *324*, 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.03.007>.
25. Clarke, I.J. Gonadotrophin-releasing hormone secretion (GnRH) in anoestrous ewes and the induction of GnRH surges by oestrogen. *Endocrinology* **1988**, *117*, 355–360. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1170355>.
26. Fabre-Nys, C.; Kendrick, K.M.; Scaramuzzi, R.J. The “ram effect”: New insights into neural modulation of the gonadotropic axis by male odors and socio-sexual interactions. *Front. Neurosci.* **2015**, *9*, 111. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00111>.
27. Bedenbaugh, M.N.; Bowdridge, E.C.; Hileman, S.M. Role of neurokinin B in ovine puberty. *Domest. Anim. Endocrinol.* **2020**, *73*, 106442. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2020.106442>.
28. Robertson, H.A. Reproduction in the ewe and the goat. The estrous cycle. In H.H. Cole and P.T. Cupps. *Reprod. Domest. Anim.* 3rd edition. Academic Press: Cambridge, MA, USA, 1977; pp 410, 475–498.

29. Skinner, D.C.; Caraty, A.; Allingham, R. Unmasking the progesterone receptor in the preoptic area and hypothalamus of the ewe: No colocalization with gonadotropin-releasing neurons. *Endocrinology* **2001**, *142*, 573–579. <https://doi.org/10.1210/endo.142.2.7956>.
30. Robinson J.E. Gamma amino-butyric acid and the control of GnRH secretion in sheep. *J. Reprod. Fert.* **1995**, *49*, 221–230. Available online: <https://www.bioscioproceedings.org/bp/0003/bp0003rdr17.pdf> (accessed on 10 November 2022).
31. Viñoles, C.; Forsberg, M.; Rubianes, E. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in the ewe. In Proceedings of the 14th International Congress on Animal Reproduction, Stockholm, Sweden, 2–6 July 2000; Volume 1, p. 26.
32. Fleisch, A.; Piechotta, M.; Bollwein, H.; Janett, F. Fruchtbarkeit nach 6- und 12-tägiger Behandlung mit Eazi-breed™ CIDR® G ausserhalb der Zuchtsaison beim Lacaune Milchschaft. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* **2013**, *155*, 391–398. <https://doi.org/10.5167/uzh-87671>.
33. NAM-National Academy of Medicine. Co-Produced by the National Academy of Medicine–Mexico and the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International. In *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, 1st ed.; Harlan: Mexico City, Mexico, 2010.
34. FASS. Guide for the Care and Use of Agricultural Animals. In *Agricultural Research and Teaching*, 3rd ed.; Federation Animal Science Society: Champaign, IL, USA, 2010; p. 177.
35. Russel, A.J.F.; Doney, J.M.; Gunn, R.G. Subjective assessment of body fat in live sheep. *J. Agric. Sci.* **1969**, *72*, 451–454. <https://doi.org/10.1017/S0021859600024874>.
36. Gonzalez-Bulnes, A.; Pallares, P.; Vazquez, M.I. Ultrasonographic imaging in small ruminant reproduction. *Reprod. Domest. Anim.* **2010**, *45*, 9–20. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01640.x>.
37. Santos-Jimenez, Z.; Meza-Herrera, C.A.; Calderon-Leyva, G.; Martinez-Ros, P.; Guillen-Muñoz, J.M.; Gonzalez-Bulnes, A. Efficiency of hCG for Inducing Resumption of Ovarian Cyclicity and Synchronized Ovulations during the Seasonal Anestrous in Sheep. *Animals* **2021**, *11*, 3159. <https://doi.org/10.3390/ani11113159>.
38. Veiga-Lopez, A.; Encinas, T.; McNeilly, A.S.; Gonzalez-Bulnes, A. Timing of preovulatory LH surge and ovulation in superovulated sheep are affected by follicular status at start of the FSH treatment. *Reprod. Domest. Anim.* **2008**, *43*, 92–98. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00860.x>.
39. Ungerfeld, R.; Rubianes, E. Effectiveness of short-term progestogen primings for the induction of fertile oestrus with eCG in ewes during late seasonal anoestrus. *Anim. Sci. J.* **1999**, *68*, 349–353. <https://doi.org/10.1017/S1357729800050347>.
40. Swelum, A.A.A.; Saadeldin, I.M.; Mouden, A.F.; Ali, M.A.; Alowaimer, A.N. Efficacy of controlled internal drug release (CIDR) treatment durations on the reproductive performance, hormone profiles, and economic profit of Awassi ewes. *Small Rumin. Res.* **2018**, *166*, 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2018.07.018>.
41. Barrett, D.M.W.; Bartlewski, P.M.; Batista-Arteaga, M.; Symington, A.; Rawlings, N.C. Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to a single dose of 500 IU of eCG following a 12-day treatment with progestogen-releasing intravaginal sponges in the breeding and nonbreeding seasons in ewes. *Theriogenology* **2004**, *61*, 311–327. <https://doi.org/10.1016/S0093-691X00215-2>.
42. Chemineau, P.; Pellicer-Rubio, M.T.; Lassoued, N.; Khaldi, G.; Monniaux, D. Male-induced short oestrous and ovarian cycles in sheep and goats: A working hypothesis. *Reprod. Nutr. Dev.* **2006**, *46*, 417–429. <https://doi.org/10.1051/rnd:2006022>.
43. Iglesias, R.R.; Ciccioli, N.H.; Ferrería, J.; Pevsner, D.A.; Rosas, C.A.; Rodríguez, M.M.; Pedrueza, J.R. Short-lived corpora lutea syndrome in anoestrous ewes following 17 β -oestradiol or MAP treatments applied before an allogenic sexual stimulation with rams and oestrous ewes. *Anim. Reprod. Sci.* **2013**, *136*, 268–279. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.11.009>.
44. Bartlewski, P.M.; Beard, A.P.; Cook, S.J.; Rawlings, N.C. Ovarian follicular dynamics during anoestrus in ewes. *Reproduction* **1998**, *113*, 275–285. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1130275>.
45. Baird, D.T. Factors regulating the growth of the preovulatory follicle in sheep and human. *J. Reprod. Infertil.* **1983**, *69*, 343–352. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0690343>.
46. Bartlewski, P.M.; Beard, A.P.; Cook, S.J.; Chandolia, R.K.; Honaramooz, A.; Rawlings, N.C. Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. *Reproduction* **1999**, *115*, 111–124. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1150111>.
47. Gonzalez-Bulnes, A.; Veiga-Lopez, A.; Garcia, P.; Garcia-García, R.M.; Ariznavarreta, C.; Sanchez, M.A.; Tresguerres, J.A.F.; Cocero, M.J.; Flores, J.M. Effects of progestagens and prostaglandin analogues on ovarian function and embryo viability in sheep. *Theriogenology* **2005**, *63*, 2523–2534. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.10.013>.
48. Mulvaney, F.J.; Morris, S.T.; Kenyon, P.R.; Morel, P.C.H.; West, D.M.; Vinales, C.; Glover, K.M.M. Comparison between the reproductive performance of ewe hoggets and mature ewes following a progesterone-based oestrus synchronization protocol. *New Zealand J. Agric. Res.* **2013**, *56*, 288–296. <https://doi.org/10.1080/00288233.2013.842176>.
49. Martínez, M.F.; McLeod, B.; Tattersfield, G.; Smail, B.; Quirke, L.D.; Juengel, J.L. Successful induction of oestrus, ovulation and pregnancy in adult ewes and ewe lambs out of the breeding season using a GnRH+ progesterone oestrus synchronization protocol. *Anim. Reprod. Sci.* **2015**, *155*, 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.01.010>.
50. Malpau, B.; Viguié, C.; Skinner, D.C.; Thiéry, J.C.; Chemineau, P. Control of the circannual rhythm of reproduction by melatonin in the ewe. *Brain Res. Bull.* **1997**, *44*, 431–438. <https://doi.org/10.1016/S0361-923000223-2>.
51. Squires, E.J. *Applied Animal Endocrinology*; Cabi Publishing: Wallingford, UK, 2010.

Experimento 2. Respuesta reproductiva a la administración de análogos de GnRH en agua destilada en protocolos de inducción de celo y ovulación con progesterona durante el anestro estacional.

Este estudio se llevó a cabo en dos épocas del año; en anestro estacional (abril; n=63 ovejas multíparas con una paridad de 2 a 4 partos) y en estación reproductiva (diciembre; n=55 ovejas), con hembras de raza Segureña, de 2 a 5 años y una condición corporal media de $3,5 \pm 0,5$, bajo condiciones de fotoperiodo natural en la granja experimental de la Universidad CEU Cardenal Herrera. Todas las ovejas fueron tratadas con CIDR® durante cinco días y con una dosis intramuscular de 5 mg de prostaglandina de un análogo de $F_{2\alpha}$ (Dinoprost, Dinolytic®, Zoetis, Madrid, España) en el momento de retirar el CIDR®. Un primer grupo (grupo CIDR®-eCG), formado por n=18 hembras tratadas en diciembre y n=15 tratadas en abril, recibió por vía intramuscular una dosis de 400 UI de eCG (Foligon®, MSD Animal Health, Madrid, España) junto con el PGF $_{2\alpha}$, en el momento de la retirada del CIDR®. Un segundo grupo (grupo CIDR®-GnRH), formado por n=18 ovejas tratadas en diciembre y n=25 en abril, fue tratado adicionalmente con una dosis única intramuscular de 50 µg de un análogo de GnRH en agua destilada (Gonadorelina, Acegon®, Lab. Syva, León, España) a las 56 h de retirar el CIDR®. El tercer grupo (grupo GnRH-CIDR®-GnRH), constituido por n=19 hembras tratadas en diciembre y n=23 tratadas en abril, recibió dos dosis de 50 µg de GnRH por vía intramuscular en agua destilada: la primera en el momento de la inserción del CIDR® y la segunda, a las 56 h de retirar el CIDR®, tal como se muestra en la (Figura 21).

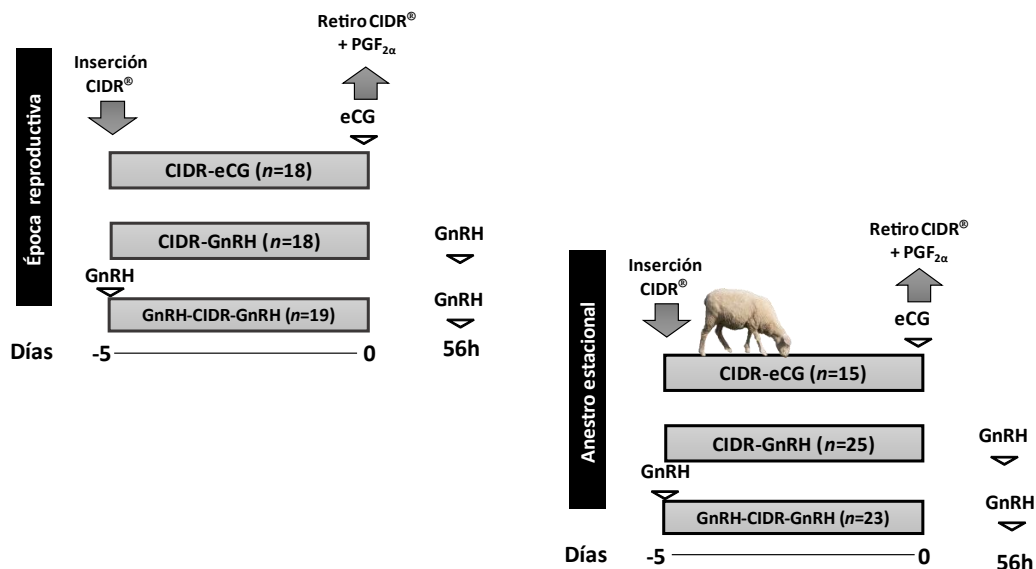


Figura 21. Diseño del experimento 2. Todas las hembras recibieron el mismo tratamiento con CIDR® (5 días) y progestano intramuscular a la retirada del dispositivo, en dos estaciones diferentes del año (anestro estacional y estación reproductiva). En el grupo control se administró adicionalmente eCG (a la retirada del dispositivo). En los grupos problema se administró adicionalmente, por vía intramuscular, GnRH en dosis única (56 h después de la retirada del dispositivo de progesterona), grupo CIDR-GnRH, o en dos dosis (en el momento de la inserción o a las 56 h de la retirada del dispositivo), grupo GnRH-CIDR-GnRH.

Las variables evaluadas fueron: porcentaje de aparición y momento de aparición de los signos de celo (tras retirar el CIDR®); porcentaje de aparición y momento de aparición de la ovulación; en el día 11 del ciclo sexual inducido: tasa de ovulación (mediante ultrasonografía transrectal), concentraciones séricas de progesterona (mediante ensayo inmunoenzimático, ELISA), fertilidad y prolificidad.

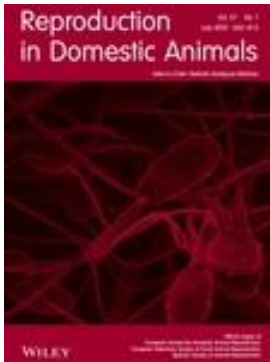
La aparición del comportamiento de estro durante la temporada reproductiva en todas las hembras del experimento osciló entre el 84% y el 95% de los animales y todas las hembras que mostraron signos de celo tuvieron ovulaciones posteriores, independientemente del grupo de tratamiento (control, CIDR-GnRH, GnRH-CIDR-GnRH). La respuesta durante el anestro estacional fue similar en el grupo tratado sólo con eCG, pero menos de la mitad de las hembras en los grupos tratados con GnRH (tanto con dosis única CIDR-GnRH; como con doble dosificación GnRH-

CIDR-GnRH) mostraron signos de estro en respuesta al tratamiento; sin embargo, más del 80% de ellas mostraron aparición de ovulaciones en respuesta al tratamiento. Los resultados indicaron que el uso de tratamientos a base de GnRH durante el anestro estacional puede verse comprometido en caso de monta natural ya que las ovejas presentan ovulaciones silenciosas, sin la manifestación estral.

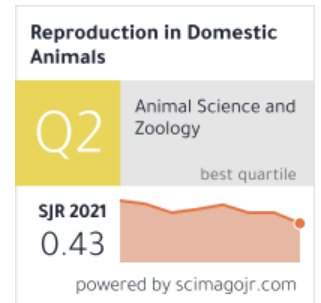
Los resultados de esta investigación se encuentran publicados en la revista *Reproduction in Domestic Animals* 55(7), 882-884. DOI: 10.1111/rda.13698

Información de la Revista

Tomado de Scimago Journal & Country Rank

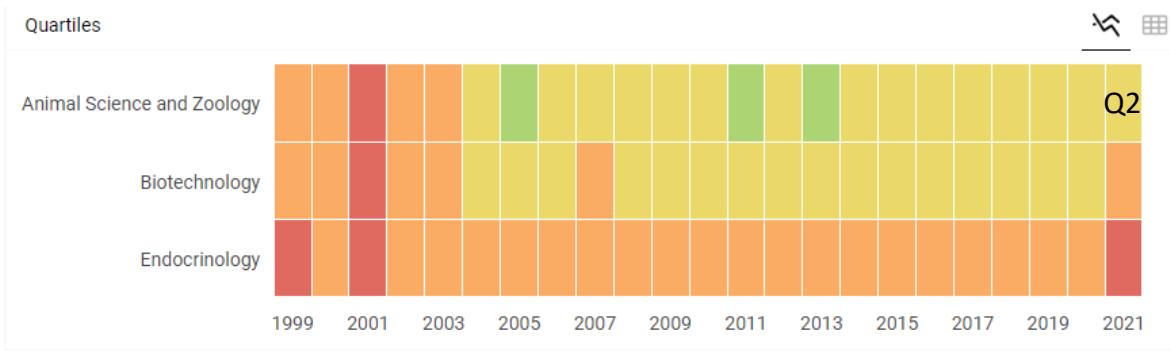
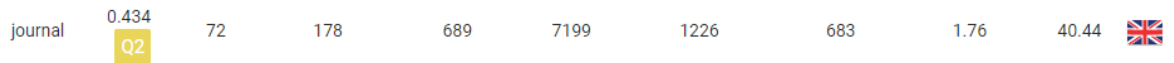


Impact factor (2021):1.858



Reproduction in Domestic Animals, ofrece información completa sobre fisiología, patología y biotecnología de la reproducción. Los resultados temáticos se publican actualmente en artículos originales, revisiones y comunicaciones breves, con especial atención a las investigaciones sobre técnicas practicables.

93 [Reproduction in Domestic Animals](#)





Comparative efficiency of oestrus synchronization in sheep with progesterone/eCG and progesterone/GnRH during breeding and non-breeding season

Zurisaday Santos-Jimenez^{1,2} | Claudia Martinez-Herrero³ | Teresa Encinas² | Paula Martinez-Ros³ | Antonio Gonzalez-Bulnes^{2,4} 

¹Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Torreón, Mexico

²Department of de Toxicología y Farmacología, Facultad de Veterinaria, UCM, Madrid, Spain

³Department of Produccion y Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Cardenal Herrera-CEU, CEU Universities, Valencia, Spain

⁴Department of de Reproduccion Animal, INIA, Madrid, Spain

Correspondence

Paula Martinez-Ros, Departamento de Produccion y Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Cardenal Herrera-CEU, Valencia, Spain.
Email: paula.martinez@uchceu.es

Abstract

The present study compared the occurrence of oestrus behaviour and ovulation in response to the insertion of CIDR devices plus a classical treatment with equine chorionic gonadotrophin (eCG; single dose at CIDR removal) or alternative treatments with gonadotrophin-releasing hormone (GnRH, either in a single dose at 56 hr after CIDR removal, or in one dose at CIDR insertion and another dose at 56 hr after CIDR removal). The appearance of oestrus behaviour during reproductive season ranged between 84% and 95% and all females showing oestrus signs had subsequent ovulations. The response, during seasonal anoestrus, was similar in the group treated with eCG, but less than half of the females in the groups treated with GnRH showed oestrus signs in response to the treatment, although more than 80% of them showed resumption of ovulatory activity after the treatment. In conclusion, protocols based on GnRH administration offer similar yields to eCG-based protocols during the reproductive season but occurrence of oestrus in response to GnRH-based treatments is highly compromised during seasonal anoestrus.

KEYWORDS

GnRH, IDR, oestrus-synchronization, ovulation, sheep

1 | INTRODUCTION

The induction and synchronization of oestrus and ovulation in sheep are commonly based on the administration of progesterone or its analogues plus a single dose of equine chorionic gonadotrophin (eCG) (Abecia, Forcada, & Gonzalez-Bulnes, 2012). However, eCG is obtained from pregnant mares and current ethical concerns on animal welfare have caused the future banning of the hormone (Gonzalez-Bulnes, Menchaca, Martin, & Martinez-Ros, 2020). Hence, there is a need for alternative protocols.

A previous study (Martinez-Ros & Gonzalez-Bulnes, 2019) has found a similar efficiency among protocols using eCG and protocols in which secretion of LH and ovulation was stimulated by injecting GnRH. Such data, however, were obtained during reproductive season, when GnRH or eCG is not strictly indispensable for induction of ovulation (Martinez-Ros, Rios-Abellan, & Gonzalez-Bulnes, 2019). Our hypothesis was that efficiency of the protocol including GnRH may be affected during non-breeding season. Hence, the present study aimed to determine the response to treatments including either eCG or GnRH during the anoestrous season, when eCG becomes essential while gonadotrophin secretion and ovulation are depressed.

Santos-Jimenez and Martinez-Herrero are contributed equally to this work.

2 | MATERIALS AND METHODS

The experiment, approved by the Universidad CEU-Cardenal Herrera Committee of Ethics in Animal Research (report CEEA17/019), included two trials which were carried out during breeding (December; 9 hr light/ 15 hr darkness) and non-breeding season (April; 13 hr light/11 hr darkness) and involved meat sheep (Segureña breed; 2–6 years old) maintained outdoors and exposed to natural photoperiod at the experimental farm of the University (Naquera, Valencia, Spain).

All sheep received one intravaginal CIDR (Controlled Internal Drug Release) device, specifically designed for sheep and loaded with 0.35 g of progesterone (CIDR® Ovis, Zoetis, Madrid, Spain). After five days, CIDRs were removed and each sheep received one i.m. injection of 5 mg of prostaglandin $F_{2\alpha}$ (Dinolytic®, Zoetis, Madrid, Spain). A first group (group CIDR-eCG, $n = 18$ at December and $n = 15$ at April) was treated with a single i.m. dose of 400 IU of eCG at CIDR removal (Foligon®, MSD Animal Health, Madrid, Spain). A second group (group CIDR-GnRH, $n = 18$ at December and $n = 25$ at April) was treated with a single dose of 50 µg of GnRH at 56 hr after CIDR removal (Acegon®, Lab. Syva, Leon, Spain). The third group (group GnRH-CIDR-GnRH, $n = 19$ at December and $n = 23$ at April) received two doses of 50 µg of GnRH, the first one at CIDR insertion and another one at 56 hr after CIDR removal.

In all sheep, occurrence of oestrus behaviour was evaluated, every 12 hr from 24 to 96h after CIDR withdrawal, by individually assessing the occurrence of mating with rams. Occurrence of ovulations and number of corpora lutea were determined, on Day 11 of the induced oestrous cycle, by transrectal ultrasonography (Aloka SSD 500 fitted to a 7.5 MHz linear-array probe, Aloka Co. Ltd., Tokyo, Japan). Concomitantly, blood samples were drawn for determining plasma progesterone concentrations with a direct solid-phase RIA kit (PROG-CTRIA, IBA Molecular, Madrid, Spain; sensitivity of 0.05 ng/ml and intra-assay variation coefficient of 3.5%).

The effects of treatment and reproductive season were compared by chi-square test and analyses of variance (ANOVA), by using SPSS® 22.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). All results are expressed as mean ± SEM, and statistical significance was accepted at $p < .05$.

3 | RESULTS

The sheep treated with CIDR-eCG showed similar occurrence of oestrus behaviour and ovulation between reproductive and non-reproductive seasons (Table 1). The oestrus response was similar during the reproductive season in the sheep treated with GnRH (groups CIDR-GnRH and GnRH-CIDR-GnRH). However, during seasonal anoestrus, very few females showed oestrus behaviour in such groups (48.0% and 34.8%, respectively). Surprisingly, most of the females in the second and third groups evidenced ovulations (96.0% and 82.6%, respectively). In fact, there were no differences among treatments and between reproductive seasons in the mean number of corpora lutea or in the mean plasma progesterone concentrations of females responding to oestrus synchronization (Table 2).

4 | DISCUSSION

The results of the present study support that, in breeding season, the administration of GnRH induces oestrus behaviour and ovulation with a similar efficiency to classical eCG-treatments.

In non-breeding season, oestrus response of sheep treated with eCG was similar to breeding season as previously documented (Martinez-Ros, Astiz, Garcia-Rosello, Rios-Abellan, & Gonzalez-Bulnes, 2018). Conversely, the percentage of ewes displaying oestrus signs in response to either in one or two doses (groups CIDR-GnRH and GnRH-CIDR-GnRH) was too low to recommend for its practical application.

However, as reported in Table 1, a high percentage of sheep in GnRH-treated groups showed ovulation without oestrus signs, resembling silent ovulations early described in the period of transition from anoestrus to reproductive season (Thimonier & Mauleon, 1969); which is not useful for natural mating because males are unable to mark responding females.

A possible explanation for absence of oestrus signs would be related to the fact that the injection of GnRH induces a sharp discharge of LH which in turns induces ovulation (Eppleston, Evans, & Roberts, 1991). However, in anoestrus ewes, there is a lack of the LH

	CIDR-eCG	CIDR-GnRH	GnRH-CIDR-GnRH
Occurrence of oestrus behaviour (%)			
Reproductive season	94.5 (17/18)	88.9 (16/18) ¹	84.2 (16/19) ¹
Non-reproductive season	93.3 (14/15) ^a	48.0 (12/25) ^{b,2}	34.8 (8/23) ^{b,2}
Occurrence of ovulation (%)			
Reproductive season	94.5 (17/18)	88.9 (16/18)	84.2 (16/19)
Non-reproductive season	93.3(14/15) ^a	96.0(24/25) ^a	82.6(19/23) ^b

Note: Significant differences are denoted by different superscript letters among treatments (a ≠ b: $p < .05$) and by different superscript numbers between reproductive seasons (1 ≠ 2: $p < .01$).

TABLE 1 Occurrence of oestrus behaviour and ovulation in ewes treated with a single i.m. dose of 400 IU of eCG at CIDR removal (group CIDR-eCG), with a single dose of GnRH at 56 hr after CIDR removal (group CIDR-GnRH) and with two GnRH doses, one at CIDR insertion and one 56 hr after CIDR removal (group GnRH-CIDR-GnRH)

TABLE 2 Mean (\pm SEM) ovulation rate and plasma progesterone concentrations in ewes treated with a single i.m. dose of 400 IU of eCG at CIDR removal (group CIDR-eCG), with a single dose of GnRH at 56 hr after CIDR removal (group CIDR-GnRH) and with two GnRH doses, one at CIDR insertion and one 56 hr after CIDR removal (group GnRH-CIDR-GnRH)

	CIDR-eCG	CIDR-GnRH	GnRH-CIDR-GnRH
Number of corpora lutea			
Reproductive season	1.8 \pm 0.1 (n = 18)	1.2 \pm 0.1 (n = 18)	1.2 \pm 0.1 (n = 19)
Non-reproductive season	1.5 \pm 0.1 (n = 15)	1.3 \pm 0.1 (n = 25)	1.2 \pm 0.1 (n = 23)
Plasma progesterone concentration (ng/ml)			
Reproductive season	5.4 \pm 0.4 (n = 18)	4.8 \pm 0.3 (n = 18)	5.3 \pm 0.5 (n = 19)
Non-reproductive season	5.6 \pm 0.3 (n = 15)	4.9 \pm 0.2 (n = 18)	4.0 \pm 0.3 (n = 23)

pulsatility which is necessary for final follicle maturation and onset of oestrus behaviour (Baird, 1983).

A possible strategy for inducing LH pulsatility during non-breeding season may be based on the concomitant use of the "ram-effect", since introduction of males to anoestrous ewes is known to increase the pulsatile secretion of LH (Martin, Oldham, Cognie, & Pearce, 1986).

In conclusion, the results of the present study, pending larger studies on the effects on fertility yields, indicate that protocols based on GnRH administration offer similar yields to eCG-based protocols during the reproductive season but occurrence of oestrus in response to GnRH-based treatments is highly compromised during seasonal anoestrus.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the CEU-Cardenal Herrera farm staff for their assistance with animal care and handling.

CONFLICT OF INTEREST

None of the authors have any conflict of interest to declare.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

ZSJ and CMH involved in design of the study, experimentation and writing the article. TE involved in laboratory assays, statistical analysis and final revision of the article. PMR and AGB involved in design of the study and writing the article.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Antonio Gonzalez-Bulnes  <https://orcid.org/0000-0002-0917-4475>

REFERENCES

- Abecia, J. A., Forcada, F., & Gonzalez-Bulnes, A. (2012). Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Animal Reproduction Science*, 130, 173–179. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.01.011>
- Baird, D. T. (1983). Factors regulating the growth of the preovulatory follicle in sheep and human. *Journal of Reproduction and Fertility*, 69, 343–352.
- Eppleston, J., Evans, G., & Roberts, E. M. (1991). Effect of time of PMSG and GnRH on the time of ovulation, LH secretion and reproductive performance after intrauterine insemination with frozen ram semen. *Animal Reproduction Science*, 26, 227–237. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(91\)90049-6](https://doi.org/10.1016/0378-4320(91)90049-6)
- Gonzalez-Bulnes, A., Menchaca, A., Martin, G. B., & Martinez-Ros, P. (2020). Seventy years of progestagen treatments for management of the sheep oestrous cycle: Where we are and where we should go. *Reproduction, Fertility and Development*, 32, 441–452. <https://doi.org/10.1071/RD18477>
- Martin, G. B., Oldham, C. M., Cognie, Y., & Pearce, D. T. (1986). The physiological responses of anovulatory ewes to the introduction of rams: A review. *Livestock Production Science*, 15, 219–247. [https://doi.org/10.1016/0301-6226\(86\)90031-X](https://doi.org/10.1016/0301-6226(86)90031-X)
- Martinez-Ros, P., Astiz, S., Garcia-Rosello, E., Rios-Abellan, A., & Gonzalez-Bulnes, A. (2018). Effects of short-term intravaginal progestagens on the onset and features of estrus, preovulatory LH surge and ovulation in sheep. *Animal Reproduction Science*, 197, 317–323.
- Martinez-Ros, P., & Gonzalez-Bulnes, A. (2019). Efficiency of CIDR-based protocols including GnRH instead of eCG for estrus synchronization in sheep. *Animals*, 9, 146. <https://doi.org/10.3390/ani9040146>
- Martinez-Ros, P., Rios-Abellan, A., & Gonzalez-Bulnes, A. (2019). Influence of progesterone-treatment length and eCG administration on appearance of estrous behavior, ovulatory success and fertility in sheep. *Animals*, 9, 9.
- Thimonier, J., & Mauleon, P. (1969). Variations saisonnieres du comportement d' oestrus et des activites ovarienne et hypophysaire chez les ovins. *Annales De Biologie Animale, Biochimie, Biophysique*, 9, 233–250.

How to cite this article: Santos-Jimenez Z, Martinez-Herrero C, Encinas T, Martinez-Ros P, Gonzalez-Bulnes A. Comparative efficiency of oestrus synchronization in sheep with progesterone/eCG and progesterone/GnRH during breeding and non-breeding season. *Reprod Dom Anim*. 2020;00:1–3. <https://doi.org/10.1111/rda.13698>

Experimento 3. Respuesta reproductiva a la administración de un análogo de GnRH, utilizando propilenglicol como vehículo de liberación lenta, en protocolos de sincronización de celo y ovulación con prostaglandina o progesterona durante la estación de actividad reproductiva.

El estudio incluyó dos ensayos consecutivos que se llevaron a cabo durante la estación reproductiva (finales de octubre y principios de noviembre), con 55 ovejas Segureñas multíparas con una paridad de 2 a 4 partos, (2 a 5 años, condición corporal media de $3,5 \pm 0,5$) en el rebaño experimental de la Universidad CEU Cardenal Herrera.

El primer ensayo tuvo como objetivo determinar el efecto de la administración de GnRH en propilenglicol, en comparación con la administración de GnRH en agua destilada ya utilizada previamente, sobre la respuesta ovárica a los protocolos basados en prostaglandinas para la sincronización del celo. La actividad cíclica ovárica y la ovulación fueron sincronizadas, en un total de 18 ovejas, con dos dosis intramusculares de prostaglandina $F_{2\alpha}$ (5 mg de Dinolytic®; Zoetis, Madrid, España), separadas 7 días. A las 32 h después de la segunda dosis de prostaglandina, un tercio de los animales recibió una inyección subcutánea de 5 mL de agua destilada y permanecieron como controles (grupo CON, n=6), mientras que al resto de ovejas se les inyectó una dosis de 50 μ g de GnRH (Acegon®, Lab. Syva, León, España), bien en agua destilada por vía intramuscular (grupo WAT, n=6) o en propilenglicol por vía subcutánea (grupo PPG, n=6). La solución de GnRH en el grupo PPG se preparó mezclando 1 mL de Acegon® (equivalente a 50 μ g de GnRH) con 4 mL de propilenglicol (Figura 22).

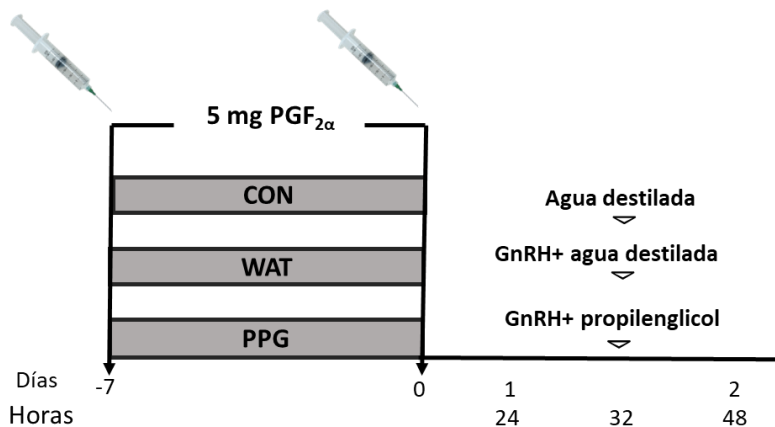


Figura 22. Diseño del primer ensayo donde se sincronizó la actividad estral de ovejas con dos dosis de 5 mg de $\text{PGF}_{2\alpha}$ para después a las 32 h administrar agua destilada (grupo CON); GnRH diluido en agua destilada (grupo WAT) o; GnRH diluido en propilenglicol (grupo PPG).

El segundo ensayo de este experimento, diseñado a partir de los resultados obtenidos en el primer ensayo, tuvo como objetivo determinar el efecto y el momento adecuado de la administración de GnRH en agua destilada o propilenglicol sobre la respuesta ovárica a los protocolos de sincronización de celos y ovulaciones basados en progesterona. Para ello se utilizaron 37 ovejas, que se trataron con un CIDR[®] intravaginal (CIDR[®] Ovis, Zoetis, Madrid, España) durante 5 días y una dosis de 5 mg de $\text{PGF}_{2\alpha}$ en el momento de la retirada del CIDR[®]. Se establecieron cuatro grupos experimentales, como se muestra en la Figura 23, siendo tratados con 400 UI de eCG por vía intramuscular (grupo eCG, n=8) o con 50 μg de GnRH, como se describió previamente, ya sea en agua destilada por vía intramuscular a las 56 h después de la retirada del CIDR[®] (grupo GnRH56, n=8) o en propilenglicol por vía subcutánea a las 24 o 36 h después de la extracción del CIDR[®] (grupos PPG24, n=11; y PPG36, n=10).

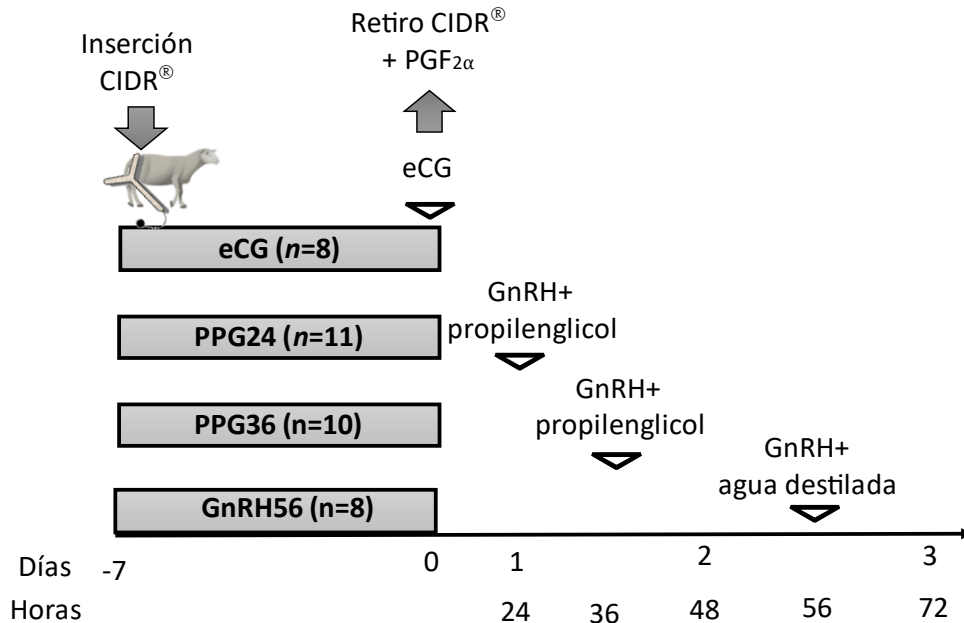


Figura 23. Diseño del segundo ensayo experimental. Todas las hembras fueron sincronizadas con un CIDR® por 7 días, para después dividirse en tres grupos experimentales: Grupo eCG (que recibió 400 UI de eCG al momento de la retirada del dispositivo); y grupos PPG24 y PPG36 (que recibió 50 µg de GnRH en propilenglicol 24 y 36 h; y grupo GnRH56 (que recibió 50 µg de GnRH después de la retirada del dispositivo).

Las variables evaluadas fueron: porcentaje de aparición y momento de aparición de los signos de celo (tras retirar el CIDR®); porcentaje de aparición y momento de aparición de la ovulación; tasa de ovulación en el día 11 del ciclo sexual inducido, (mediante ultrasonografía transrectal: Aloka SSD 500 ajustado a una sonda de matriz lineal de 7,5 MHz, Aloka Co. Ltd., Tokio, Japón), además se extrajeron muestras de sangre para determinar las concentraciones de progesterona por medio de la técnica ELISA.

En los resultados de esta investigación observamos que el 80% de los animales desarrollaron actividad estral con una alta sincronización (75% entre 36 y 48 h después de retirar el CIDR) y de la ovulación (87,5% entre 72 y 84 h después de la retirada de CIDR, con 62,5% entre 72 y 76 h), y mostraron similares tasas de ovulación y concentraciones de progesterona plasmática en respuesta al

tratamiento en todos los grupos. Estos resultados nos muestran que el uso de GnRH en un vehículo de liberación lenta puede resultar igual de eficaz que los resultados obtenidos con el tratamiento tradicional (con eCG) e inclusive puede ser una alternativa para la IATF.

Los resultados de esta investigación se encuentran publicados en la revista *Animals* 10(5), 897. DOI:10.3390/ani10050897

Información de la Revista

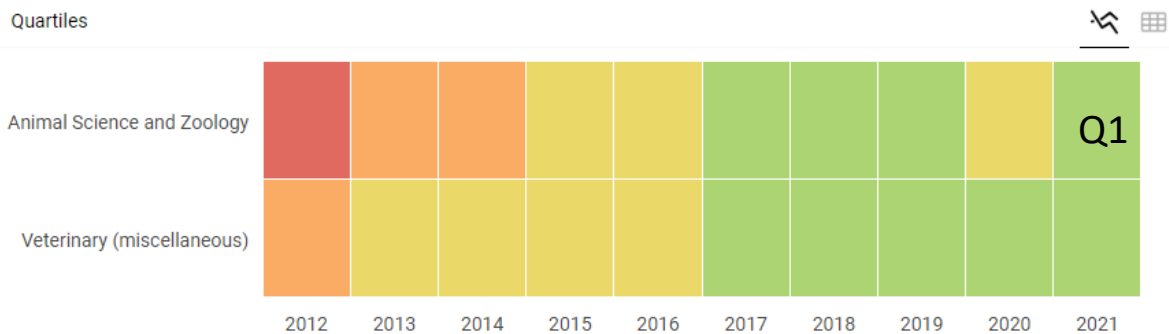
Tomado de Scimago Journal & Country Rank

Impact Factor: 3.231 (2021)



Animals es una revista internacional de acceso abierto, revisada por pares, dedicada enteramente a los animales, incluidas la zoología y las ciencias veterinarias, publicada quincenalmente en línea por MDPI. La Asociación Mundial de Zoológicos y Acuarios (WAZA) y el Colegio Europeo de Bienestar Animal y Medicina del Comportamiento (ECAWBM) están afiliados a *Animals*.

Title	Type	↓ SJR	H index	Total Docs. (2021)	Total Docs. (3years)	Total Refs. (2021)	Total Cites (3years)	Citable Docs. (3years)	Cites / Doc. (2years)	Ref. / Doc. (2021)
Animals	journal	0.610 Q1	43	3587	3824	216970	12145	3787	3.14	60.49



Article

Use of Propylene-Glycol as a Cosolvent for GnRH in Synchronization of Estrus and Ovulation in Sheep

Zurisaday Santos-Jimenez ^{1,2}, Sara Guillen-Gargallo ³, Teresa Encinas ¹, Fiammetta Berlinguer ⁴, Francisco G. Veliz-Deras ², Paula Martinez-Ros ^{3,*} and Antonio Gonzalez-Bulnes ^{1,5}

¹ Departamento de Farmacología y Toxicología Facultad de Veterinaria, UCM, Ciudad Universitaria s/n. 28040 Madrid, Spain; mvz_zusan@hotmail.com (Z.S.-J.); tencinas@ucm.es (T.E.C.)

² Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Torreón, 25315 Coahuila, Mexico. mvz_zusan@hotmail.com (Z.S.-J.); velizderas@gmail.com (F.G.V.-D.)

³ Departamento de Producción y Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Cardenal Herrera-CEU, CEU Universities, C/ Tirant lo Blanc, 7, 46115 Alfara del Patriarca Valencia, Spain; guigarsar@alumnos.uchceu.es (S.G.-G.)

⁴ Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Sassari, Via Vienna 2, 07100 Sassari, Italy; berling@uniss.it (F.B.).

⁵ Departamento de Reproducción Animal, INIA, Avda. Puerta de Hierro s/n., 28040 Madrid, Spain; bulnes@inia.es (A.G.-B.).

* Correspondence: paula.martinez@uchceu.es; Tel.: +34961369000

Received: 29 April 2020; Accepted: 19 May 2020; Published: 21 May 2020

Simple Summary: The foreseeable shortage of equine chorionic gonadotrophin (eCG) for estrus synchronization in sheep will have a huge impact on breeders using out-of-season breeding, artificial insemination, or embryo transfer because there is no other product with similar activity. Hence, there is a strong need for alternative protocols. The aim of the present work was to evaluate the reproductive response of sheep in breeding season to the administration of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) using propylene-glycol as a cosolvent, as well as the most adequate timing for such administration. From the results obtained, protocols based on a short-term treatment with a Controlled Internal Drug Release (CIDR) device and a single dose of GnRH in propylene-glycol at 36 h after CIDR removal may constitute an alternative to traditional protocols based on the administration of a single dose of eCG at CIDR removal.

Abstract: The foreseen shortage of eCG for estrus synchronization in sheep makes necessary the development of alternative protocols. The aim of the present work was to evaluate the reproductive response of sheep in breeding season to the administration of GnRH using propylene-glycol as a cosolvent and the subcutaneous route for slowing and extending the release of GnRH, as well as the most adequate timing for such administration. In the present study, protocols based on a short-term CIDR treatment and a single subcutaneous dose of GnRH in propylene-glycol at 36 h after CIDR removal induced a similar ovarian response to protocols based on administration of eCG at CIDR removal or intramuscular GnRH in distilled water at 56 h after. In such protocol, 80% of the animals developed estrus in a narrow timing (75% between 36 and 48 h after CIDR removal), and all of them also ovulated in a narrow window (87.5% between 72 and 76 h after CIDR removal, with 62.5% between 72 and 76 h) and showed a similar ovulation rate and plasma progesterone concentrations at the induced estrous cycle. Hence, administration of GnRH in propylene-glycol may constitute an alternative to traditional protocols based on the administration of eCG.

Keywords: eCG; estrus synchronization; GnRH; propylene-glycol; sheep

1. Introduction

Induction and synchronization of estrus and ovulation in sheep, in both breeding or non-breeding season and both for natural mating or artificial insemination, mostly rely on the use of protocols including the insertion of intravaginal devices with progesterone or progestagens and a single dose of equine chorionic gonadotrophin (eCG) at device removal [1]. The administration of eCG was found, in the early 1950s, to be successful for inducing estrus and ovulation during seasonal anoestrus [2,3]. Afterwards, was eCG found to also be effective for ensuring a narrow window of ovulation among ewes in the same lot and therefore was incorporated into first protocols including fixed-time artificial insemination (FTAI), which was developed in the 1960s [4,5]. These protocols have been carried on for decades, with changes only having been made in the type and duration of the progestative treatments, but always maintaining eCG as an essential component.

The future availability and use of eCG, however, is currently compromised because it is obtained by bleeding pregnant mares, and the societal pressure against companies manufacturing the hormone may force them to discontinue its production [6]. The banning of eCG will have a huge impact on sheep producers using out-of-season breeding, artificial insemination, or embryo transfer because there is no other product with similar activity [7]. Hence, there is a strong need for alternative protocols.

Our group has developed a protocol using gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) instead of eCG [7]. Such protocol has proved to be useful in breeding season, with a percentage of sheep responding with estrus and ovulation similar to eCG-based treatments (around 85–95%), but unfeasible during non-breeding season, with only 35–48% of ewes showing estrus behavior (unpublished results). However, almost all (83–96%) of the treated sheep were found to be ovulated in spite of the absence of estrus signs. Concomitantly, occurrence of estrus was also slightly affected during breeding season [8]; its onset occurred later in GnRH-treated sheep compared with eCG-treated sheep, although intervals among timing of estrus-preovulatory luteinizing hormone (LH) peak-ovulation were similar with both hormones. Our hypothesis for such absence or delay of estrus signs would be that a single GnRH injection could not stimulate an adequate development and maturation of the preovulatory follicle. Available evidence indicates that the administration of GnRH induces a sharp discharge of LH, which in turns induces ovulation [9], without the sustained follicle stimulating hormone (FSH) and LH activity provided by the long half-life of eCG. Half-life of GnRH is indeed 2–4 min because it is rapidly degraded by peptidases and cleared by glomerular filtration [10]. Hence, in GnRH-treated sheep, there would be a lack of the LH pulsatility that is necessary for final follicle maturation and onset of estrus behavior [11].

Our second hypothesis is that occurrence and features of estrus and ovulation would be improved by slowing and extending the release of GnRH. Such an effect may be accomplished by inducing a prolonged absorption phase with a solvent, allowing a long-acting formulation [12]. The choice should only consider those solvents that are generally recognized as safe (GRAS) [13]. There are different nonionic surfactants considered GRAS, such as polyethylene-glycol and propylene-glycol, which provide slower drug absorption from the injection site and higher bioavailability [14]. Propylene-glycol, when used as a cosolvent for peptide hormones, has even shown to induce higher bioavailability than polyethylene-glycol (around 60% and 12% higher than water solutions, respectively) [15]. Moreover, propylene-glycol has low systemic toxicity, and exposure of laboratory animals has only been associated with reversible hematological changes [16]; the same has been found in sheep (unpublished results). The compound has been successfully used as a cosolvent for long-acting parenteral administration of both peptide and steroid hormones in sheep [17,18], with the subcutaneous route inducing both longer mean residence time and longer above-threshold value time of the hormone than the intramuscular route [18]. Furthermore, the use of subcutaneous administration induces fewer problems of precipitation, pain, inflammation, and hemolysis than the intramuscular injection [19,20].

Hence, prior to further studies in non-breeding season and FTAI protocols, the aims of the present work were to evaluate (a) the reproductive response of sheep in breeding season to the administration of GnRH using propylene-glycol as a cosolvent, and (b) the most adequate timing for

such administration. Two consecutive experiments were performed, the first trial used a prostaglandin-based protocol to determine the effect of including GnRH in either distilled water or propylene glycol on the ovarian response and, subsequently, the second trial aimed to determine the efficiency of including GnRH in propylene-glycol in progesterone-based protocols.

2. Materials and Methods

2.1. Animals and Ethical Issues

The study included two consecutive trials that were carried out during the breeding season (end of October and early November), involving 55 Segureña sheep (2–5 years-old, with a mean body condition of 3.5 ± 0.5) at the experimental flock of the CEU Cardenal Herrera University in Naquera (Valencia, Spain; latitude 39°N). The experiments were performed according to the Spanish Policy for Animal Protection RD53/2013, which meets the European Union Directive 2010/63/UE about the protection of animals used for research, and was specifically assessed and approved by the CEU Cardenal Herrera Committee of Ethics in Animal Research (report CEEA17/019).

2.2. Experimental Design

The first trial aimed at determining the effect of GnRH administration in either distilled water or propylene-glycol on the ovarian response to prostaglandin-based protocols for estrus synchronization. Ovarian cyclic activity and ovulation were synchronized, in a total of 18 ewes, by the i.m. administration of two doses of prostaglandin $F_{2\alpha}$ (5 mg of Dinolytic (Zoetis, Madrid, Spain)), 7 days apart. At 32 h after the second prostaglandin dose, a third of the animals received one s.c. injection of 5 mL of distilled water and remained as controls (group CON, $n = 6$), whereas the remaining ewes were injected with 50 μg of GnRH (Acegon, Lab. Syva, Leon, Spain), in either a single i.m. dose in distilled water (group WAT, $n = 6$) or a single s.c. dose in propylene-glycol (group PPG, $n = 6$), as depicted in Figure 1. The GnRH solution in the group PPG was prepared by mixing 1 mL of Acegon (equivalent to 50 μg of GnRH) with 4 mL of propylene-glycol, as previously described [16,17].

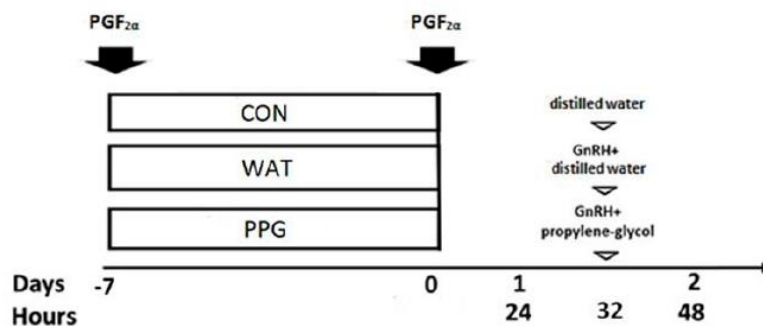


Figure 1. Experimental groups of trial 1, aiming to determine the effect of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) administration in either distilled water or propylene-glycol on the ovarian response to prostaglandin-based protocols. All females were treated with two doses of prostaglandin $F_{2\alpha}$ (PGF_{2α}) 7 days apart and, 32 h after injecting the second dose, they received either 5 mL of distilled water (group CON, $n = 6$) or 1 mL of Acegon (50 μg of GnRH) in either i.m. distilled water (group WAT, $n = 6$) or i.m. 4 mL of propylene-glycol (group PPG, $n = 6$).

The second trial, developed from the results obtained in the first trial, aimed to determine the effect and adequate timing of GnRH administration in either distilled water or propylene glycol on

the ovarian response to progesterone-based protocols for estrus synchronization. Ovarian cyclic activity and ovulation were synchronized, in a total of 37 ewes, by the insertion of one intravaginal progesterone-loaded CIDR (CIDR Ovis, Zoetis, Madrid, Spain) for 5 days with one i.m. injection of 5 mg of PGF_{2α} (Dinolytic, Zoetis, Madrid, Spain) at CIDR withdrawal. Four experimental groups were established, as depicted in Figure 2, being treated with i.m. 400 IU of eCG (Foligon, MSD Animal Health, Madrid, Spain; group eCG, *n* = 8) or with 50 µg of GnRH (Acegon, Lab. Syva, Leon, Spain), as previously described, in either i.m. distilled water at 56 h after CIDR removal (group WAT56, *n* = 8) or s.c. propylene-glycol at 24 or 36h after CIDR removal (groups PPG24, *n* = 11; and PPG36, *n* = 10).

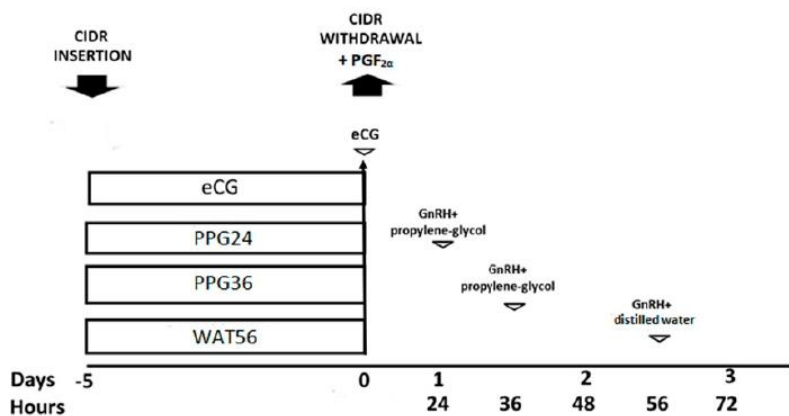


Figure 2. Experimental groups of trial 2, aiming to determine the effect and adequate timing of GnRH administration in either distilled water or propylene glycol on the ovarian response to progesterone-based protocols. All females were treated with one controlled internal drug release (CIDR) device with PGF_{2α} and 400 IU of equine chorionic gonadotrophin (eCG; group eCG, *n* = 8) or a single dose of 50 µg of GnRH in either i.m. distilled water (56 h after CIDR removal; group WAT56, *n* = 8) or s.c. propylene-glycol (24 or 36 h after CIDR removal; groups PPG24, *n* = 11; and PPG36, *n* = 10).

In both experiments, the variables evaluated were follicular dynamics during the follicular phase, percentage of ewes showing estrus signs and ovulation, and ovulation rate. Trial 1 also assessed duration of estrus behavior and plasma estradiol concentrations at estrus onset, whereas trial 2 evaluated timing of ovulation and plasma progesterone concentrations at the following luteal phase.

2.3. Occurrence and Timing of Estrus Behavior

Signs of estrus behavior were determined by the use of trained rams in a proportion of one ram/one ewe, twice daily in trial 1 and every 4 h in trial 2, from 24 to 72 h after second PGF_{2α} dose or CIDR removal, respectively. Estrus onset was defined as the time of the first accepted mating, whereas estrus end was defined as time in which the ewes refused to mate. Interval from treatment to estrus onset was determined in both trials, whereas length of estrus was also evaluated in Trial 1.

2.4. Development of Preovulatory Follicles During the Follicular Phase and Timing of Ovulation

The number of all follicles with ≥ 4 mm in size and the diameter of the largest follicles were determined in all the ewes by 7.5 MHz transrectal ultrasonography (Aloka SSD 500, Aloka Co. Ltd., Tokyo, Japan), every 24 h in trial 1 and every 4 h from 24 h after CIDR removal to onset of ovulation in Trial 2. Onset of ovulation was determined by assessing the disappearance of the ovulatory follicles recorded in a previous ultrasonography, as previously described [21].

2.5. Plasma Estradiol Concentrations During the Follicular Phase

Samples of 5 mL of jugular blood were collected concomitantly with estrus detection, from 24 h after second prostaglandin dose or CIDR removal to onset of estrus behavior, with heparinized vacuum blood evacuation tubes (Vacutainer Systems Europe, Becton Dickinson, Meylan Cedex, France). Blood samples were centrifuged at $2000 \times g$ for 15 min. Thereafter, the plasma was stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until assayed for estradiol- 17β determination. Such determination was performed, after sample extraction, by using an enzymeimmunoassay kit (Demeditec Diagnostics GmbH, Kiel-Wellsee, Germany). Sensitivity was 1.4 pg/mL, and intra-assay variation coefficient was 5.7%.

2.6. Number and Functionality of Corpora Lutea

Assessment of ovulation and counting of the number of corpora lutea were performed by ultrasonography at day 11 of the induced estrous cycles. The luteal functionality was evaluated in terms of progesterone secretion, by drawing blood samples coincidentally with ultrasound scanning at day 11 and processing them as described above for estradiol. Plasma progesterone concentrations were measured using an enzymeimmunoassay kit (Demeditec Diagnostics GmbH, Kiel-Wellsee, Germany). Sensitivity was 0.045 ng/mL, and intra-assay variation coefficient was 5.4%.

2.7. Statistical Analysis

The effects of treatment on the occurrence and onset of estrus behavior and ovulation, ovarian follicle dynamics, number of corpora lutea, and secretion of estradiol and progesterone were assessed by analyses of variance (ANOVA) and chi-squared test by using SPSS 22.0 (IBM Corporation, New York, NY, USA). Statistical analysis of results expressed as percentages was performed after arcsine transformation of the values for each individual percentage, after normality testing of the data. All results in main text and tables are expressed as mean \pm S.E.M. and statistical significance was accepted at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Trial 1: Effect of GnRH Administration in Prostaglandin-Based Protocols

Assessment of the ovarian follicular dynamics showed a similar mean number of ≥ 4 mm follicles and similar mean diameter of the ovulatory follicles at 24 and 48 h after the second prostaglandin $F_{2\alpha}$ dose among treatments (Figure 3), despite such follicles arising from different diameters at 0 h and a faster growth rate per day between 0 and 24 h in the group WAT and between 24 and 48 h in the group CON ($p < 0.05$ for both).

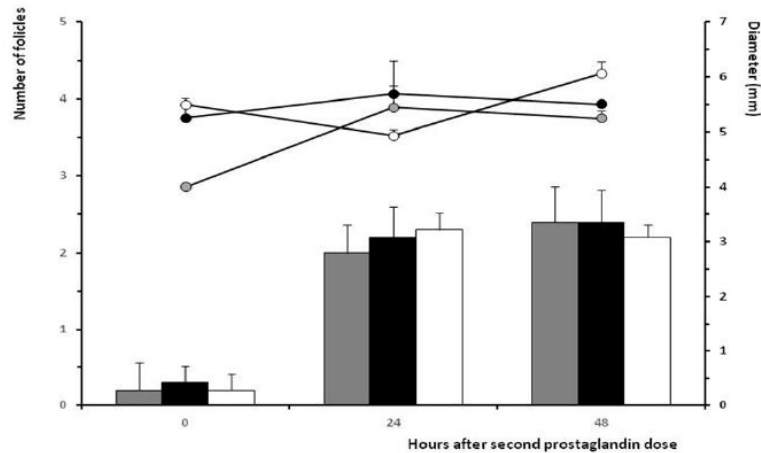


Figure 3. Mean number of ≥ 4 mm follicles (bars) and mean diameter of the largest follicle (lines) from time of second $\text{PGF}_{2\alpha}$ to ovulation in ewes treated with two doses of $\text{PGF}_{2\alpha}$ and a single dose of distilled water (group CON; white bars and dots) or 50 μg of GnRH in either distilled water (group WAT; grey bars and dots) or propylene-glycol (group PPG; black bars and dots) at 32 h after the second $\text{PGF}_{2\alpha}$ dose.

There were no significant differences in the percentage of ewes responding with appearance of estrus and ovulation to the prostaglandin-based treatment in the groups CON and PPG, but such a response was significantly lower in the group WAT (Table 1). Conversely, there were no differences among groups in onset and duration of estrus, plasma estradiol secretion at estrus, and ovulation rate.

Table 1. Percentage and timing of occurrence of estrus behavior, estradiol concentration at estrus, and occurrence and number of ovulations in ewes treated with two doses $\text{PGF}_{2\alpha}$ and a single dose of distilled water (CON) or 50 μg of GnRH in either i.m. distilled water (WAT) or s.c. propylene-glycol (PPG) at 32 h after the second $\text{PGF}_{2\alpha}$ dose.

Group	PPG	WAT	CON
Occurrence of estrus (%)	83.3 (5/6) ^a	66.7 (4/6) ^b	100 (6/6) ^a
Onset of estrus (h)	40.8 \pm 4.3	42.0 \pm 4.8	48.0 \pm 0.1
Length of estrus (h)	32.4 \pm 8.0	27.0 \pm 4.6	38.0 \pm 4.8
Plasma estradiol at estrus (pg/mL)	3.0 \pm 1.6	2.9 \pm 0.2	5.5 \pm 1.2
Occurrence of ovulation (%)	100 (6/6) ^a	50 (3/6) ^b	100 (6/6) ^a
Ovulation rate (n)	1.6 \pm 0.3	1.3 \pm 0.2	1.5 \pm 0.2

Different superscripts indicate significant differences among treatments ($a \neq b$; $p < 0.05$).

The distribution of occurrence of estrus over time showed that, although some of the animals were in estrus prior to GnRH application, almost all of the responding animals showed the onset of estrus behavior between 36 and 48 h after the second prostaglandin dose, with a higher percentage of them in the group CON ($p < 0.05$; Figure 4).

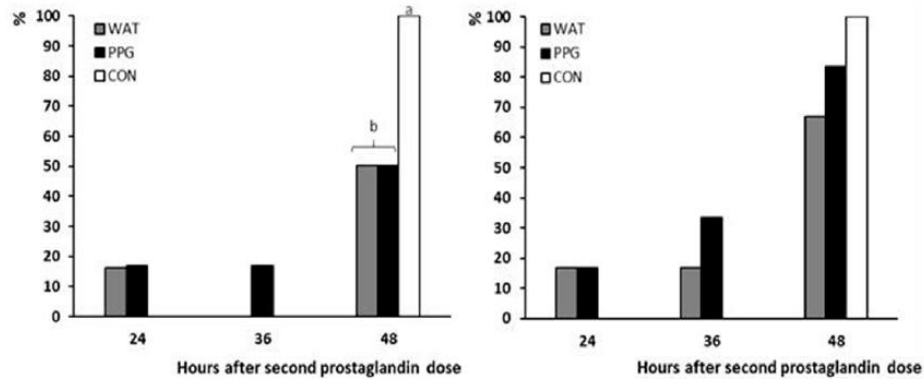


Figure 4. Absolute (left panel) and cumulative (right panel) percentages of sheep showing onset of estrus after treatment with two doses of $\text{PGF}_{2\alpha}$ and a single dose of distilled water (group CON; white bars) or 50 μg of GnRH in either distilled water (group WAT; grey bars) or propylene-glycol (group PPG; black bars) at 32 h after the second $\text{PGF}_{2\alpha}$ dose. Different superscripts indicate significant differences among treatments ($a \neq b$; $p < 0.05$).

3.2. Trial 2: Efficiency and Timing of GnRH Administration in Progesterone-Based Protocols

Occurrence of estrus behavior was similar among groups eCG, WAT56, and PPG36 (87.5%, 80%, and 100% of the ewes, respectively) and lower in the group PPG24 (18.2%; $p < 0.05$). However, all ewes showed ovulations with similar ovulation rate among groups but progesterone concentrations higher in groups eCG, WAT56, and PPG36 than in the group PPG24 ($p < 0.05$; Table 2).

Table 2. Percentage, timing of occurrence and intervals of estrus behavior and ovulation, number of ovulations, and plasma progesterone concentrations in ewes treated with CIDR with $\text{PGF}_{2\alpha}$ and 400 IU of eCG (at CIDR removal; eCG) or 50 μg of GnRH in either i.m. distilled water (56 h after CIDR removal; WAT56) or s.c. propylene-glycol (24 or 36 h after CIDR removal; PPG24 and PPG36).

Group	PPG24	PPG36	WAT56	eCG
Occurrence of estrus (%)	18.2 (2/11) ^b	80.0 (8/10) ^a	100 (8/8) ^a	87.5 (7/8) ^a
Timing of estrus (h)	30 \pm 2.5 ^a	40 \pm 2.4 ^b	47 \pm 3.2 ^b	30.1 \pm 1.5 ^a
Occurrence of ovulation (%)	100 (11/11)	100 (10/10)	100 (8/8)	100 (8/8)
Timing of ovulation (h)	68 ^a	74.5 \pm 2.3 ^{ab}	79.5 \pm 2.2 ^b	66.3 \pm 3.8 ^a
Interval estrus-ovulation (h)	40	34 \pm 1.3	32.5 \pm 1.9	36.1 \pm 2.5
Ovulation rate (n)	1.7 \pm 0.2	1.8 \pm 0.2	1.6 \pm 0.1	1.5 \pm 0.2
Plasma progesterone (ng/mL)	4.5 \pm 0.4 ^a	6.1 \pm 0.6 ^b	5.1 \pm 0.6 ^b	5.3 \pm 1.3 ^b

Different superscripts indicate significant differences among treatments ($a \neq b$; $p < 0.05$).

The onset of estrus behavior (Figure 5) occurred significantly earlier in groups eCG and PPG24 (around 30 h for both) than in groups PPG36 and WAT56 (around 40 and 47 h, respectively; $p < 0.05$).

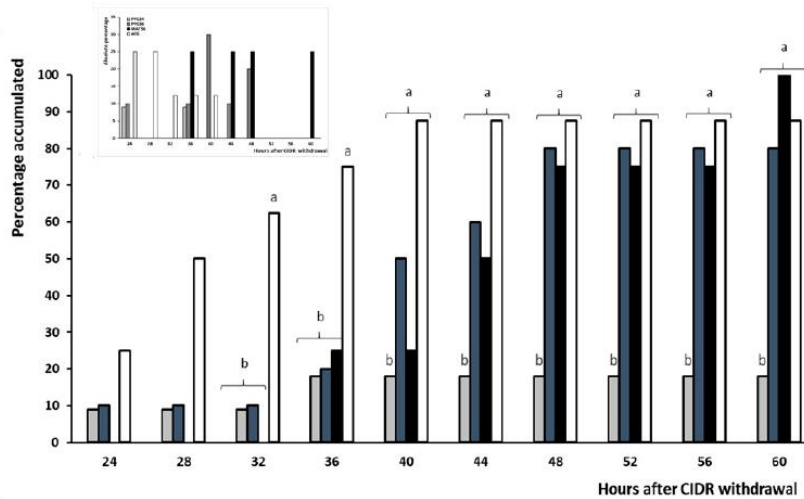


Figure 5. Timing of onset of estrus in ewes treated with one CIDR with $\text{PGF}_{2\alpha}$ and 400 IU of eCG (at CIDR removal; group eCG, white bars) or 50 μg of GnRH in either distilled water (56 h after CIDR removal; group WAT56, black bars) or propylene-glycol (24 or 36 h after CIDR removal; groups PPG24 and PPG36, with light and dark grey bars, respectively). Cumulative percentage of animals is represented in the main panel, whereas absolute percentages in each interlude are represented in the inset graph. Different letters indicate statistical differences between groups ($a \neq b$; $p < 0.05$).

Afterwards, as depicted in Figure 6 and Table 2, occurrence of ovulation was also earlier in groups eCG and PPG24 (around 66–68 h) than in the group WAT56 (around 80 h, $p < 0.05$), with intermediate values for PPG36 (around 75 h). However, such differences were mostly related to the earlier appearance of estrus, as the interval estrus-ovulation was similar among groups (Table 2).

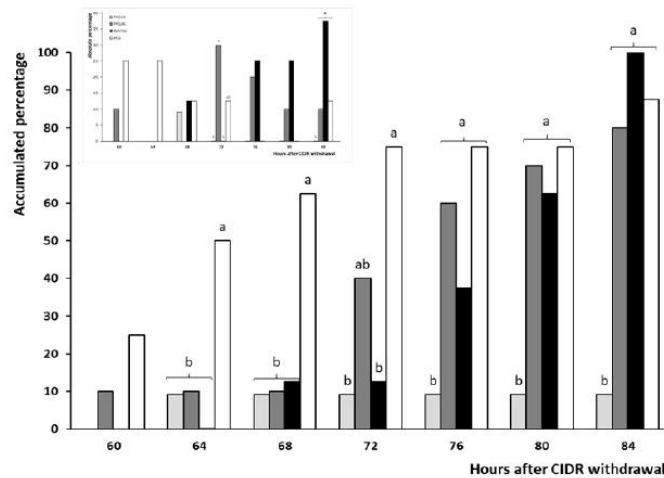


Figure 6. Timing of onset of ovulation in ewes treated with one CIDR with $\text{PGF}_{2\alpha}$ and 400 IU of eCG (at CIDR removal; group eCG, white bars) or 50 μg of GnRH in either distilled water (56 h after CIDR removal; group WAT56, black bars) or propylene-glycol (24 or 36 h after CIDR removal; groups PPG24 and PPG36, with light and dark grey bars, respectively). Cumulative percentage of animals is

represented in the main panel, whereas absolute percentages in each interlude are represented in the inset graph. Different letters indicate statistical differences between groups ($a \neq b$; $p < 0.05$).

The assessment of follicle dynamics from 48 h after CIDR withdrawal to the occurrence of ovulation (Figure 7) showed similar patterns among groups, except for a larger diameter of the largest follicle in the group WAT56 than in the other groups ($p < 0.05$).

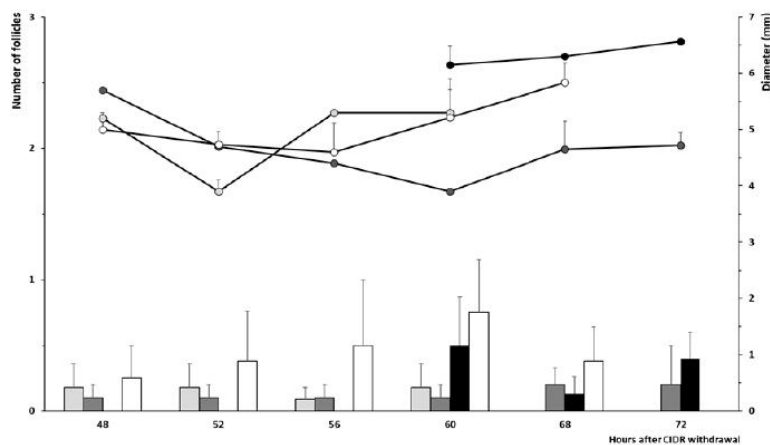


Figure 7. Mean number of ≥ 4 mm follicles (bars) and mean diameter of the largest follicle (lines) from 48 h after CIDR withdrawal to ovulation in ewes treated with 400 IU of eCG (at CIDR removal; group eCG, white bars and dots) or 50 μ g of GnRH in either distilled water (56 h after CIDR removal; group WAT56, black bars and dots) or propylene-glycol (24 or 36 h after CIDR removal; groups PPG24 and PPG36 with light grey and dark grey bars and dots, respectively).

4. Discussion

The results from the present study confirm previous data indicating that the ovarian response to the administration of GnRH is highly dependent on the timing of such administration and may indicate a similar situation when using propylene-glycol as a cosolvent. Previous studies have shown that GnRH must be applied at least 24–36 h after progestagen removal or luteolysis [22]. Its earlier application indeed induces an early LH surge, which may block the ovarian steroidogenesis and cause anovulation and luteinization of the preovulatory follicle [23]. There are other studies that indicate that even GnRH administration at 24 or 30 h after induction of luteolysis with $\text{PGF}_{2\alpha}$ may compromise reproductive performance [23–25]. These results are supported by our current data. First, in the GnRH-treated group, the largest follicle was in the static phase of growth around estrus, whilst such a follicle was growing in the control group. Concomitantly, although differences did not reach statistical significance, possibly due to the low number of animals in each group, plasma estradiol concentrations at estrus onset in the ewes injected with GnRH both in distilled water and PPG at 32 h after $\text{PGF}_{2\alpha}$ administration were lower than in the controls. Finally, one-third of ewes from the WAT group did not show the occurrence of estrus, and half of them did not ovulate. From these results, administration of GnRH earlier than 36 h would not be useful for inducing a better synchronization of ovulation in $\text{PGF}_{2\alpha}$ -based treatments, in agreement with data from Olivera-Muzante and co-workers [25].

The results found in the first trial when assessing follicle dynamics and estradiol secretion in ewes treated with GnRH in propylene-glycol were similar to sheep treated with GnRH in distilled water. However, around 83% of these sheep showed estrus signs, and all of them ovulated, which supports the idea that administration of GnRH in a long-acting cosolvent like propylene-glycol via

subcutaneous would induce better results than in the case of intramuscular saline solution or distilled water. In any case, the objective of this first trial was to determine if an early administration of GnRH in propylene-glycol would also block the appearance of estrus and ovulation or would be useful for inclusion in progesterone-based treatments. From the positive results obtained in the first trial, we developed the second experiment.

The results found in the second trial confirmed that an early administration of GnRH following the induced luteolysis alters the final growth of the ovulatory follicles. In the group treated with GnRH at 24 h after CIDR withdrawal (group PPG24), estrus behavior was only observed in two of the 11 sheep; one of them was already in estrus at the GnRH injection and ovulated, whereas the other ewe developed an anovulatory follicle. Afterwards, all of the ewes in this group were found to be ovulated at the ultrasonographic screening performed 11 days after CIDR removal, but showed lower plasma progesterone concentrations than the remaining groups. Moreover, progesterone concentrations in the subsequent luteal phase were lower in PPG24 compared to the other groups. It is well known that the occurrence of an inadequate follicular development leads to subnormal corpus luteum formation, causing low levels of secretion of progesterone [26]. Secretion of estradiol during preovulatory stages and secretion of progesterone during the first days of the luteal phase of sheep play an important role on the expression of several hormones and signaling factors in the oviduct and uterine secretions, crucial for early embryo development [27–29]. Therefore, according to the results of the present study, the conditions created by the early GnRH administration would not promote adequate conditions for the final follicular growth and the conception in the ewe [8,30].

Conversely, the results obtained with the use of GnRH at 36 h after CIDR withdrawal (group PPG36) are comparable to the control groups eCG and WAT56 and are therefore very promising. In fact, 80% of the animals in the group PPG36 developed estrus in a narrow timing (75% between 36 and 48 h after CIDR removal), and all of them ovulated, also in a narrow window (87.5% between 72 and 84 h after CIDR removal, with 62.5% between 72 and 76 h). The screening of corpora lutea also showed similar ovulation rate and plasma progesterone concentrations to the control groups. The main difference among the groups eCG, PPG36, and WAT56, in agreement with previous studies [8], were mainly determined by the timing of onset of estrus behavior (i.e., the time needed by the preovulatory follicle to reach its maximal estradiol secretion and therefore to induce estrus signs), as the intervals between the preovulatory LH surge and the ovulation were similar among the three treatments. In fact, timing of ovulation in the group PPG36 was intermediate between groups eCG and WAT56, which, besides the narrow range of appearance of estrus and ovulation, indicated a good synchronization of the terminal growth phase of ovulatory follicles.

These results suggest that administration of GnRH in propylene-glycol at 36 h after CIDR withdrawal may constitute a good alternative for protocols based on FTAI during the breeding season. However, such a hypothesis needs to be tested under field conditions because the design of the present study was mainly focused on studying the characteristics of follicle dynamics, estrus, and ovulation (which require a high number of successive samples from a small number of animals), rather than the fertility yields (which require a large number of animals). Concomitantly, the current results showing that administration of GnRH in propylene-glycol at 36 h after CIDR withdrawal is useful to stimulate the adequate development and maturation of preovulatory follicle may set the basis for its application during non-breeding season, when eCG shortage may be critical because gonadotrophin secretion and therefore ovulation are depressed [31].

5. Conclusion

Protocols based on a short-term CIDR treatment and a single dose of GnRH in propylene-glycol at 36 h after CIDR removal may constitute an alternative to traditional protocols based on the administration of a single dose of eCG at CIDR removal during breeding season. Further research for assessing its implementation and usefulness during non-breeding season needs to be undertaken.

Author Contributions: All authors have read and agree to the published version of the manuscript. Conceptualization: Z.S.J., P.M.-R., A.G.-B.; investigation and methodology: Z.S.J., S.G.-G., T.E., P.M.-R., A.G.-B.;

writing—original draft: Z.S.J., S.G.-G., P.M.-R., A.G.-B.; Writing—review and editing: Z.S.J., S.G.-G., T.E., F.B., F.G.V.-D., P.M.-R., A.G.-B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: The authors thank the CEU-Cardenal Herrera farm staff for their assistance with animal care and handling.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Abecia, J.A.; Forcada, F.; Gonzalez-Bulnes, A. Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Anim. Reprod. Sci.* **2012**, *130*, 173–179.
2. Dutt, R.H. Induction of oestrus and ovulation in anestrual ewes by the use of progesterone and pregnant mares serum. *J. Anim. Sci.* **1952**, *11*, 792.
3. Robinson, T.J. Role of progesterone in the mating behaviour of the ewe. *Nature* **1952**, *170*, 373–374.
4. Robinson, T.J. Use of progestagen-impregnated sponges inserted intravaginally or subcutaneously for the control of the oestrous cycle in the sheep. *Nature* **1965**, *206*, 39–41.
5. Shelton, J.N. Identification of progestogens of high activity for the control of the oestrous cycle in the sheep. *Nature* **1965**, *206*, 156–158.
6. Manteca-Vilanova, X.; De Briyne, N.; Beaver, B.; Turner, P.V. Horse welfare during equine Chorionic Gonadotropin (eCG) production. *Animals* **2019**, *9*, 12.
7. Gonzalez-Bulnes, A.; Menchaca, A.; Martin, G.B.; Martinez-Ros, P. Seventy years of progestagen treatments for management of the sheep oestrous cycle: Where we are and where we should go. *Reprod. Fertil. Dev.* **2020**, *32*, 441–452.
8. Martinez-Ros, P.; Gonzalez-Bulnes, A. Efficiency of CIDR-based protocols including GnRH instead of eCG for estrus synchronization in sheep. *Animals* **2019**, *9*, 146.
9. Eppleston, J.; Evans, G.; Roberts, E.M. Effect of time of PMSG and GnRH on the time of ovulation, LH secretion and reproductive performance after intrauterine insemination with frozen ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* **1991**, *26*, 227–237.
10. Kumar, P.; Sharma, A. Gonadotropin-releasing hormone analogs: Understanding advantages and limitations. *J. Hum. Reprod. Sci.* **2014**, *7*, 170–174.
11. Baird, D.T. Factors regulating the growth of the preovulatory follicle in sheep and human. *J. Reprod. Fertil.* **1983**, *69*, 343–352.
12. Kukanich, B.; Gehring, R.; Webb, A.I.; Craigmill, A.L.; Riviere, J.E. Effect of formulation and route of administration on tissue residues and withdrawal times. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **2005**, *227*, 1574–1577.
13. Klink, P.R.; Ferguson, T.H.; Magruder, J.A. Formulation of veterinary dosage forms. In *Development and Formulation of Veterinary Dosage Forms*, 2nd ed.; Hardee, G.E., Baggot, J.D., Eds.; Marcel Dekker: New York, NY, USA, 1998; pp. 145–229.
14. Baggot, J.D.; Brown, S.A. Basis for selection of the dosage form. In *Development and Formulation of Veterinary Dosage Forms*; Marcel Dekker: New York, NY, USA, 1998; pp. 7–43.
15. Gao, P.; Guyton, M.E.; Huang, T.; Bauer, J.M.; Stefanski, K.J.; Lu, Q. Enhanced oral bioavailability of a poorly water soluble drug PNU-91325 by supersaturatable formulations. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2004**, *30*, 221–229.
16. LaKind, J.S.; McKenna, E.A.; Hubner, R.P.; Tardiff, R.G. A review of the comparative mammalian toxicity of ethylene glycol and propylene glycol. *Crit. Rev. Toxicol.* **1999**, *29*, 331–365.
17. Lopez-Sebastian, A.; Gomez-Brunet, A.; Lishman, A.W.; Johnson, S.K.; Inskoop, E.K. Modification by propylene glycol of ovulation rate in ewes in response to a single injection of FSH. *J. Reprod. Fertil.* **1993**, *99*, 437–442.
18. Contreras-Solis, I.; Gomez-Brunet, A.; Encinas, T.; Gonzalez-Bulnes, A.; Santiago-Moreno, J.; Lopez-Sebastian, A. Influence of vehicle on kinetics of exogenous progesterone administered either by subcutaneous and intramuscular routes to sheep. *Res. Vet. Sci.* **2008**, *85*, 162–165.
19. Brazeau, A.G.; Cooper, B.; Svetic, K.A.; Smith, C.L.; Gupta, P. Current perspectives on pain upon injection of drugs. *J. Pharm. Sci.* **1998**, *87*, 667–677.
20. Strickley, R.G. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. *Pharm. Res.* **2004**, *21*, 201–230.

21. Veiga-Lopez, A.; Encinas, T.; McNeilly, A.S.; Gonzalez-Bulnes, A. Timing of preovulatory LH surge and ovulation in superovulated sheep are affected by follicular status at start of the FSH treatment. *Reprod. Domest. Anim.* **2008**, *43*, 92–98.
22. Wildeus, S. Current concepts y synchronization of estrus: Sheep and goats. *J. Anim. Sci.* **2000**, *77*, 1–14.
23. Hay, M.F.; Moor, R.M. Functional and structural relationships in the Graafian follicle population of the sheep ovary. *J. Reprod. Fertil.* **1975**, *45*, 583–593.
24. Martemucci, G.; D'Alessandro, A.G. Synchronization of oestrus and ovulation by short time combined FGA, PGF 2α , GnRH, eCG treatments for natural service or AI fixed-time. *Anim. Reprod. Sci.* **2011**, *123*, 32–39.
25. Olivera-Muzante, J.; Gil, J.; Viñoles, C.; Fierro, S. Reproductive outcome with GnRH inclusion at 24 or 36 h following a prostaglandin F 2α -based protocol for timed AI in ewes. *Anim. Reprod. Sci.* **2013**, *138*, 175–179.
26. Gonzalez-Bulnes, A.; Veiga-Lopez, A.; Garcia, P.; Garcia-Garcia, R.M.; Ariznavarreta, C.; Sanchez, M.A.; Tresguerres, J.A.F.; Cocero, M.J.; and Flores, J.M. Effects of progestagens and prostaglandin analogues on ovarian function and embryo viability in sheep. *Theriogenology* **2005**, *63*, 2523–2534.
27. Garcia-Palencia, P.; Sanchez, M.A.; Nieto, A.; Vilar, M.P.; Gonzalez, M.; Veiga-Lopez, A.; Gonzalez-Bulnes, A.; Flores, J.M. Sex steroid receptor expression in the oviduct and uterus of sheep with estrus synchronized with progestagen or prostaglandin analogues. *Anim. Reprod. Sci.* **2007**, *97*, 25–35.
28. Ruiz-Gonzalez, I.; Sanchez, M.A.; Garcia-Fernandez, R.A.; Garcia-Palencia, P.; Sanchez, B.; Letelier, C.A.; Gonzalez-Bulnes, A.; Flores, J.M. Endometrial expression of IFNAR-1 and oxytocin receptor (OTR) is not improved by prostaglandin analogues when compared to progestagens in ewes. *Reprod. Domest. Anim.* **2012**, *47*, 274–280.
29. Ruiz-Gonzalez, I.; Sanchez, M.A.; Garcia-Fernandez, R.A.; Garcia-Palencia, P.; Sanchez, B.; Gonzalez-Bulnes, A.; Flores, J.M. Different influence of ovine estrus synchronization treatments on canuncular early angiogenesis. *Histol. Histopathol.* **2013**, *28*, 373–383.
30. Titi, H.H.; Kridli, R.T.; Alnimer, M.A. Estrus synchronization in sheep and goats using combinations of GnRH, progestagen and prostaglandin F 2α . *Reprod. Domest. Anim.* **2010**, *45*, 594–599.
31. Joseph, I.B.J.K.; Currie, W.D.; Rawlings, N.C. Effects of time after ovariectomy, season and oestradiol on luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion in ovariectomized ewes. *J. Reprod. Fertil.* **1992**, *94*, 511–523.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Experimento 4. Respuesta reproductiva a la administración de GnRH, vehiculizada en propilenglicol, en protocolos de inducción de celo y ovulación con progesterona durante el anestro estacional.

El objetivo de esta prueba experimental fue evaluar el uso de GnRH en propilenglicol para la inducción de la actividad estral y ovulatoria en ovejas de raza Dorper durante la estación no reproductiva. Este desarrollo experimental no se ha publicado aún; por ello, lo describimos en mayor detalle.

Este experimento se llevó a cabo durante la estación no reproductiva (abril) en México. Para ello, se utilizaron 23 ovejas multíparas de 2 a 4 años, con un peso promedio de $43,7 \pm 1,4$ kg y una condición corporal de $2,5 \pm 0,2$ (en una escala de 0-5) tratadas con un dispositivo CIDR durante siete días y, en el momento de retirar el CIDR, una dosis intramuscular de 5 mg de prostaglandina (Lutalyse®). Además, dependiendo del grupo experimental, recibieron 300 UI de eCG por vía intramuscular (grupo eCG; n=11) o 50 µg de GnRH en propilenglicol (GnRH Sanfer®, México) por vía subcutánea a las 36 h de la retirada del CIDR (grupo GnRH; n=12;).

En todas las ovejas se evaluó el porcentaje de aparición y momento de aparición de la sintomatología de celo después de retirar el dispositivo, el porcentaje de aparición y momento de aparición de la ovulación y, posteriormente, la tasa de ovulación en el día 11 del ciclo sexual inducido y la tasa de gestación y número de embriones en el día 35.

Los resultados obtenidos en este experimento se muestran en la Tabla 5. En ella se observa que las ovejas del grupo eCG mostraron un 100% de actividad estral frente a un 0% de las ovejas del grupo tratado con GnRH-PPG ($p < 0,05$). En el grupo eCG se observa un 81% de ovejas ovuladas y un 72% de hembras gestantes; por el contrario, solo el 58% de las ovejas habían ovulado, y ninguna de ellas estaba gestante, en el grupo GnRH-PPG.

Tabla 5. Respuesta reproductiva en ovejas de raza Dorper a la administración de un tratamiento de sincronización de celos y ovulaciones basado en la administración de CIDR en combinación con eCG (grupo eCG) o GnRH vehiculada en propilenglicol (grupo GnRH-PPG).

Variables evaluadas	eCG	GnRH-PPG
Momento de aparición del celo (h)	41,45±3,38	-
Hembras en celo (%)	100 (11/11) ^a	0 (0/12) ^b
Duración del celo (h)	29,45±4,08	-
Hembras ovuladas (%)	81,82 (11/13) ^a	58,33 (7/12) ^b
Momento de la ovulación (h)	70,91±3,01	-
Tasa ovulatoria	1,91±0,25 ^a	1,57±0,15 ^a
Tasa de gestación (%)	72,73 (8/13)	-
Número de embriones	1,63±0,16	-

^{a,b} Diferentes superíndices indican diferencia estadística entre grupo ($p < 0,05$).

Los resultados obtenidos en el grupo eCG coinciden con los obtenidos en investigaciones previas, donde se observa la inducción del 100% de actividad estral en ovejas tratadas con progesterona y eCG durante la estación no reproductiva (Vilariño *et al.*, 2013; Santos-Jiménez *et al.*, 2020b; 2021).

Es conocido que, durante el periodo de anestro, los niveles bajos de estradiol no estimulan la secreción de LH por parte de la hipófisis (Barrell *et al.*, 1992). El desarrollo de los folículos se produce de forma continua durante el período de anestro, pero los niveles de LH son insuficientes para las etapas finales del desarrollo folicular (Squires, 2010) y, al no producirse la maduración folicular terminal, los niveles de estradiol son bajos. Estos niveles de estradiol secretados por los folículos ováricos son indispensables para la manifestación de signos de celo (Hashem & Sallam, 2020). A pesar de que a las ovejas de nuestra investigación se les administró un tratamiento con progesterona durante 7 días, la

administración de GnRH no se relacionó con la aparición de signos de celo, presuntamente por una falta de efecto sobre la liberación de LH y, con ello, sobre la maduración folicular. Sin embargo, sí que indujeron ovulaciones en un 58,33% de las ovejas tratadas; aunque en un porcentaje menor que en el grupo eCG (81,8%; $p < 0,05$).

La falta de manifestación estral puede deberse a un problema de menor sensibilidad ovárica a las hormonas gonadotrofinas durante el anestro estacional (Bartlewski *et al.*, 2011). Es por eso, que solo el 58,33% de las ovejas manifestaron “ovulaciones silenciosas” en comparación con el 100%, como en la estación reproductiva (Santos-Jiménez *et al.*, 2020b). Este signo es muy característico en hembras que reinician su actividad estral después del anestro estacional o después de la pubertad (Smith *et al.*, 2018). Por otro lado, Año-Perello *et al.* (2020), mencionan que el uso de GnRH estimula la ovulación o atresia de folículos ≥ 4 mm. El estradiol tiene un gran impacto en la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH); el estradiol no sólo regula la frecuencia y la amplitud de los pulsos de GnRH, sino también el patrón de liberación e induce un aumento sostenido de GnRH con cambios cualitativos (Evans *et al.*, 1994).

En conclusión, el uso de GnRH acompañado con un vehículo de liberación lenta como el propilenglicol, induce la ovulación del 58% de las ovejas tratadas, aunque sin la manifestación de actividad estral.

Experimento 5. Respuesta reproductiva a la administración de protocolos de inducción de celo y ovulación con progesterona y GnRH en vehículo lento por vía vaginal (OvuGel®), estación de transición anestro/estación reproductiva.

Los resultados anteriores muestran la incapacidad de inducir la actividad estral en ovejas en estación no reproductiva y tratadas con GnRH, ya sea en solución salina o en vehículo de liberación lenta como el propilenglicol. Por ello, se mantiene la necesidad de buscar protocolos que mejoren esta respuesta. Actualmente en el mercado se encuentra disponible un análogo de GnRH en forma de gel vaginal, que permite una liberación aún más lenta de la hormona y aporta un valor añadido acorde con la filosofía de mejora del bienestar animal. La presente prueba experimental tuvo como objetivo determinar su posible utilidad para la inducción de ovulaciones fértiles en ovejas en anestro, ya que este producto está registrado para cerdas.

Para ello, se procedió al estudio de la eficacia de la administración de GnRH por vía vaginal, administrada a diferentes tiempos tras la retirada del CIDR®, para inducir el celo y la ovulación en ovejas durante el periodo de anestro estacional. Este desarrollo experimental no se ha publicado aún por lo que lo describimos en mayor detalle.

Se realizaron dos experimentos complementarios en la granja experimental de la Universidad CEU Cardenal Herrera, al final de la estación de transición anestro/estación reproductiva (junio-julio). Para ello, se utilizaron 46 ovejas de raza Segureña multíparas de 2 a 4 partos, de 2 a 6 años y una condición corporal de $3,5 \pm 0,8$, a las cuales se les colocó un dispositivo CIDR® durante 5 días y una dosis intramuscular de 5 mg de $PGF_{2\alpha}$ en el momento de retirar el CIDR®.

En el primer experimento (junio) se utilizaron 27 ovejas distribuidas en tres grupos experimentales: grupo eCG (n=9) al que se administraron 300 UI de eCG en el momento de retirar el dispositivo y grupos OVG24 (n=9) y OVG36 (n=9) a los que se administró un gel vaginal que contenía un análogo de GnRH (0,1 mg de triptorelina; OvuGel® Vetoquinol, S.A. Lure, Francia), a las 24 y 36 h después de la retirada del CIDR®, respectivamente. En todas las ovejas se evaluó el porcentaje y el momento

de aparición de los signos de celo después de retirar el dispositivo y, mediante ultrasonografía transrectal, el porcentaje y el momento de aparición de la ovulación y la tasa de ovulación en el día 11 del ciclo sexual inducido.

Los resultados obtenidos muestran que el grupo tratado con eCG presentó un 100% de ovejas en celo; porcentaje significativamente más alto que en los grupos OVG24-1 y OVG36-1 (44,4 y 66,6%, respectivamente; $p < 0,05$ con el grupo eCG; (Tabla 6). Por otro lado, el momento de aparición del celo fue más tardío en los grupos tratados con OvuGel® pero, además, en una ventana muy amplia de tiempo (Figura 24).

Tabla 6. Resultados de las variables reproductivas evaluadas en ovejas de raza Segureña sometidas a un tratamiento de inducción y sincronización de celo a base de progesterona y PGF2 α s suplementado con eCG (eCG) vs OvuGel® a las 24 (OVG24) y 36 (OVG36) horas después de la retirada del dispositivo (CIDR).

VARIABLES EVALUADAS	MOMENTO DE LA APARICIÓN DEL CELO (h)	HEMBRAS EN CELO (%)	MOMENTO DE LA OVULACIÓN (h)	HEMBRAS OVULADAS (%)	TASA OVULATORIA
eCG	39,9 \pm 2,2 ^a	100 (9/9) ^a	72,8 \pm 1,7 ^a	88,88 (8/9) ^a	1,3 \pm 0,17 ^a
OVG24-1	53,7 \pm 7,2 ^b	44,4 (4/9) ^b	69,9 \pm 2,8 ^a	66,66 (6/9) ^a	1,1 \pm 0,13 ^a
OVG36-1	52,9 \pm 5,4 ^b	66,6 (6/9) ^{ab}	70,5 \pm 1,8 ^a	77,77 (7/9) ^a	1,2 \pm 0,15 ^a

^{a,b} Diferentes superíndices en una columna indican diferencia estadística ($p < 0,05$).

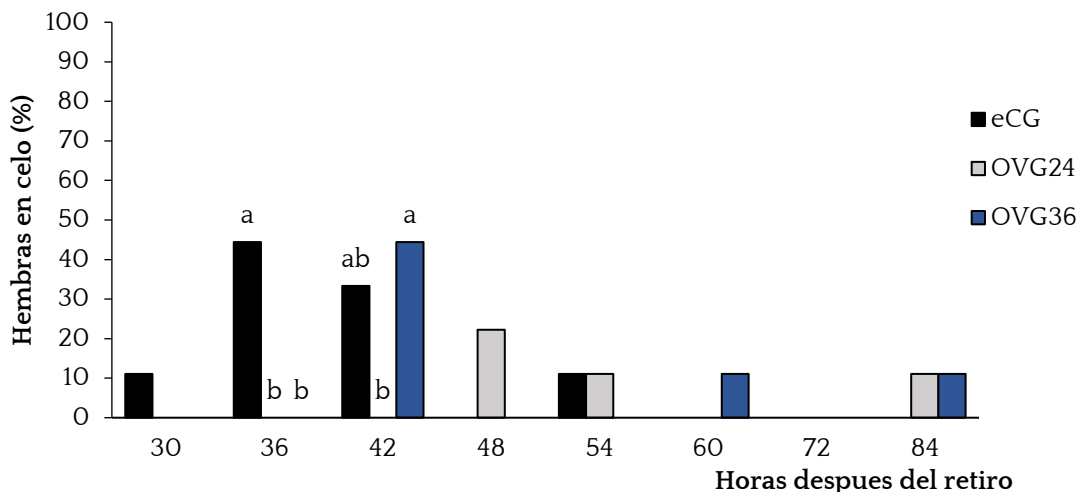


Figura 24. Representación gráfica del momento de aparición de la sintomatología de celo, en ovejas de raza Segureña bajo un tratamiento de inducción y sincronización de la actividad estral basado en administración de progesterona (CIDR®) y PGF2 α a su retirada. Adicionalmente se administraba eCG al momento del retiro del dispositivo (grupo eCG) u OvuGel® a las 24 (grupo OVG24) o 36 (grupo OVG36) horas tras el retiro del dispositivo. ^{a,b} Diferentes superíndices indican diferencia estadística ($p < 0,05$).

En el segundo experimento, realizado en julio con el fin de valorar la utilidad de un intervalo mayor de tiempo entre la retirada del CIDR y la administración de OvuGel®, se utilizaron 19 ovejas divididas en dos grupos: grupo OVG36 (n=9) y grupo OVG48 (n=10). En todas ellas se llevó a cabo la inserción de un CIDR durante 5 días y se administró OvuGel® a las 36 y 48 h después de retirar el CIDR (grupos OVG36 y OVG48, respectivamente).

En la Tabla 7, podemos observar que la respuesta en cuanto a aparición de celos fue muy baja e inferior al 30% en ambos grupos problema. Sin embargo, en todos grupos experimentales, el 90% de las ovejas ovularon.

Tabla 7. Respuesta reproductiva de las variables evaluadas en ovejas de raza Segureña bajo un esquema de tratamiento de inducción y sincronización de la actividad estral a base de OvuGel® por vía vaginal, a las 36 y 48 horas después del retiro del dispositivo (CIDR®).

Variables evaluadas	Momento de la aparición del celo (h)	Hembras en celo (%)	Hembras ovuladas (%)	Tasa ovulatoria
OVG36-2	54 ^a	11,11 (1/9) ^a	88,88 (8/9) ^a	1,71±0,16 ^a
OVG48-2	48±3,2 ^a	30 (3/10) ^a	90 (9/10) ^a	1,8 ±0,24 ^a

^{a,b} Diferentes superíndices en una misma columna indican diferencia estadística (p<0,05).

En el primer experimento podemos observar que el 100% de las ovejas tratadas durante el periodo de anestro con un CIDR® durante 5 días en combinación con eCG presentaron sintomatología de celo y un 88% de ellas, ovularon. Estos datos son similares a los obtenidos por otros autores y nuestro propio grupo en trabajos anteriores (Martínez-Ros *et al.*, 2018; Santos-Jiménez *et al.*, 2020 a,b).

El análisis de los resultados en los grupos tratados con OvuGel® muestra que el 66% de ovejas presentaron signos de celo en el grupo OVG36-1, mientras que sólo se observó un 44% de hembras en celo en el grupo OVG24-1. Los resultados del grupo OVG24-1 muestran una baja respuesta al igual que lo previamente reportado por Santos-Jiménez *et al.* (2020b), donde sólo un 18% de las ovejas que fueron tratadas con GnRH en PPG a las 24 h mostraron actividad estral. Este resultado fue atribuido a la temprana administración de la GnRH, a pesar de ser administrada con un vehículo de liberación lenta. Por otro lado, aunque no se encontraron diferencias significativas entre los grupos tratados con GnRH, observamos un alto porcentaje de hembras en celo 66.6% (6/9), con un porcentaje de ovejas ovuladas del 77% en las hembras del grupo OVG36-1. Estos resultados pueden ser alentadores y, por ello, se realizó el segundo experimento, valorando la respuesta a la administración de OvuGel más tardía (48 horas). En este segundo ensayo, el

grupo tratado con GnRH a las 36 h fue utilizado como control (OVG36-2) para el grupo tratado a las 48h (OVG48-2).

Sin embargo, en este experimento observamos una respuesta baja al tratamiento; solo el 40% de las hembras tratadas a las 48 h de la retirada del CIDR presentaron sintomatología de celo. La comparación con los resultados del primer ensayo, con un mayor porcentaje de aparición de celos, sugiere que algunos de los animales en el primer ensayo pudieron tener los denominados “celos por simpatía”, causados por estímulo feromonal (“efecto hembra”) por parte de las hembras del grupo eCG que entraban en celo. Esta hipótesis se ve sustentada por resultados similares observados por Zarco *et al.* (1995), tras inducir actividad estral en ovejas anovulatorias mediante la presencia de hembras en celo después de un tratamiento con esponjas y eCG. En este sentido, las hembras de los grupos OVG24-1 y OVG36-1 del primer ensayo no mostraron actividad hasta 42 h después de retirar el dispositivo, mientras que el grupo eCG presentó actividad estral desde las 30 h (Figura 1). La falta de ovejas con signos de celo inducida por eCG se puede relacionar con la baja aparición de estos en el segundo ensayo. Por otro lado, el 80% de las ovejas de los dos ensayos ovularon, independientemente del momento de aplicación de OvuGel®.

En conclusión, el uso de OvuGel® induce ovulación en un alto número de animales, pero sin aparición de signos de estro. Es decir, no es útil para monta natural, pero podría utilizarse para inseminación artificial a tiempo fijo sin detección previa de celos. Este tratamiento de inducción puede resultar más eficaz que el uso de GnRH en un vehículo de liberación lenta administrada por vía subcutánea, debido a que las hembras tienen una vagina muy vascularizada durante el pro-estro y esto proporciona una gran superficie epitelial para una mejor absorción de la triptorelina (Knox *et al.*, 2018). No obstante, se necesitaría seguir ampliando esta línea de investigación para obtener resultados más concluyentes.

4. DISCUSIÓN GENERAL

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) estima que la población humana alcanzará 8.500 millones de personas en 2030 y 9.150 en 2050 (Hashem & Gonzalez-Bulnes, 2020), de las que alrededor de 113 millones sufrirán inseguridad alimentaria aguda severa (Hashem *et al.*, 2021). Ante estas previsiones, la producción de alimentos debería aumentar para esas fechas en un 70%. En base a estos datos, se hace necesario desarrollar estrategias que puedan solventar dicho problema mediante la optimización de la producción alimentaria. En este escenario, la producción de carne y de leche ovina son una opción importante, tanto económica como cultural y religiosa en algunas zonas.

La optimización de la producción hace necesaria la implementación de estrategias de manejo reproductivo que, en la mayoría de los casos, incluyen el uso racional y objetivo de tratamientos hormonales. Sin embargo, este uso, en determinados casos, conlleva numerosas limitaciones. Los tratamientos hormonales convencionales se enfocan en el control del ciclo estacional anual y del ciclo sexual, y se basan en el uso de hormonas exógenas para imitar (progesterona y sus análogos) o manipular (prostaglandina $F_{2\alpha}$ y sus análogos) la actividad del cuerpo lúteo, combinando estos tratamientos con la administración de otras hormonas que estimulan la secreción pituitaria de gonadotropinas (por ejemplo, gonadotropina coriónica equina, eCG). Sin embargo, existe una preocupación creciente por parte de la sociedad acerca del procedimiento de producción de eCG, que ha derivado en un fuerte movimiento de las asociaciones que velan por los derechos de los animales, en contra del uso de esta hormona. Como consecuencia, los laboratorios productores de eCG han anunciado la retirada de los productos comerciales que contienen esta hormona, lo que limita su administración y su incorporación a los protocolos de tratamiento hormonal utilizados en la mayoría de las tecnologías reproductivas. En un futuro próximo, este hecho repercutirá negativamente en la productividad ganadera y, por ende, en la producción mundial de alimentos. Por ello, se hace necesario el desarrollo de protocolos alternativos a aquellos basados en el uso de eCG (Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2020).

Existen algunos estudios previos encaminados a la búsqueda de alternativas viables al uso de la eCG; entre ellos, podemos señalar los trabajos de Martínez-Ros y González-Bulnes (2019), que comparan el uso del tratamiento tradicional basado en eCG con un tratamiento utilizando GnRH, y que muestran resultados similares en cuanto a la respuesta estral y ovulatoria. Estos resultados iniciales mostraron la necesidad de sucesivos estudios sobre el uso de análogos de GnRH; principalmente, para valorar la eficacia de los tratamientos basados en GnRH durante la estación no reproductiva.

Atendiendo a esta necesidad se ha desarrollado la presente Memoria de Tesis, cuyo objetivo general fue evaluar la efectividad de los tratamientos a base de dispositivos intravaginales de liberación controlada de progestágenos (CIDR®) en combinación con hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), como alternativa al uso actual de gonadotropina coriónica equina (eCG). Para ello se estudiaron los efectos producidos por distintos protocolos hormonales sobre los parámetros reproductivos en ovejas y la influencia de distintas variables como la paridad de las hembras tratadas (nulíparas o multíparas), momento de administración (estación del año; temporada reproductiva o anestro), temporalización de la administración de los distintos preparados hormonales (duración del tratamiento con progestágenos/CIDR, separación entre retirada del CIDR® y administración de la GnRH) y utilización de diferentes vehículos en el preparado de GnRH.

Al tenor de los resultados obtenidos en el desarrollo de la presente memoria de Tesis Doctoral, se puede afirmar que la paridad (nulíparas o multíparas) es un factor que puede condicionar los resultados del tratamiento, ya que las ovejas nulíparas mostraron menor respuesta reproductiva durante la estación de anestro que las hembras multíparas, lo que puede modificar la respuesta reproductiva y la fertilidad tras la sincronización de celos y ovulaciones. Estos resultados son similares a los obtenidos en un estudio anterior, realizado en el norte de México con ovejas de raza Dorper tratadas con CIDR® durante 7 días y en el que ninguna de las ovejas mostró signos de actividad estral (Santos-Jiménez *et al.*, 2021).

El hecho de realizar el experimento en temporada no reproductiva (anestro) puede haber condicionado los resultados obtenidos, ya que en la transición de la temporada no reproductiva (anestro) a la temporada reproductiva se presenta un mecanismo de anestro similar al que ocurre en la pubertad (Foster, 1986). Por lo tanto, al no haber existido un cuerpo lúteo ni progesterona de una ovulación anterior, la primera ovulación en la pubertad y al comienzo de la temporada de reproducción o después de un ciclo corto generalmente no va acompañada de un estro conductual (Robinson, 1970).

Existen otros factores en las ovejas nulíparas que afectan a la respuesta a los tratamientos hormonales. El principal de ellos es la edad a la que las hembras alcanzan la pubertad, que depende del fotoperiodo y la estación de nacimiento (otoño o primavera; Senger, 2005; Plant, 2015). Además, la pubertad se ve afectada por el estado de nutrición y consecuentemente por la ganancia de peso corporal (Cosentino *et al.*, 2021) y así, la pubertad se alcanza cuando las ovejas alcanzan entre el 50% y el 70% de su peso vivo adulto (Pool *et al.*, 2020).

Por otro lado, está bien documentado que el efecto de la eCG administrada después del tratamiento con CIDR® estimula el reclutamiento de pequeños folículos, el desarrollo folicular y la aparición de la ovulación, lo que causa que el celo y la ovulación ocurran de manera rápida y homogénea (Martinez-Ros *et al.*, 2019b; Reyes-Ramírez *et al.*, 2021). Sin embargo, bajo las condiciones de nuestra investigación (CIDR® durante 7 días más 300 UI de eCG), este efecto no se logró en hembras nulíparas, lo que discrepa de los resultados obtenidos por Ungerfeld y Rubianes (1999), donde al tratar a ovejas nulíparas con CIDR® a diferentes tiempos (6, 9 y 13 días) en combinación con eCG, se observaron porcentajes de aparición de celo del 92,3; 85,7 y 96,4% y, tasas de gestación de 61,5; 64,3 y 60,7%, respectivamente. Asimismo, el estudio del diámetro folicular, realizado también en el presente trabajo en las ovejas que comenzaron a mostrar signos de celo, muestra una diferencia significativa en las hembras múltiparas respecto a las nulíparas (6,63 vs 5,20 mm, respectivamente; $p < 0,05$). Aunque las medidas están dentro del rango de ovulación, las hembras nulíparas no ovularon, lo que hace sospechar una falta de madurez de los folículos o deficiencias en la liberación de LH y, con ello, deficiencias en la ovulación.

En base a estos resultados, los siguientes protocolos experimentales de la tesis se realizaron en ovejas multíparas para que el factor *número de partos previos* no interfiriera en el estudio comparativo de los dos tratamientos (tradicional, CIDR® más eCG, o alternativo, CIDR® más GnRH), tanto durante la estación reproductiva como en anestro estacional.

La principal diferencia encontrada entre el tratamiento tradicional (con eCG) frente al tratamiento alternativo (con GnRH, ya sea en una o dos administraciones) radica en la aparición de signos de celo durante el anestro estacional. En el caso de animales tratados con eCG, no existen diferencias en la respuesta al tratamiento en función de la estación reproductiva (93,3-94,5% de aparición de celo y ovulación). En el caso de animales tratados con GnRH, se obtienen rendimientos similares (84,2-88,9%) a los protocolos basados en eCG durante la temporada reproductiva, pero la aparición de celo se ve muy comprometida durante el anestro estacional (34,8-48,0%). Una posible explicación para esta falta de signos de celo estaría relacionada con la inducción de un pico de LH muy agudo, que en ausencia de liberación pulsátil previa de LH y la correspondiente maduración folicular terminal, no se correspondiese con una adecuada secreción de estradiol y, por tanto, con el desarrollo de los consiguientes signos de celo, como señalan estudios anteriores (Reyna *et al.*, 2007). En los mismos también se muestra que, cuando se administra GnRH en estación no reproductiva, se provoca la formación de folículos luteinizados y cuerpos lúteos de vida corta (Reyna *et al.*, 2007), lo que estaría en consonancia con los resultados en cuanto a número de animales que mostraron ovulaciones (82,6-96,0%), número medio de cuerpos lúteos (1,2-1,3) y concentraciones plasmáticas medias de progesterona (4,0-4,9 ng/mL) encontrados en el presente trabajo. El elevado porcentaje de ovejas que mostraron ovulación sin signos de celo en los grupos tratados con GnRH en esta Tesis Doctoral (entre 80-95% de los animales) podría corresponderse con la aparición de las denominadas *ovulaciones silenciosas* descritas en el periodo de transición de anestro a estación reproductiva (Thimonier & Mauleon, 1969).

En base a esta hipótesis, se pueden proponer dos soluciones para mejorar los resultados de los tratamientos con CIDR® y GnRH en estación de anestro: inducir la pulsatilidad de LH introduciendo machos con las ovejas (*efecto macho*), o

intentar prolongar el efecto de la GnRH y conseguir un pico de LH de mayor duración, modificando el preparado hormonal de GnRH administrado.

En los desarrollos experimentales de la presente Tesis Doctoral, atendiendo a esta última propuesta, se estudiaron los efectos obtenidos mediante el uso de GnRH en administración subcutánea vehiculizada en propilenglicol, un vehículo de liberación más lenta que el agua destilada utilizada habitualmente en estos tratamientos, o en forma de gel para administración vaginal, de absorción prolongada y más constante.

Los estudios con la solución de GnRH vehiculizada en propilenglicol se realizaron tanto en estación reproductiva, sobre protocolos basados en PGF_{2α}s (como modelo, con dos administraciones en un intervalo de 7 días) y progestágenos (CIDR[®] 5-7 días de tratamiento), como en estación de anestro, utilizando sólo protocolos con CIDR[®]. Los experimentos con gel intravaginal, en base a los resultados obtenidos con propilenglicol, se realizaron exclusivamente en estación no reproductiva (Tabla 8).

Tabla 8. Resumen de los estudios realizados sobre hembras multíparas en estación reproductiva y en anestro con diferentes protocolos de sincronización de celo basados en la administración de GnRH (como alternativa a la eCG), en diferentes formulaciones hormonales, por diferentes vías y en distintos tiempos después del tratamiento bien con PGF_{2α}s (PG F_{2α}) o con progestágenos (CIDR[®]).

	ESTACIÓN REPRODUCTIVA							ANESTRO					
	PG F _{2α} (7 días)			CIDR [®] (5 días)				CIDR [®] (7 días)		CIDR [®] (5 días)			
	PG F _{2α}	GnRH (32 h)		eCG	GnRH			eCG	GnRH-PPG (S/C) 36 h	eCG	GnRH (gel vaginal)		
		SS (I/M)	PPG (S/C)		SS (I/M) 56 h	PPG (S/C) 24 h	PPG (S/C) 36h				24 h	36 h	48 h
CELO (%)	100	66,7	83,3	87,5	100	18,2	80,0	100	0	100	44,4	66,6	-
												11,1*	30,0*
OVUL (%)	100	50,0	100	100	100			84,2	58,1	88,9	66,7	77,8	-
												88,9*	90,0*

* Valores alcanzados cuando no hay un grupo control tratado con eCG.

En el caso de la sincronización con prostaglandina F_{2α} durante la estación reproductiva se observó, que la respuesta estral tras la administración de eCG fue del 100%, mientras que con la administración de GnRH vehiculizada en solución

salina y propilenglicol se alcanzó el 66,7% y el 83% de animales en celo, respectivamente ($p < 0,05$). También en estación reproductiva, pero con el tratamiento basado en el uso de CIDR®, se obtuvo un 100% de ovulaciones. Sin embargo, en cuanto a la presentación del celo, aunque no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de animales con signos de celo entre el tratamiento con eCG (87,5%) y con GnRH en solución salina intramuscular (100%) o en solución de propilenglicol a las 36 h de la retirada del dispositivo (80,0%), sí se halló significancia estadística tras el tratamiento con propilenglicol administrado 24 horas después de la retirada del CIDR® (18,2%). Esto confirmaría la excesiva precocidad del tratamiento a las 24 horas y la mayor aptitud del tratamiento realizado a las 36 horas, con resultados en los grupos eCG y GnRH56 similares a los obtenidos en estudios previos (Vilariño *et al.*, 2013; Martínez-Ros *et al.*, 2018; Martínez-Ros & González-Bulnes *et al.*, 2019).

En conclusión, y considerando la utilidad de los tratamientos no sólo como inductores del celo y la ovulación, sino también como sincronizadores de los mismos, los resultados obtenidos con el preparado de GnRH en propilenglicol administrado subcutáneamente 36 h después de la retirada del CIDR® resultaron ser muy alentadores, ya que el 75% de las hembras mostraron actividad estral agrupada entre las 36 y 48 horas, y ovulación entre las 72 y 84 horas, después de retirar el dispositivo. Estos resultados pueden significar, en principio, que el uso de GnRH diluida en propilenglicol, en un esquema de inseminación artificial a tiempo fijo (IATF), es una buena alternativa al uso de eCG, si bien se precisan más trabajos de investigación para determinar el momento exacto en el cual debería realizarse la inseminación.

En los experimentos realizados durante el anestro, el 100% de las ovejas tratadas con eCG a las 36 horas de la retirada del CIDR® (mantenido 7 días), mostraron actividad estral y el 84% de ellas presentó ovulación; es decir, los resultados fueron similares a los obtenidos en estación reproductiva. Sin embargo, en el caso de ovejas tratadas subcutáneamente con GnRH vehiculizada en propilenglicol, en total oposición a los resultados obtenidos durante la estación reproductiva, ninguna de las ovejas (0%) mostró actividad estral y sólo el 58% de los animales presentó ovulación. Es decir, no se activó la maduración folicular terminal pero sí

se indujo la ovulación o luteinización de los folículos. La presencia de *ovulaciones silenciosas* se ha observado previamente (Thimonier *et al.*, 1969; Oldham & Martin, 1978; Fabre-Nys *et al.*, 2015) y es muy característica en hembras que reinician su actividad estral después del anestro estacional o la pubertad (Smith *et al.*, 2018). En nuestro caso, este hallazgo puede estar relacionado con el hecho de que la aplicación exógena de GnRH induce un pico de LH entre 1 y 4 horas después de su administración, que es capaz de estimular la ovulación y/o atresia de los folículos de mayor crecimiento presentes en el ovario en ese momento (Cavalcanti *et al.*, 2012). Por otra parte, como los niveles de estradiol durante el periodo de anestro son bajos, no estimulan la secreción de LH por parte de la hipófisis (Barrell *et al.*, 1992) y los bajos niveles de esta hormona (LH) son insuficientes para mantener las etapas finales del desarrollo folicular (Squires, 2010). A su vez, al no producirse la maduración folicular terminal, los niveles de estradiol secretados por los folículos ováricos son bajos y no alcanzan el umbral indispensable para la manifestación de signos de celo (Hashem & Sallam, 2020).

En cuanto a la incorporación de GnRH en los protocolos de sincronización con CIDR® mediante el uso de geles por vía vaginal, se llevó a cabo un primer experimento, que incluyó un grupo control de hembras tratadas con eCG y dos grupos tratados con GnRH en gel vaginal administrada a las 24 y 36 horas. El 100% de las ovejas que fueron tratadas con eCG presentaron celo, mientras que estos signos de celo se detectaron en el 66,7% de ovejas tratadas con GnRH a las 36 horas de la retirada del CIDR® y el 44,4% de las tratadas a las 24 horas. Aunque las diferencias de resultados de celo y ovulación entre los tratamientos a 24 y 36 horas no son significativas, es posible que la liberación de GnRH en el grupo al que se administró la hormona a 24 horas de la retirada del CIDR®, fuera excesivamente temprana; por ello, los porcentajes de hembras en celo (66,7%) y ovuladas (77%) en las hembras tratadas a 36 horas son mayores que las tratadas a 24 horas (44,4%).

En vista de los alentadores resultados de los experimentos realizados con administración de GnRH por vía vaginal, se realizó un segundo experimento valorando la respuesta a una administración de OvuGel® más tardía (48 horas), en comparación con un grupo tratado con GnRH a las 36 horas. Sin embargo, en este

experimento se observó una pobre respuesta al tratamiento; sólo el 11,1% de las ovejas del grupo tratado a las 36 horas y el 30% de las hembras tratadas a las 48 h de la retirada del CIDR® presentaron sintomatología de celo. La comparación de estos resultados con los obtenidos en el primer ensayo realizado con GnRH por vía vaginal, donde se obtuvo un mayor porcentaje de aparición de celos en las hembras tratadas a las 36 horas de retirada del CIDR®, sugiere que algunos de los animales en el primer ensayo pudieron presentar los denominados “celos por simpatía”, causados por estímulo feromonal (“efecto hembra”) por parte de las ovejas del grupo control (tratadas con eCG) que entraban en celo. Esta hipótesis se ve sustentada por resultados similares observados por Zarco *et al.* (1995), tras inducir actividad estral en ovejas anovulatorias mediante la convivencia con hembras en celo inducido mediante un tratamiento con progestágenos y eCG. En este sentido, las hembras de los grupos OVG-1, 24 y 36; tratadas con gel vaginal de GnRH durante el primer ensayo no mostraron actividad hasta 42 horas después de retirar el dispositivo, mientras que el grupo control (eCG) presentaba la actividad estral desde las 30 horas. Asumimos que, la falta de un grupo control positivo tratado con eCG, repercutió negativamente en la aparición de celo en las ovejas tratadas con GnRH del segundo ensayo. Resulta interesante que, independientemente del momento de aplicación de OvuGel®, de la aparición de síntomas de celo y del experimento en el que se incluyeron las hembras, los tratamientos produjeron un elevado porcentaje de ovulaciones (entre el 66,7 y el 90,0%), con una tendencia a aumentar en los tratamientos más tardíos (36 y 48 h) respecto a la retirada del CIDR®.

En conclusión, de acuerdo con los estudios realizados, determinamos que la administración de GnRH en solución salina o propilenglicol, previo a un tratamiento de progesterona, durante la estación reproductiva, puede ser una alternativa viable al uso de eCG en ovejas múltiparas, ya que sincroniza la ovulación y aporta síntomas de celo en un elevado porcentaje de las hembras tratadas. Por el contrario, su utilización, mediante administración subcutánea en solución con propilenglicol o vía vaginal en forma de gel, fuera de la estación reproductiva, muestra una pobre inducción de manifestaciones de celo, aunque se pueden alcanzar porcentajes muy elevados de ovulación. Ello permitiría adaptar este

tratamiento a inseminación a tiempo fijo y mejorar la fertilidad de las ovejas, si bien se requiere seguir esta línea de investigación, para determinar si estas ovulaciones pueden ser fértiles cuando se producen en un esquema de IATF durante el anestro estacional.

5. CONCLUSIONES GENERALES

1. La aparición de la sintomatología de celo y la ovulación se ve comprometida en hembras nulíparas tratadas con protocolos de sincronización durante el periodo de anestro estacional.
2. Los protocolos de inducción y sincronización de celos y ovulaciones para ovejas basados en la administración de progestágenos por vía intravaginal (CIDR®) más análogos de GnRH, ofrecen rendimientos similares a los tratamientos tradicionales con CIDR® más eCG cuando se aplican en estación reproductiva, pero su eficiencia se ve disminuida durante el anestro estacional.
3. Durante la estación reproductiva, los protocolos de sincronización de celo y ovulación en ovejas basados en la colocación de CIDR® en combinación con la administración de GnRH diluida en propilenglicol, pueden ser una alternativa válida y eficaz a tratamientos similares que precisan de la administración de eCG.
4. Los tratamientos basados en la administración de progestágenos seguida de GnRH no ofrecen rendimientos adecuados durante la estación no reproductiva; ni siquiera cuando la GnRH se administra en un vehículo de liberación lenta como es el propilenglicol, ya que sólo inducen un bajo porcentaje de ovulación y no estimulan la aparición del celo en las ovejas tratadas. Estos rendimientos descartan su utilización en monta natural, aunque podrían utilizarse para inseminación artificial a tiempo fijo.
5. El uso de análogos de GnRH en forma de gel vaginal, administrados tras la retirada de un CIDR® en ovejas durante la estación no reproductiva, puede ofrecer resultados similares a los obtenidos tras administración de los

mismos preparados por vía subcutánea, dependiendo del momento de administración. Mediante estos protocolos se induce la ovulación en un elevado porcentaje de hembras tratadas, pero no la aparición de signos de celo.

6. REFERENCIAS

- Abecia, J. A., Forcada, F., & González-Bulnes, A. (2012). Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Animal Reproduction Science*, 130(3-4), 173-179.
- Acritopoulou, S., Haresign, W., Foster, J. P., & Lamming, G. E. (1977). Plasma progesterone and LH concentrations in ewes after injection of an analogue of prostaglandin F-2 α . *Reproduction*, 49(2), 337-340.
- Aguilar-Martínez, C. U., Berruecos-Villalobos, J. M., Espinoza-Gutiérrez, B., Segura-Correa, J. C., Valencia-Méndez, J., & Roldán-Roldán, A. (2017). Origen, historia y situación actual de la oveja Pelibuey en México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 20(3), 429-439.
- Ahmed, M. M., Makawi, S. E., & Jubara, A. S. (1998). Synchronization of oestrus in Nubian goats. *Small Ruminant Research*, 30(2), 113-120.
- Ainsworth, L., & Wolynetz, M. S. (1982). Synchronization of estrus and reproductive performance of ewes treated with synthetic progestogens administered by subcutaneous ear implant or by intravaginal sponge pessary. *Journal of Animal Science*, 54(6), 1120-1127.
- Allen, W.R.; Stewart, F. (1993). Equine chorionic gonadotropin. In *Equine Reproduction*; McKinnon, A.O., Voss, J.L., Eds.; Lea and Febiger: Philadelphia, PA, USA.
- Andrabi, S. M. H., Anwar, M., & Mehmood, A. (2015). Efficacy of short-term estrus synchronization protocols and timed artificial insemination in subtropical goats. *Journal of Animal & Plant Sciences*, 25(1), 298-300.
- Angeles-Hernandez, J. C., Albarran-Portillo, B., Gonzalez, A. G., Salas, N. P., & Gonzalez-Ronquillo, M. (2014). Comparison of mathematical models applied to f1 dairy sheep lactations in organic farm and environmental factors affecting lactation curve parameter. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 26(8), 1119.
- Año-Perello, A., Santos-Jimenez, Z., Encinas, T., Martinez-Ros, P., & Gonzalez-Bulnes, A. (2020). Use of GnRH for synchronization of the follicular wave in assisted reproductive technologies in sheep: A preliminary study. *Animals*, 10(7), 1208.
- Arendt, J. (1998). Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. *Reviews of Reproduction*, 3, 13-22.
- Arroyo Ledezma, J., Gallegos-Sánchez, J., Villa Godoy, A., & Valencia Méndez, J. (2006). Sistemas neurales de retroalimentación durante el ciclo reproductivo anual de la oveja: una revisión. *Interciencia*, 31(1), 8-15.
- Arroyo, J. (2011). Estacionalidad reproductiva de la oveja en México. *Tropical and subtropical agroecosystems*, 14(3), 829-845.
- Ashmawy, T.A.M. (2011). Timing ovulation in ewes treated with ovsynch different times of PGF2 α injection during the breeding season. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 1(1): 23-30.

- Baril, G., Remy, B., Leboeuf, B., Beckers, J. F., & Saumande, J. (1996). Synchronization of estrus in goats: the relationship between eCG binding in plasma, time of occurrence of estrus and fertility following artificial insemination. *Theriogenology*, 45(8), 1553-1559.
- Barrell, G. K., Moenter, S. M., Cahaty, A., & Karsch, F. J. (1992). Seasonal changes of gonadotropin-releasing hormone secretion in the ewe. *Biology of reproduction*, 46(6), 1130-1135.
- Bartlewski, P. M., Baby, T. E., & Giffin, J. L. (2011). Reproductive cycles in sheep. *Animal Reproduction Science*, 124(3-4), 259-268.
- Bartlewski, P. M., Beard, A. P., Cook, S. J., Chandolia, R. K., Honaramooz, A., & Rawlings, N. C. (1999). Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. *Reproduction*, 115(1), 111-124.
- Baumgarten, S. C., & Stocco, C. (2018). Granulosa cells. *Encyclopedia of Reproduction*, Second Edition, 2018, 8-13
- Beck, N. F. G., Davies, B., & Williams, S. P. (1993). Oestrous synchronization in ewes: the effect of combining a prostaglandin analogue with a 5-day progestagen treatment. *Animal Science*, 56(2), 207-210.
- Beck, N. F. G., Jones, M., Davies, B., Peters, A. R., & Williams, S. P. (1996). Oestrus synchronization in ewes: the effect of combining a prostaglandin analogue with a GnRH agonist (buserelin). *Animal Science*, 62(1), 85-87.
- Bodin, L., Drion, P. V., Remy, B., Brice, G., Cognié, Y., & Beckers, J. F. (1997). Anti-PMSG antibody levels in sheep subjected annually to oestrus synchronisation. *Reproduction Nutrition Development*, 37(6), 651-660.
- Boland, M. P., Gordon, I., & Kelleher, D. L. (1978). The effect of treatment by prostaglandin analogue (ICI-80, 996) or progestagen (SC-9880) on ovulation and fertilization in cyclic ewes. *The Journal of Agricultural Science*, 91(3), 727-730.
- Bretzlaff, K. N., & Ott, R. S. (1983). Doses of prostaglandin F₂ α effective for induction of parturition in goats. *Theriogenology*, 19(6), 849-853.
- Bretzlaff, K. N., Hill, A., & Ott, R. S. (1983). Induction of luteolysis in goats with prostaglandin F₂ alpha. *American Journal of Veterinary Research*, 44(6), 1162-1164.
- Brunet, A. G., & Sebastian, A. L. (1991). Effect of season on plasma concentrations of prolactin and cortisol in pregnant, non-pregnant and lactating ewes. *Animal Reproduction Science*, 26(3-4), 251-268.
- Cam, M. A., & Kuran, M. (2004). Effects of a single injection of hCG or GnRH agonist on day 12 post mating on fetal growth and reproductive performance of sheep. *Animal Reproduction Science*, 80(1-2), 81-90.
- Campbell, B. K. (1999). The Modulation of Gonadotrophs Hormone Action on the Ovary by Paracrine and Autocrine Factors. *Reproduction in Domestic Animals*, 34(3-4), 147-153.
- Caraty, A., & Skinner, D. C. (1999). Progesterone priming is essential for the full expression of the positive feedback effect of estradiol in inducing the preovulatory gonadotropin-releasing hormone surge in the ewe. *Endocrinology*, 140(1), 165-170.

- Cardona Tobar, Karen Melissa, Diana Carolina López Álvarez, and Luz Ángela Álvarez Franco. (2020). "Estudios de asociación genómica en ovinos de América Latina. Revisión." *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 11.3: 859-883.
- Carías, A. A. R. (2013). Sostenibilidad y competitividad de sistemas de producción de pequeños rumiantes. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 278-283.
- Cavalcanti, A.; Brandão, F.Z.; Nogueira, L.A.G.; da Fonseca, J.F. (2012). Effects of GnRH administration on ovulation and fertility in ewes subjected to estrous synchronization. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 41, 1412-1418has.
- Chedrese, P. J. (2009). Introduction to the molecular organization of the endocrine/reproductive system. In *Reproductive Endocrinology* (pp. 3-11). Springer, Boston, MA.
- Chemineau P, Baril G, Leboeuf B, Maurel MC, Roy F, Pellicer-Rubio M, Malpoux B, Cognie, Y (1999). Implications of recent advances in reproductive physiology for reproductive management of goats. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.54, p.129-142, 1999.
- Chemineau, P. (1993). Medio ambiente y reproducción animal. *World Animal Review*, 77(1), 2-14.
- Clarke, I. J. (1988). Gonadotrophin-releasing hormone secretion (GnRH) in anoestrous ewes and the induction of GnRH surges by oestrogen. *Journal of endocrinology*, 117(3), 355-360.
- Clarke, I. J., Smith, J. T., Caraty, A., Goodman, R. L., & Lehman, M. N. (2009). Kisspeptin and seasonality in sheep. *Peptides*, 30(1), 154-163.
- Contreras-Solis, I., Vasquez, B., Diaz, T., Letelier, C., Lopez-Sebastian, A., and Gonzalez-Bulnes, A., 2009a. Efficiency of estrous synchronization in tropical sheep by combining short-interval cloprostenol-based protocols and "male effect". *Theriogenology*, 71, 1018-1025.
- Contreras-Solis, I., Vasquez, B., Diaz, T., Letelier, C., Lopez-Sebastian, A., & Gonzalez-Bulnes, A., 2009b. Ovarian and endocrine responses in tropical sheep treated with reduced doses of cloprostenol. *Animal Reproduction Science*, 114, 384-392.
- Cosentino, I. O., Brandão, F. Z., Pinto, P. H. N., Clariget, R. P., & Ungerfeld, R. (2021). Fixed timed artificial insemination and early resynchronization of ovulation in different categories of ewes in grazing system: Response of multiparous, nulliparous, and lactating ewes during the breeding season. *Livestock Science*, 247, 104461.
- Council, F. A. W. (2009). *Farm animal welfare in Great Britain: Past, present and future*. Farm Animal Welfare Council.
- Crispo, M., Meikle, M.N., Schlapp, G., & Menchaca, A. (2021). Ovarian superstimulatory response and embryo development using a new recombinant glycoprotein with eCG-like activity in mice. *Theriogenology*, 164, 31-35.
- Cuadro, F., R. Nuñez-Olivera., C. Brochado., L. Cutaia., I. Videla-Dorna., & A. Menchaca. (2022). Effect of a synthetic ecg-like glycoprotein on follicular development and ovulation in anestrous ewes. *Abstract, 19th International Congress on Animal Reproduction Bologna (Italy), 26th-30th JUNE 2022.cr*
- Cueto, M. I., Bruno-Galarraga, M. M., Fernandez, J., Fierro, S., & Gibbons, A. E. (2020). Addition of eCG to a 14 d prostaglandin treatment regimen in sheep FTAI programs. *Animal Reproduction Science*, 221, 106597.

- Dag, B., Keskin, I., & Mikailsoy, F. (2005). Application of different models to the lactation curves of unimproved Awassi ewes in Turkey. *South African Journal of Animal Science*, 35(4), 238-243.
- d'Anglemont de Tassigny, X., & Colledge, W. H. (2010). The role of kisspeptin signaling in reproduction. *Physiology*, 25(4), 207-217.
- De castro, T., Menchaca, A & Rubianes, E. (2014). Fisiología reproductiva y control de desarrollo folicular en ovejas y cabras. Instituto de reproducción animal de Uruguay.
- Decourt, C., & Beltramo, M. (2018, September). New insights on the neuroendocrine control of puberty and seasonal breeding in female sheep. In *10. International Ruminant Reproduction Symposium (IRRS)* (Vol. 15). Brazilian Coll Animal Reproduction.
- Devoto, L., Fuentes, A., Kohen, P., Céspedes, P., Palomino, A., Pommer, R., ... & Strauss III, J. F. (2009). The human corpus luteum: life cycle and function in natural cycles. *Fertility and Sterility*, 92(3), 1067-1079.
- Driancourt, M. A., Gibson, W. R., & Cahill, L. P. (1985). Follicular dynamics throughout the oestrous cycle in sheep. A review. *Reproduction Nutrition Développement*, 25(1A), 1-15.
- Duncan, W. C. (2019). *Physiology of Ovulation. How to Prepare the Egg and Embryo to Maximize IVF Success*, 1.
- Duncan, W. C., Myers, M., Dickinson, R. E., van den Driesche, S., & Fraser, H. M. (2009). Luteal development and luteolysis in the primate corpus luteum. *Animal Reproduction*, 6, 34-46.
- Estrada, A. C., Hernández, V. R., Vargas, R. G., Soto-Camargo, R., & Rojero, R. D. M. (1993). Sincronización de estro en ovejas Pelibuey con implantes nuevos y reciclados de Norgestomet. *Veterinaria. México*, 24(4), 327.
- EUROSTAD. Oficina europea de estadística (2021) <http://epp.eurostat.ec.europa.eu/tgm/table.do?tab=table&init=1&language=en&pcode=tag00017&plugin=1>
- Evans, N.P., G.E. Dahl, B.H. Glover & F.J. Karsh. 1994. Central regulation of pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion by estradiol during the period leading up to the preovulatory GnRH surge in the ewe. *Endocrinology*. 134: 1806-1811.
- Fabre-Nys, C., & Gelez, H. (2007). Sexual behavior in ewes and other domestic ruminants. *Hormones and Behavior*, 52(1), 18-25.
- Fabre-Nys, C., Kendrick, K. M., & Scaramuzzi, R. J. (2015). The “ram effect”: new insights into neural modulation of the gonadotropic axis by male odors and socio-sexual interactions. *Frontiers in Neuroscience*, 9, 111.
- FAO. (2020). Programa mundial del censo agropecuario, Programa, definiciones y conceptos. Vol.1 Disponible en: <https://www.fao.org/3/i4913s/i4913s.pdf>
- FAO. (2022). Portal lácteo; pequeños rumiantes. Disponible en: <https://www.fao.org/dairy-production-products/production/dairy-animals/small-ruminants/es/>
- FAOSTAT (2018). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistics database. Accessed Feb. 2, 2018. <http://www.fao.org/faostat/en/#data>

- Fatet, A., Pellicer-Rubio, M. T., & Leboeuf, B. (2011). Reproductive cycle of goats. *Animal Reproduction Science*, 124(3-4), 211-219.
- Fierro, S., & Olivera-Muzante, J., 2017. Long interval prostaglandins an alternative to progesterone-eCG based protocols for timed AI in sheep. *Animal Reproduction Science*, 180, 78-84.
- Fierro, S., Olivera-Muzante, J., Gil, J., & Viñoles, C. (2011). Effects of prostaglandin administration on ovarian follicular dynamics, conception, prolificacy, and fecundity in sheep. *Theriogenology*, 76(4), 630-639.
- Foster, D. L., Karsch, F. J., Olster, D. H., Ryan, K. D., & Yellon, S. M. (1986, January). Determinants of puberty in a seasonal breeder. In *Proceedings of the 1985 Laurentian Hormone Conference* (pp. 331-384). Academic Press.
- Franci, O., Pugliese, C., Acciaioli, A., Parisi, G., & Lucifero, M. (1999). Application of two models to the lactation curve of Massese ewes. *Small Ruminant Research*, 31(2), 91-96.
- García-Díaz, L. K., Mantecón, Á. R., Sepúlveda, W. S., & Maza, M. T. (2012). Producción de leche ovina como alternativa de negocio agropecuario: modelo de producción en Castilla y León (España). *Revista Mexicana de Agronegocios*, 31(1345-2016-104282), 6-18.
- García-Pintos, C., & Menchaca, A. (2017). Pregnancy establishment and maintenance after the administration of equine chorionic gonadotropin (eCG) associated or not with gonadotropin-releasing hormone (GnRH) after insemination in sheep. *Animal Production Science*, 58(10), 1802-1806.
- Geary, T. W., Downing, E. R., Bruemmer, J. E., & Whittier, J. C. (2000). Ovarian and estrous response of suckled beef cows to the select synch estrous synchronization protocol. *The Professional Animal Scientist*, 16(1), 1-5.
- Gómez-Hernández, L. E., González-Reyna, A., Zárate-Fortuna, P., Faustino-Lázaro, B., Hernández-Meléndez, J., & Martínez-González, J. C. (2022). Comportamiento pre-destete del cordero, producción y calidad de la leche en ovejas de pelo. *Ciencia Agropecuaria*, (34), 1-22.
- Gonzalez-Bulnes, A., Menchaca, A., Martin, G. B., & Martinez-Ros, P. (2020). Seventy years of progestagen treatments for management of the sheep oestrous cycle: Where we are and where we should go. *Reproduction, Fertility and Development*, 32(5), 441-452.
- González-Mendoza, D. F. (2011). Pequeños Rumiantes: Un Proyecto con Posibilidad de Rentabilidad. *Conexión Agropecuaria JDC*, 1(1), 67-74. Recuperado a partir de <https://revista.jdc.edu.co/index.php/conexagro/article/view/348>
- Goodman, R. L. (1994). Neuroendocrine control of the ovine estrous cycle. *The physiology of reproduction*, 659-710.
- Goodman, R. L., Gibson, M., Skinner, D. C., & Lehman, M. N. (2002). Neuroendocrine control of pulsatile GnRH secretion during the ovarian cycle: evidence from the ewe. *Reproduction (Cambridge, England) Supplement*, 59, 41-56.
- Gootwine, E. (2011). *Husbandry of Dairy Animals | Sheep: Reproductive Management*.
- Haenlein, G. F. W. (2001). Past, present, and future perspectives of small ruminant dairy research. *Journal of Dairy Science*, 84(9), 2097-2115.

- Hafez, E. S. E., & Hafez, B. (2000). Folliculogenesis, egg maturation, and ovulation. *Reproduction in Farm Animals*, 68-81.
- Hameed, N., Khan, M. I. U. R., Zubair, M., & Andrabi, S. M. H. (2021). Approaches of estrous synchronization in sheep: Developments during the last two decades: A review. *Tropical Animal Health and Production*, 53(5), 1-10.
- Hashem, N. M., & Gonzalez-Bulnes, A. (2020). State-of-the-art and prospective of nanotechnologies for smart reproductive management of farm animals. *Animals*, 10(5), 840.
- Hashem, N. M., & Sallam, S. M. (2020). Reproductive performance of goats treated with free gonadorelin or nanoconjugated gonadorelin at estrus. *Domestic Animal Endocrinology*, 71, 106390.
- Hashem, N. M., El-Azrak, K. M., El-Din, A. N., Taha, T. A., & Salem, M. H. (2015). Effect of GnRH treatment on ovarian activity and reproductive performance of low-prolific Rahmani ewes. *Theriogenology*, 83(2), 192-198.
- Hashem, N. M., El-Zarkouny, S. Z., Taha, T. A., & Abo-Elezz, Z. R. (2015). Oestrous response and characterization of the ovulatory wave following oestrous synchronization using PGF 2α alone or combined with GnRH in ewes. *Small Ruminant Research*, 129, 84-87.
- Hashem, N. M., González-Bulnes, A., & Rodríguez-Morales, A. J. (2020). Animal welfare and livestock supply chain sustainability under the COVID-19 outbreak: An overview. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 582528.
- Hashem, N. M., Hassanein, E. M., Hocquette, J. F., Gonzalez-Bulnes, A., Ahmed, F. A., Attia, Y. A., & Asiry, K. A. (2021). Agro-livestock farming system sustainability during the COVID-19 era: A cross-sectional study on the role of information and communication technologies. *Sustainability*, 13(12), 6521.
- Holtz, W. (2005). Recent developments in assisted reproduction in goats. *Small Ruminant Research*, 60(1-2), 95-110.
- Holtz, W., Sohnrey, B., Gerland, M., & Driancourt, M. A. (2008). Ovsynch synchronization and fixed-time insemination in goats. *Theriogenology*, 69(7), 785-792.
- Husein, M. Q., & Kridli, R. T. (2003). Effect of progesterone prior to GnRH-PGF 2α treatment on induction of oestrus and pregnancy in anoestrous Awassi ewes. *Reproduction in Domestic Animals*, 38(3), 228-232.
- Jainudeen, M., Wahid, H. and Hafez, E. (2000). Sheep and Goats. In *Reproduction in Farm Animals* (eds B. Hafez and E. Hafez). <https://doi.org/10.1002/9781119265306.ch12>
- Kareta, W., Korman, K., & Cegla, M. (2006). Ovulation level and prolificacy in ewes depending on their age, birth type and percentage of prolific genotype. *Biology of Reproduction*, 6, 73-78.
- Karsch, F. J., Bittman, E. L., Foster, D. L., Goodman, R. L., Legan, S. J., & Robinson, J. E. (1984, January). Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. In *Proceedings of the 1983 Laurentian Hormone Conference* (pp. 185-232). Academic Press.

- Kaya, M., Cenesiz, M., Ucar, O., & Yildiz, S. (2008). Determination of luteinizing hormone (LH) response to different doses of lecorelin acetate (a GnRH analogue) in Tuj ewe-lambs. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 159(7), 413-417.
- Kayaa, S., Kacara, C., Kayaa, D., & Aslanb, S. (2013). The effectiveness of supplemental administration of progesterone with GnRH, hCG and PGF2 on the fertility of Tuj sheep during the non-breeding season. *Small Ruminant Research*, 113, 365-370.
- Knox, R. V., Stewart, K. R., Flowers, W. L., Swanson, M. E., Webel, S. K., & Kraeling, R. R. (2018). Design and biological effects of a vaginally administered gel containing the GnRH agonist, triptorelin, for synchronizing ovulation in swine. *Theriogenology*, 112, 44-52.
- Kumar, P., & Sharma, A. (2014). Gonadotropin-releasing hormone analogs: Understanding advantages and limitations. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 7(3), 170.
- Leboeuf, B., Forgerit, Y., Bernelas, D., Pougard, J. L., Senty, E., & Driancourt, M. A. (2003). Efficacy of two types of vaginal sponges to control onset of oestrus, time of preovulatory LH peak and kidding rate in goats inseminated with variable numbers of spermatozoa. *Theriogenology*, 60(7), 1371-1378.
- Legan, S. J., & Karsch, F. J. (1979). Neuroendocrine regulation of the estrous cycle and seasonal breeding in the ewe. *Biology of reproduction*, 20(1), 74-85.
- Legan, S. J., l'anson, H. E. L. E. N., Fitzgerald, B. P., & Akaydin JR, M. S. (1985). Importance of short luteal phases in the endocrine mechanism controlling initiation of estrous cycles in anestrus ewes. *Endocrinology*, 117(4), 1530-1536.
- Li, Q., Roa, A., Clarke, I. J., & Smith, J. T. (2012). Seasonal variation in the gonadotropin-releasing hormone response to kisspeptin in sheep: possible kisspeptin regulation of the kisspeptin receptor. *Neuroendocrinology*, 96(3), 212-221.
- Light, J. E., Silvia, W. J., & Reid, R. C. (1994). Luteolytic effect of prostaglandin F2 α and two metabolites in ewes. *Journal of Animal Science*, 72(10), 2718-2721.
- Lone, F. A., Malik, A. A., Khatun, A., Shabir, M., & Islam, R. (2016). Returning of cyclicity in infertile Corriedale sheep with natural progesterone and GnRH based strategies. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 5(1), 67-70.
- Lopez-Alonso, C., Encinas, T., Veiga-Lopez, A., Garcia-Garcia, R. M., Cocero, M. J., Ros, J. M., ... & Gonzalez-Bulnes, A. (2005). Follicular growth, endocrine response and embryo yields in sheep superovulated with FSH after pretreatment with a single short-acting dose of GnRH antagonist. *Theriogenology*, 64(8), 1833-1843.
- Lopez-Sebastian, A., Gomez-Brunet, A., Lishman, A. W., Johnson, S. K., & Inskip, E. K. (1993). Modification by propylene glycol of ovulation rate in ewes in response to a single injection of FSH. *Reproduction*, 99(2), 437-442.
- Moscoso, M.G., L. Cutaia I., Videla Dorna., L. Alisio., M. Aviles ., & D. Moreno. (2022). Effect of 2000 iu of synthetic ecg-like glycoprotein on the follicular development and ovulation in beef cows (*Bos Taurus*). Oral communication, 19th International Congress on Animal Reproduction Bologna (Italy), 26th-30th June 2022.
- Mac Millan, K. L. (1999). Pharmacological control of the oestrous cycle to improve the reproductive performance of cattle. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 23(2), 61-64

- Malpaux, B., Thiéry, J. C., & Chemineau, P. (1999). Melatonin and the seasonal control of reproduction. *Reproduction Nutrition Development*, 39(3), 355-366.
- Malpaux, B., Viguié, C., Skinner, D. C., Thiéry, J. C., & Chemineau, P. (1997). Control of the circannual rhythm of reproduction by melatonin in the ewe. *Brain Research Bulletin*, 44(4), 431-438.
- Malpaux, B., Viguié, C., Thiéry, J. C., & Chemineau, P. (1996). Contrôle photopériodique de la reproduction. *Productions animales*, 9(1), 9-23.
- Manteca Vilanova, X., De Briyne, N., Beaver, B., & Turner, P. V. (2019). Horse welfare during equine Chorionic Gonadotropin (eCG) production. *Animals*, 9(12), 1053.
- Martemucci, G., & D'Alessandro, A. G. (2011). Synchronization of oestrus and ovulation by short time combined FGA, PGF2 α , GnRH, eCG treatments for natural service or AI fixed-time. *Animal Reproduction Science*, 123(1-2), 32-39.
- Martin G.B., & Vercoe P.E. (2017). 'Clean, green and ethical' management of small ruminants: frontiers in the 'green'. Conference: 68th Annual Meeting of the European Federation of Animal Science; page 284.
- Martin, G. B., & Kadokawa, H. (2006). "Clean, green and ethical" animal production. case study: reproductive efficiency in small ruminants. *Journal of Reproduction and Development*, 52(1), 145-152.
- Martin, G.B., Milton, J.T.B., Davidson, R.H., Banchemo Hunzicker, G.E., Lindsay, D.R., and Blache, D. (2004). Natural methods of increasing reproductive efficiency in sheep and goats. *Animal Reproduction Science*. 82-83, 231-246.
- Martinez, M. F., McLeod, B., Tattersfield, G., Smaill, B., Quirke, L. D., & Juengel, J. L. (2015). Successful induction of oestrus, ovulation and pregnancy in adult ewes and ewe lambs out of the breeding season using a GnRH+ progesterone oestrus synchronisation protocol. *Animal Reproduction Science*, 155, 28-35.
- Martinez-Ros, P., & Gonzalez-Bulnes, A. (2019). Efficiency of CIDR-based protocols including GnRH instead of eCG for estrus synchronization in sheep. *Animals*, 9(4), 146.
- Martinez-Ros, P., Lozano, M., Hernandez, F., Tirado, A., Rios-Abellan, A., López-ro, M. C., & Gonzalez-Bulnes, A. (2018). Intravaginal device-type and treatment-length for ovine estrus synchronization modify vaginal mucus and microbiota and affect fertility. *Animals*, 8(12), 226.
- Martinez-Ros, P., Rios-Abellan, A., & Gonzalez-Bulnes, A. (2018). Influence of progesterone-treatment length and eCG administration on appearance of estrous behavior, ovulatory success and fertility in sheep. *Animals*, 9(1), 9.
- Maurel, M. C., Roy, F., Hervé, V., Bertin, J., Vaiman, D., Crihiu, E., ... & Guillou, F. (2003). Réponse immunitaire à la eCG utilisée dans le traitement de l'induction d'ovulation chez la chèvre et la brebis. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, 31(9), 766-769
- Meadows, J.R. 2014. Sheep: domestication. In: Smith, C. (ed) *Encyclopedia of Global Archaeology*. Springer, New York, USA. 6596-6600.
- Menchaca, A & Rubianes, E. (2014) Sincronización de la ovulación en ovejas y cabras. Instituto de Reproducción Animal de Uruguay.

- Menchaca, A. (2021). Sustainable food production: The contribution of genome editing in livestock. *Sustainability*, 13(12), 6788.
- Menchaca, A., & Rubianes, E. (2004). New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*, 16(4), 403-413.
- Mgongo, F. O. K. (1987). Doses of prostaglandin analogue "cloprostenol" by intravulvo-submucosal (IVSM) injections effective for the induction of oestrus in goats. *Animal Reproduction Science*, 14(2), 139-146.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2020a). "CARACTERIZACIÓN DEL SECTOR OVINO Y CAPRINO DE LECHE EN ESPAÑA", Subdirección General de Producciones Ganaderas y Cinegéticas, Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/caracterizacionovinoycaprinolechedatos2020_v3_tcm30-562416.pdf
Consultado: 22 de junio de 2022
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2020b). "CARACTERIZACIÓN DEL SECTOR OVINO Y CAPRINO EN ESPAÑA: ORIENTACIÓN PRODUCTIVA CARNE", Subdirección General de Producciones Ganaderas y Cinegéticas, Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/caracterizacionovinoycaprinocarnedatos20202docx_tcm30-579776.pdf
Consultado: 22 de junio de 2022.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2020c). "EL SECTOR OVINO Y CAPRINO DE CARNE EN CIFRAS: Principales Indicadores Económicos", Subdirección General de Producciones Ganaderas y Cinegéticas, Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/caracterizacionovinoycaprinocarnedatos20202docx_tcm30-579776.pdf Consultado: 22 de junio de 2022.
- Montossi, F., Font-i-Furnols, M., Del Campo, M., San Julián, R., Brito, G., & Sañudo, C. (2013). Sustainable sheep production and consumer preference trends: Compatibilities, contradictions, and unresolved dilemmas. *Meat science*, 95(4), 772-789.
- Murphy, B. D., & Martinuk, S. D. (1991). Equine chorionic gonadotropin. *Endocrine reviews*, 12(1), 27-44.
- Nardone, A., Zervas, G., & Ronchi, B. (2004). Sustainability of small ruminant organic systems of production. *Livestock Production Science*, 90(1), 27-39.
- Nuti, L. C., Bretzlaff, K. N., Elmore, R. G., Meyers, S. A., Rugila, J. N., Brinsko, S. P., & Weston, P. G. (1992). Synchronization of estrus in dairy goats treated with prostaglandin F at various stages of the estrous cycle. *American Journal of Veterinary Research*, 53(6), 935-937.
- Ogunbiyi, P. O., Molokwu, E. C. I., & Sooriyaamoorthy, T. (1980). Estrus synchronization and controlled breeding in goats using prostaglandin F_{2α}. *Theriogenology*, 13(4), 257-261
- Oldham, C. M., & Martin, G. B. (1979). Stimulation of seasonally anovular Merino ewes by rams. II. Premature regression of ram-induced corpora lutea. *Animal Reproduction Science*, 1(4), 291-295.

- Oliveira, M. A. L., Guido, S. I., & Lima, P. F. (2001). Comparison of different protocols used to induce and synchronize estrus cycle of Saanen goats. *Small Ruminant Research*, 40(2), 149-153
- Olivera-Muzante, J., Fierro, S., López, V., & Gil, J. (2011). Comparison of prostaglandin-and progesterone-based protocols for timed artificial insemination in sheep. *Theriogenology*, 75(7), 1232-1238.
- Olivera-Muzante, J., Gil, J., Viñoles, C., & Fierro, S. (2013). Reproductive outcome with GnRH inclusion at 24 or 36 h following a prostaglandin F2 α -based protocol for timed AI in ewes. *Animal Reproduction Science*, 138(3-4), 175-179.
- Peters, A. R., Pimentel, M. G., & Lamming, G. E. (1985). Hormone responses to exogenous GnRH pulses in post-partum dairy cows. *Reproduction*, 75(2), 557-565.
- Peters, A. R., Ward, S. J., Warren, M. J., Gordon, P. J., Mann, G. E., & Webb, R. (1999). Ovarian and hormonal responses of cows to treatment with an analogue of gonadotrophin releasing hormone and prostaglandin F2 α . *Veterinary Record*, 144(13), 343-346.
- Plant, T. M. (2015). Neuroendocrine control of the onset of puberty. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 38, 73-88.
- Pollott, G. E., & Gootwine, E. (2001). A genetic analysis of complete lactation milk production in improved Awassi sheep. *Livestock Production Science*, 71(1), 37-47.
- Pool, K. R., Rickard, J. P., & de Graaf, S. P. (2020). Overcoming neuroendocrine and metabolic barriers to puberty: the role of melatonin in advancing puberty in ewe lambs. *Domestic Animal Endocrinology*, 72, 106457.
- Portolano, B., Spatafora, F., Bono, G., Margiotta, S., Todaro, M., Ortoleva, V., & Leto, G. (1997). Application of the Wood model to lactation curves of Comisana sheep. *Small Ruminant Research*, 24(1), 7-13.
- Pulina, G., Milán, M. J., Lavín, M. P., Theodoridis, A., Morin, E., Capote, J., ... & Caja, G. (2018). Invited review: Current production trends, farm structures, and economics of the dairy sheep and goat sectors. *Journal of dairy science*, 101(8), 6715-6729.
- Ramírez, A. A., Ledezma, J. A., Pérez, R. M., Bustillos, R. Z., Sierra, L. F. N., & Sevilla, H. M. (2014). Short communication: Estrus synchronization using progestogens or cloprostenol in tropical hair sheep. *Tropical Animal Health and Production*, 46(8), 1515-1518.
- Ramírez-Ramírez, A. I., Delgado-Tiburcio, G., Cruz-Espinoza, F., Corredor, A. C. H., & Gallegos-Sánchez, J. (2021). Photoperiod and its relationship to sheep reproduction. *Agro Productividad*, 14(10), 3-11.
- Ramos, A. F., & Silva, B. D. M. (2018). Hormonal protocols in small ruminants. *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Capítulo em livro científico (ALICE)*.
- Redden, R., & Thorne, J. W. (2020). Reproductive management of sheep and goats. In *Animal Agriculture* (pp. 211-230). Academic Press.ri
- Reyes-Ramirez, D. S., Osorio-Marin, Y., Hernandez-Arzola, M. P., Santiago-Perez, X., Gallegos-Sanchez, J., & Fraire-Cordero, S. (2021). Sheep reproductive management. *Agro Productividad*. <https://doi.org/10.32854/agrop.v14i8.2100>

- Reyna, J., Thomson, P. C., Evans, G., & Maxwell, W. M. C. (2007). Synchrony of Ovulation and Follicular Dynamics in Merino Ewes Treated with GnRH in the Breeding and Non-breeding Seasons. *Reproduction in Domestic Animals*, 42(4), 410-417.
- Rhodes, L., & Nathanielsz, P. W. (1988). Comparison of a controlled internal drug release device containing progesterone with intravaginal medroxyprogesterone sponges for estrus synchronization in ewes. *Theriogenology*, 30(4), 831-836.
- Risvanli, A., Demiral, O., Abay, M., Saat, N., Bekyurek, T., Kulahci, F., ... & Balci, T. A. (2010). Effect of different forms of prostaglandin F2a analogues administration on hormonal profile, prostaglandin F2a binding rate and reproductive traits in Akkaraman sheep during the breeding season. *Acta Scientiae Veterinariae*, 38(4), 391-398.
- Rivero, M. J., Lopez-Villalobos, N., Evans, A., Berndt, A., Cartmill, A., Neal, A. L., ... & Lee, M. R. (2021). Key traits for ruminant livestock across diverse production systems in the context of climate change: perspectives from a global platform of research farms. *Reproduction, Fertility and Development*, 33(2), 1-19.
- Robinson, J. J. (1974). Intensifying ewe productivity. *Proceedings of the British Society of Animal Production* (1972), 3, 31-40.
- Robinson, T. J., Moore, N. W., Lindsay, D. R., Fletcher, I. C., & Salamon, S. (1970). Fertility following synchronization of oestrus in the sheep with intravaginal sponges. I. Effects of vaginal douche, supplementary steroids, time of insemination, and numbers and dilution of spermatozoa. *Australian Journal of Agricultural Research*, 21(5), 767-781.
- Romano, J. E. (1998). Effect of two doses of cloprostenol in two schemes for estrous synchronization in Nubian goats. *Small Ruminant Research*, 28(2), 171-176
- Ronquillo, J. C., Mendoza, G., Barros, O. V. E., Hernández, J. H., Guerra, F. F., Luna, L. C., & Reyes-Contreras, J. G. (2010). Inducción y sincronización del estro en ovejas PELIBUEY primales mediante nutrición estratégica y hormonas exógenas. In XXXV Congreso de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC) (pp. 211-215). Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León.
- Rosa, H. J., & Bryant, M. J. (2003). Seasonality of reproduction in sheep. *Small Ruminant Research*, 48(3), 155-171.
- Rubianes, E., & Menchaca, A. (2003). The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats. *Animal Reproduction Science*, 78(3-4), 271-287.
- Rubianes, E., Menchaca, A., & Carbajal, B. (2003). Response of the 1-5 day-aged ovine corpus luteum to prostaglandin F2 α . *Animal Reproduction Science*, 78(1-2), 47-55.
- Russel, A. J. F., Doney, J. M., & Gunn, R. G. (1969). Subjective assessment of body fat in live sheep. *The Journal of Agricultural Science*, 72(3), 451-454.
- Santos-Jimenez, Z., Meza-Herrera, C. A., Calderon-Leyva, G., Martinez-Ros, P., Guillen-Muñoz, J. M., & Gonzalez-Bulnes, A. (2021). Efficiency of hCG for inducing resumption of ovarian cyclicity and synchronized ovulations during the seasonal anestrous in sheep. *Animals*, 11(11), 3159.
- Santos-Jimenez, Z., Guillen-Gargallo, S., Encinas, T., Berlinguer, F., Veliz-Deras, F. G., Martinez-Ros, P., & Gonzalez-Bulnes, A. (2020). Use of propylene-glycol as a cosolvent for GnRH in

- synchronization of estrus and ovulation in sheep. *Animals*, 10(5), 897. Santos-Jimenez, Z., Martinez-Herrero, C., Encinas, T., Martinez-Ros, P., & Gonzalez-Bulnes, A. (2020a) Comparative efficiency of oestrus synchronization in sheep with progesterone/eCG and progesterone/GnRH during breeding and non-breeding season. *Reproduction in Domestic Animals* 2020, 55, 882–884
- Scaramuzzi, R. J., Adams, N. R., Baird, D. T., Campbell, B. K., Downing, J. A., Findlay, J. K., ... & Tsonis, C. G. (1993). A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reproduction, Fertility and Development*, 5(5), 459–478.
- Scaramuzzi, R. J., Campbell, B. K., Downing, J. A., Kendall, N. R., Khalid, M., Muñoz-Gutiérrez, M., & Somchit, A. (2006). A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reproduction Nutrition Development*, 46(4), 339–354.
- Senger, P. L. (2004). *Pathways to pregnancy and parturition* (No. Ed. 2). Current Conceptions, Inc
- Sevi, A., Casamassima, D., Pulina, G., & Pazzona, A. (2009). Factors of welfare reduction in dairy sheep and goats. Review article. *Italian Journal of Animal Science*, 8(Suppl. 1), 81–101.
- SIAP (2020) Recuperado el 28 de julio de 2021 https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/655389/Inventario_2020_caprino.pdf https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/655390/Inventario_2020_ovino.pdf
- Simões, J., Abecia, J. A., Cannas, A., Delgado, J. A., Lacasta, D., Voigt, K., & Chemineau, P. (2021). Managing sheep and goats for sustainable high yield production. *Animal*, 100293.
- Sirjani, M. A., Shahir, M. H., Kohram, H., & Shahneh, A. Z. (2011). Effect of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) treatment on multiple births in Afshari ewes. *African journal of Biotechnology*, 10(57), 12358–12362.
- Smith, J. T., & Clarke, I. J. (2010). Seasonal breeding as a neuroendocrine model for puberty in sheep. *Molecular and cellular endocrinology*, 324(1-2), 102–109.
- Smith, M. F., Geisert, R. D., & Parrish, J. J. (2018). Reproduction in domestic ruminants during the past 50 yr: discovery to application. *Journal of Animal Science*, 96(7), 2952–2970.
- Souza, C. J., Campbell, B. K., & Baird, D. T. (1997). Follicular dynamics and ovarian steroid secretion in sheep during the follicular and early luteal phases of the estrous cycle. *Biology of reproduction*, 56(2), 483–488.
- Souza-Fabjan, J.M.G., Balaro, M.F.A., Braganca, G.M., Pinto, P.H.N., de Almeida, J.G., Moura, A.B.B., da Fonseca, J.F., & Brandao, F.Z., (2018). Use of two doses of cloprostenol in different intervals for estrus synchronization in hair sheep under tropical conditions. *Tropical Animal Health and Production*, 50, 427–432
- Squires, E. J. (2010). *Applied animal endocrinology*. Cabi.
- Sreenan, J.M., Diskin, M.G., & Dunne, L., 1996. Embryonic mortality: the major cause of reproductive wastage in cattle. In: *Proceedings of the 47th Annual Meeting of the European Association of Animal Production*. Lillhammer, August 1996.

- stilrfeld, R., & Rubianes, E. (2002). Short term primings with different progestogen intravaginal devices (MAP, FGA and CIDR) for eCG-estrous induction in anestrus ewes. *Small Ruminant Research*, 46(1), 63-66.
- Thimonier, J., Mauléon, P., Bézard, J., De Reviers, M. M., & Cornu, C. (1969). Variations saisonnières du comportement d'oestrus et des activités ovarienne et hypophysaire chez les ovins. In *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique* (Vol. 9, No. 2, pp. 233-250). EDP Sciences.
- Titi, H. H., Kridli, R. T., & Alnimer, M. A. (2010). Estrus synchronization in sheep and goats using combinations of GnRH, progestagen and prostaglandin F2 α . *Reproduction in Domestic Animals*, 45(4), 594-599.
- Toro-Mujica, P., García, A., Gómez-Castro, A. G., Acero, R., Perea, J., Rodríguez-Estévez, V., ... & Vera, R. (2011). Technical efficiency and viability of organic dairy sheep farming systems in a traditional area for sheep production in Spain. *Small Ruminant Research*, 100(2-3), 89-95.
- Twagiramungu, H., Guilbault, L. A., Proulx, J. G., & Dufour, J. J. (1994). Influence of corpus luteum and induced ovulation on ovarian follicular dynamics in postpartum cyclic cows treated with buserelin and cloprostenol. *Journal of Animal Science*, 72(7), 1796-1805.
- Twagiramungu, H., Roy, G. L., Laverdiere, G., & Dufour, J. J. (1995). Fixed-time insemination in cattle after synchronization of estrus and ovulation with GnRH and prostaglandin. *Theriogenology*, 1(43), 341.
- Tzouramani, I., Sintori, A., Lontakis, A., Karanikolas, P., Alexopoulos, G. (2011). An of the economic performance of organic dairy sheep farming in Greece. *Livestock Science*. 14:136-142.
- Umberger, S. H., Jabbar, G., & Lewis, G. S. (1994). Seasonally anovulatory ewes fail to respond to progestogen treatment in the absence of gonadotropin stimulation. *Theriogenology*, 42(8), 1329-1336.
- Ungerfeld, R., & Rubianes, E. (1999). Effectiveness of short-term progestogen primings for the induction of fertile oestrus with eCG in ewes during late seasonal anoestrus. *Animal Science*, 68(3), 349-353.
- Vallejo, D. A., Londoño, J. D., Yepes, Y. A., Tamayo, V., Mejia, A. F., & Maldonado, J. G. (2019). Pregnancy rates in hair sheep after Ovsynch synchronization and a combined intracervical fixed-time artificial insemination and 10-day mating period. *Veterinary World*, 12(11), 1779.
- Vilariño, M., Rubianes, E., & Menchaca, A. (2011). Re-use of intravaginal progesterone devices associated with the Short-term Protocol for timed artificial insemination in goats. *Theriogenology*, 75(7), 1195-1200.
- Vilariño, M., Rubianes, E., & Menchaca, A. (2013). Ovarian responses and pregnancy rate with previously used intravaginal progesterone releasing devices for fixed-time artificial insemination in sheep. *Theriogenology*, 79(1), 206-210.
- Walker, S. K., Smith, D. H., Godfrey, B., & Seamark, R. F. (1989). Time of ovulation in the South Australian Merino ewe following synchronization of estrus. 1. Variation within and between flocks. *Theriogenology*, 31(3), 545-553.

- Wayne, N.L., Malpaux, B., & Karsch, F.J., 1989. Social cues can play a role in timing onset of the breeding season of the ewe. *Journal of Reproduction & Infertility*, 87, 707-713.
- Weems, P. W., Goodman, R. L., & Lehman, M. N. (2015). Neural mechanisms controlling seasonal reproduction: principles derived from the sheep model and its comparison with hamsters. *Frontiers in neuroendocrinology*, 37, 43-51.
- Whitley, N. C., & Jackson, D. J. (2004). An update on estrus synchronization in goats: a minor species. *Journal of Animal Science*, 82(suppl_13), E270-E276.
- Wildeus, S. (2000). Current concepts in synchronization of estrus: sheep and goats. *Journal of Animal Science*, 77(E-Suppl), 1-14.
- Wiltbank, M. C., & Haughian, J. M. (2003). GnRH: de la fisiología a la "Sincología". In V Simposio de Reproducción Animal. IRAC. Córdoba, Argentina.
- Yadav, V., Chandolia, R. K., Dutt, R., Bisla, A., Saini, G., Singh, G., & Ranga, L. C. (2020). Effect of ovsynch estrus synchronization protocol on fertility in crossbred ewes. *Journal of Animal Research*, 10(4), 543-549.
- Zarco, L., Rodríguez, E. F., Angulo, M. R. B., & Valencia, J. (1995). Female to female stimulation of ovarian activity in the ewe. *Animal Reproduction Science*, 39(4), 251-258.
- Zeder, M. A. (2008). Domestication and early agriculture in the Mediterranean Basin: Origins, diffusion, and impact. *Proceedings of the national Academy of Sciences*, 105(33), 11597-11604.

7. ANEXO 1. Otros trabajos científicos relacionados con la tesis doctoral

Artículos en revistas científicas indexadas

1. Año-Perello, A., **Santos-Jimenez, Z.**, Encinas, T., Martinez-Ros, P., & Gonzalez-Bulnes, A. (2020). Use of gnrh for synchronization of the follicular wave in assisted reproductive technologies in sheep: A preliminary study. *Animals*, 10(7), 1208.
2. **Santos-Jimenez, Z.**, Meza-Herrera, C. A., Calderon-Leyva, G., Martinez-Ros, P., Guillen-Muñoz, J. M., & Gonzalez-Bulnes, A. (2021). Efficiency of hCG for inducing resumption of ovarian cyclicity and synchronized ovulations during the seasonal anestrous in sheep. *Animals*, 11(11), 3159.

Comunicaciones a Congresos Científicos

1. **Z. Santos-Jimenez.**, P. Martinez-Ros., J.M. Guillen-Muñoz., A. González-Bulnes. Efficiency of CIDR-based protocols including gnrh in propylene-glycol for estrus synchronization in sheep. 19th International Congress on Animal Reproduction. Bolonia, Italia.
2. J.M. Guillen-Muñoz., **Z. Santos-Jimenez.**, P. Martinez-Ros., A. González-Bulnes. (2022). Induction of cyclity in sheep using a protocol based on CIDR plus hCG. 19th International Congress on Animal Reproduction. Bolonia, Italia.
3. P. Martinez-Ros., **Z. Santos-Jimenez.**, A. González-Bulnes. (2022). Oestrus behaviour and ovulatory response after administration of prostaglandins combined with gnrh in sheep. 19th International Congress on Animal Reproduction. Bolonia, Italia.

