Universidad Nacional
Facultad de Ciencias de la Salud
Escuela de Medicina Veterinaria

Determinación de la eficacia farmacológica y los efectos secundarios de una esponja intravaginal de fabricación casera elaborada con acetato de medroxiprogesterona para la sincronización del estro en ovinos de pelo

Modalidad:
Proyecto de Graduación

Trabajo Final de Graduación

Silvia González Navarro

Tutor:
Dr. Carlos Luna Tortós

Lectores:
Dra. Laura Castro Ramírez
Dr. Leonel Navarro Rojas

TRIBUNAL EXAMINADOR

Antonieta Corrales Araya

Decana _____

Laura Bouza Mora

Subdirectora _____

Carlos Luna Tortós

Tutor_____

Laura Castro Ramírez

Lector_____

Leonel Navarro Rojas

Lector_____

Fecha: _____

DEDICATORIA

“Por ser mi apoyo, consuelo, fortaleza e inspiración.
Dedico este trabajo a Marco y a Emma,
a mis padres y hermanos.
Los amo”.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecerle a Dios por permitirme estudiar la carrera de mis sueños, ayudarme en todo el proceso y darme las fuerzas necesarias para terminar. Agradezco a mi familia, a mi esposo Marco y a Emma por el apoyo y la ayuda que me ha brindado durante este proceso y ser el motor que me impulsa todos los días. Papi, Mami, Elías y Lucy, gracias por darme ese empujón extra cuando más lo necesitaba. No lo hubiera logrado sin ustedes.

Al Dr. Carlos Luna Tortós por todos los conocimientos compartidos, el tiempo invertido, la guía y ayuda en la realización de este proyecto de graduación. Al Dr. Leonel Navarro y la Dra. Laura Castro por todos los aportes dados al trabajo.

A Lilliana Campos, muchas gracias por toda la ayuda que siempre me brindó en el trabajo realizado en el laboratorio de Farmacología.

A la Dra. Laura Bouza y el personal del Laboratorio de Análisis Clínicos, al Dr. Elías Barquero y los colaboradores del Laboratorio de Bacteriología, al Dr. Jorge Chacón del Laboratorio de Andrología, la Dra. Marcela Suárez y la Dra. Natalia Soto por los aportes, ayuda con los diferentes procedimientos de laboratorio y facilitación de equipo necesario para realizar el proyecto.

Al Dr. Daniel Carballo por facilitarnos el uso de equipo fundamental para realizar la evaluación de los machos. ¡Muchas gracias por haber confiado en nosotros!

A Don Froylán Naranjo, Dr. Rafael Molina, Don Javier Escalante, José Segura, Carlos Rojas y Natalie Corrales muchísimas gracias por permitirme utilizar sus hatos para realizar el proyecto. Fueron una pieza vital para lograr realizar este trabajo.

A Cris, Nati, Andrés y Esteban por todas las horas de trabajo, sueño, aprendizaje y disfrute que llevaron los 6 años de estudio juntos. ¡Gracias por ser parte de mi familia! Tienen un lugar especial en mi corazón.

Y gracias a todas aquellas personas que, de una u otra manera, formaron parte de mi crecimiento como Médico Veterinario y trabajo realizado en este proyecto.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA …….. **ii**
AGRADECIMIENTOS …….. **iii**
ÍNDICE CONTENIDOS …….. **iv**
ÍNDICE DE FIGURAS ……... **vi**
ÍNDICE DE CUADROS ……. **vii**
ÍNDICE DE ABREVIATURAS …….. **viii**
RESUMEN ……... **ix**
ABSTRACT ……. **x**
1. INTRODUCCIÓN …….. **1**
1.1. Antecedentes ……. **1**
1.2. Justificación …….. **9**
1.3. Objetivos …… **10**
1.3.1. *General* …… **10**
1.3.2. *Específicos* ……... **10**
2. METODOLOGÍA ……..……. **11**
2.1. Animales y Manejo …… **11**
2.1.1. *Hembras* …….. **12**
2.1.1.1. *Determinación de la ciclicidad* ……... **13**
2.1.2. *Machos* ……. **14**
2.2. Preparación de esponjas ……... **16**
2.3. Sincronización del estro ……..……. **17**
2.4. IA y monta natural ……..…….. **19**
2.5. Determinación de la eficacia farmacológica …… **20**
2.6. Determinación de los efectos secundarios ……... **20**
2.6.1 *Determinación de la respuesta inflamatoria* ……..……. **20**
2.6.2. *Cultivo vaginal* ……..…… **21**
2.7. Análisis estadístico ……. **22**
3. RESULTADOS ……. **23**
3.1. Animales y manejo …… **23**
3.1.1. *Hembras* …….. **23**
3.1.2. *Machos* ……. **24**
3.2. Primera Fase ……. **27**
3.2.1. *Determinación de la ciclicidad* …….. **27**
3.2.2. *Elaboración de esponjas* ……. **29**
3.2.3. *Sincronización del estro* …… **29**
3.2.4. *Determinación de la eficacia farmacológica* ……. **29**
3.2.5. *Determinación de los efectos secundarios* …… **31**
3.2.5.1. *Determinación de la respuesta inflamatoria* ……. **31**

3.2.5.2. *Cultivo vaginal*…….. 35
3.3. Segunda Fase ……..……..... 36
4. DISCUSIÓN …….. 39
5. CONCLUSIONES …… 48
6. RECOMENDACIONES …….. 49
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS ……... 51
ANEXOS ……... 59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Hormonas reguladoras del ciclo estral ……... 3
Figura 2. Hembras utilizadas por finca ……. 13
Figura 3. Tinción de citologías vaginales …….. 14
Figura 4. Evaluación de los órganos reproductores del macho ……. 15
Figura 5. Elaboración de esponjas intravaginales ……. 16
Figura 6. Primer protocolo de sincronización del estro …… 17
Figura 7. Colocación correcta de la esponja …….. 18
Figura 8. Segundo protocolo de sincronización del estro …… 18
Figura 9. Retracción del cérvix e inseminación artificial ……..... 19
Figura 10. Vaginoscopía ……. 21
Figura 11. Razones de descarte de las hembras …… 23
Figura 12. Histograma de la CC de las hembras ……... 24
Figura 13. Defectos espermáticos observados …….. 26
Figura 14. Citologías vaginales ……. 28
Figura 15. Duración del estro …… 30
Figura 16. Conteo de segmentados en Finca A ……. 31
Figura 17. Conteo de segmentados en Finca B ……. 32
Figura 18. Resultados de la inspección vaginal …… 34
Figura 19. Frotis del hisopado vaginal …….. 35
Figura 20. Conteo de UFC en Finca B …….. 36
Figura 21. Comparación de los resultados de preñez …… 37
Figura 22. Preñez temprana ……... 38
Figura 23. Cotiledones o placentomas …….. 38
Figura 24. Hallazgos observados en el diagnóstico ecográfico **...**…….. 60
Figura 25. Mucómetra …….. 61
Figura 26. Corte transversal del cuerno uterino …… 61
Figura 27. Corte longitudinal del cuerno uterino …….. 62
Figura 28. Endometrio de una hembra vacía en estro ……... 62

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Fincas utilizadas y animales evaluados …… 11

Cuadro 2. Parámetros de los carneros evaluados …….. 25

Cuadro 3. Resultados de la evaluación microscópica del semen …….. 25

Cuadro 4. Relación de las concentraciones de P_4, E_2 y células vaginales ……... 27

Cuadro 5. Resultados de la medición de fibrinógeno ……... 33

Cuadro 6. Parámetros de inflamación e infección …… 33

Cuadro 7. Porcentaje de preñez de cada finca ……. 37

Cuadro 8. Detalle de los hallazgos ecográficos ……... 60

Cuadro 9. Hemograma Finca A ……. 65

Cuadro 10. Hemograma Finca B …….…… 65

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

FSH: Hormona folículo estimulante

LH: Hormona luteinizante

GnRH: Hormona secretora de las gonadotropinas

eCG: Gonadotropina coriónica equina

$PGF_{2\alpha}$: Prostaglandina $F_{2\alpha}$

UI: Unidades internacionales

MAP: Acetato de medroxiprogesterona

IA: Inseminación artificial

CC: Condición corporal

CL: Cuerpo lúteo

P_4: Progesterona

E_2: Estrógenos

ID: Identificación

UFC: Unidades formadoras de colonias

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue determinar la eficacia farmacológica y los efectos secundarios de una esponja de fabricación casera elaborada con acetato de medroxiprogestrona en la sincronización del estro en ovinos de pelo. Fue realizado entre agosto del 2011 y julio del 2014. Se incluyeron un total de 78 hembras adultas, multíparas y ciclando. En la primera etapa se utilizaron 18 animales y el objetivo fue analizar la eficacia y los efectos secundarios de la esponja de elaboración casera. En la segunda etapa se utilizaron 60 hembras divididas en dos grupos (G): (1) esponja de elaboración casera (n-30), (2) esponja comercial (n-30). El fin de esta etapa fue comparar la tasa de sincronización de celos y el porcentaje de preñez aplicando una esponja casera y una comercial y utilizando monta natural posteriormente. La esponja de fabricación casera se impregnó con 60 mg de acetato de medroxiprogesterona y se colocó durante 12 días. El día que se extrajo se administró 200 UI de gonadotropina coriónica equina y cinco miligramos de dinoprost trometamin. Con la esponja comercial se siguió el mismo protocolo. En la primera etapa dos hembras perdieron el dispositivo, ninguna de las hembras presentó celo durante el tratamiento y el 100% presentaron celo luego de retirada la esponja. Todas las hembras presentaron vaginitis leve luego de retirada la esponja caracterizada por enrojecimiento e irritación de la mucosa vaginal y secreción purulenta. Tres hembras presentaron adherencias. Se realizó un hemograma completo y medición de los niveles de fibrinógeno el día cero y 12 del tratamiento. Se observó una diminución de los conteos de leucocitos con respecto al primer hemograma y dos hembras presentaron mediciones de fibrinógeno indicativas de un proceso inflamatorio. En la segunda etapa no se presentó pérdida del dispositivo intravaginal ni celos durante los 12 días del tratamiento. Se obtuvo un 100% de sincronización y presentación del estro 48 horas después de extraída la esponja en ambos grupos. La preñez se diagnosticó por medio de ultrasonido transrectal a los 35 días post monta. Del grupo 1 se preñaron 24 hembras (80%), mientras que del grupo 2 se preñaron 23 hembras (76%). Basado en los resultados de este trabajo, la esponja intravaginal de fabricación casera es efectiva para la sincronización del estro en ovinos de pelo y la obtención de altas tasas de preñez.

ABSTRACT

The purpose of this study was to determine the pharmaceutical efficiency and the secondary effects of a homemade sponge fabricated with medroxyprogesterone acetate for estrous synchronization in hair ewes. It was realized during August, 2011 and July, 2014. A total of 78 adult cycling multiparous ewes were included. In the first phase, 18 animals were used, and the objective was to analyze the efficiency and the secondary effects of the homemade sponge. In the second phase, 60 females were used and distributed in two groups (G): (1) homemade sponge (n-30), (2) commercial sponge (n-30). The goal of this phase was to compare the estrus synchronization rate and the percentage of pregnancy between the use of the homemade sponge and the commercial sponge combined with natural mating. The homemade sponge was impregnated with 60 mg of medroxyprogesterone acetate, and was placed for a period of 12 days. The day that it was removed, 200 UI of equine chorionic gonadotrophin and five milligrams of dinoprost tromethamine were administered. The same method was used with the commercial sponge. During the first phase, two females lost the device, none showed heat while undergoing treatment, and 100% showed estrous signs after the device withdrawal. All females developed mild vaginitis, characterized by a reddened, irritation of the vaginal mucosa and purulent discharge after the extraction of the sponge. Three females presented adhesions. A complete blood count (CBC) and a level of fibrinogen measurement were performed on days cero and 12 of the treatment. There was a leukocyte count reduction in regard to the first CBC, and two females showed fibrinogen levels indicative of an inflammatory process. In the second phase, there was no loss of the intravaginal device, none of the animals showed estrous signs during the 12 days treatment. A 100% of the ewes were synchronized and showed estrous 48 hours after the sponge removal in both groups. Pregnancy was diagnosed with a transrectal ultrasound 35 days post mating. The pregnancy rate in the group 1 was, 24 females (80%), while in group 2, 23 females (76%). Based on these results we conclude that the homemade intravaginal sponge is effective for estrus synchronization and high pregnancy rates in hairy sheep in Costa Rica.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

Ciclo estral

Las ovejas alcanzan la pubertad aproximadamente entre los seis y nueve meses de edad, cuando logran entre el 60 y el 75% del peso adulto. Las hembras son poliéstricas estacionales y presentan un ciclo estral cada 16 a 17 días (Evans y Maxwell, 1990; Pineda y Dooley, 2003; Squires, 2003).

El ciclo estral se divide en cinco fases de acuerdo con la actividad cíclica del ovario. El proestro es el periodo de crecimiento folicular que inicia con la regresión del cuerpo lúteo y culmina con la aparición del estro. Tiene una duración de dos a tres días y se caracteriza por un rápido crecimiento folicular y la secreción de estrógenos bajo la estimulación de las gonadotropinas de la hipófisis. Las ovejas no muestran signos durante el proestro; sin embargo, al acercarse el estro la vulva se inflama, el vestíbulo se vuelve hiperémico y las glándulas del cérvix y la vagina producen una secreción serosa o mucosa que se observa como una descarga vaginal (Pineda y Dooley, 2003).

El estro es el periodo de receptividad sexual, durante el cual la secreción de estrógenos y el tamaño de los folículos alcanzan sus niveles máximos (Evans y Maxwell, 1990). En las ovejas, el estro dura en promedio 26 horas, con un rango de 20-36 horas. La ovulación es espontánea y se da al final del estro (Pineda y Dooley, 2003). El estro es difícil de detectar en la oveja solo basándose en cambios de comportamiento (Pineda y Dooley, 2003). La oveja se muestra más inquieta, agita fuerte y frecuente la cola y se presenta un frotamiento continuo con el macho (Evans y Maxwell, 1990).

El metaestro es el periodo de transición entre la ovulación y el desarrollo completo del cuerpo lúteo. El ovario cambia la secreción de estrógenos por progesterona (Pineda y Dooley, 2003).

Durante el diestro el cuerpo lúteo se desarrolla completamente y los órganos reproductivos se encuentran bajo la influencia dominante de la progesterona. En la oveja, la fase luteal dura de 12 a 14 días y es la fase dominante del ciclo estral. Al final del diestro, si la hembra no se encuentra preñada, el cuerpo lúteo regresa bajo la influencia de las prostaglandinas y se inicia un nuevo ciclo estral (Pineda y Dooley, 2003).

En ausencia de preñez, las hembras sexualmente maduras se mantienen en una serie continua de ciclos reproductivos, en los que un grupo de folículos maduran, la hembra se vuelve receptiva a la monta, se da la ovulación del folículo dominante y la formación del cuerpo lúteo. Si no se da la fertilización e implantación del embrión, se da la regresión del cuerpo lúteo y el ciclo se repite (Squires, 2003).

El anestro es el periodo en el que las hembras no presentan signos de estro. En las zonas templadas las ovejas presentan estacionalidad reproductiva, siendo el fotoperiodo el regulador más importante, iniciando el periodo reproductivo cuando los días son más cortos. Durante el anestro la hipófisis se encuentra relativamente inactiva y secreta muy pocas gonadotropinas, por lo que no hay estímulo para el crecimiento folicular y la hembra no presenta estro ni ovula. Al inicio de la estación reproductiva la oveja presenta un primer celo silente (Evans y Maxwell, 1990; Pineda y Dooley, 2003).

Cambios hormonales durante el ciclo estral

El cuerpo lúteo es la fuente principal de progesterona. Los niveles sanguíneos se mantienen bajos durante el estro y los tres primeros días del diestro. A partir del día 3, los niveles de progesterona aumentan rápidamente hasta alcanzar el máximo al día 8 y se mantienen elevados hasta el día 11 ó 12. Si la oveja no se encuentra preñada los niveles de progesterona descienden el día 13, debido a la regresión luteal inducido por la prostaglandina endometrial. Si la hembra se encuentra preñada, se suprime la producción de prostaglandina y el cuerpo lúteo permanece activo (Evans y Maxwell, 1990; Pineda y Dooley, 2003; Squires, 2003).

La progesterona ejerce un efecto de bloqueo en la liberación de las gonadotropinas hipofisarias. El crecimiento folicular se encuentra bajo el control de las gonadotropinas liberadas por la hipófisis, la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH). La FSH estimula el crecimiento temprano de los folículos y la LH es necesaria para completar las últimas fases del crecimiento. Además, las gonadotropinas estimulan la secreción de estrógenos por parte de los folículos, por lo que su nivel sanguíneo se mantiene bajo la mayor parte de la fase luteal del ciclo estral (Evans y Maxwell, 1990; Pineda y Dooley, 2003; Squires, 2003).

Mientras los niveles de progesterona disminuyen al final del diestro, los niveles de estrógenos en sangre periférica aumentan rápidamente. El pico de estrógenos se da aproximadamente en el día 16 del ciclo. Este aumento en los estrógenos dispara el pico de LH en la hipófisis. La LH es secretada por la hipófisis de manera pulsátil aproximadamente cada 3,2 horas en la mayor parte del diestro. Los pulsos tienen una baja magnitud, por lo que la LH presenta niveles basales hasta el pico preovulatorio, el cual ocurre dentro de las primeras 10 horas de iniciado el estro. Durante el proestro y el estro, la frecuencia de los pulsos de secreción de LH aumenta a intervalos de uno cada hora. La secreción pulsátil de LH es seguida por un aumento significante en los niveles de estradiol, que va a producir los cambios en los órganos reproductores y el comportamiento característico del estro (Evans y Maxwell, 1990; Pineda y Dooley, 2003; Squires, 2003). Las variaciones hormonales durante el ciclo estral se resumen en la Figura 1.

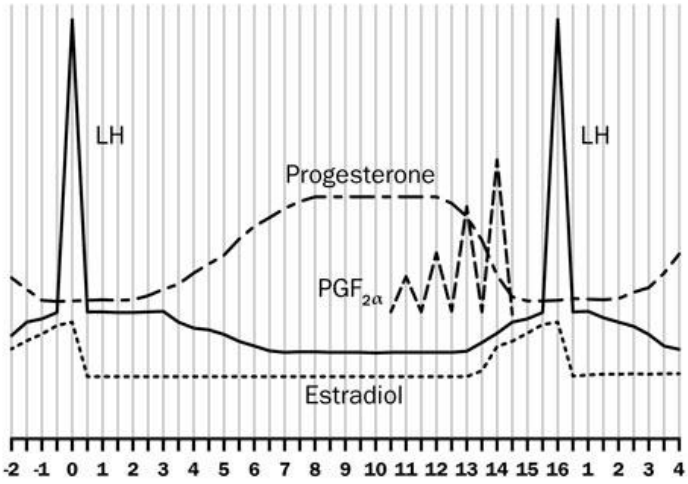

Figura 1. Principales hormonas reguladoras del ciclo estral (Kennedy, D., 2012)

Sincronización del estro

El ciclo reproductivo puede ser manipulado para el mejoramiento de la eficiencia reproductiva. La sincronización del estro involucra la manipulación del ciclo ovárico con el fin de llevar a cabo la monta en un momento determinado (Squires, 2003).

En una hembra ciclando, se puede inducir la luteólisis, mientras que el estro y la ovulación se pueden inducir o regular y se puede aumentar el número de folículos para la ovulación. En una hembra que no se encuentra ciclando, se puede inducir el inicio de los ciclos reproductivos, como por ejemplo, al terminar el anestro estacional o inducir la pubertad. La hembra preñada puede ser tratada para mantener la preñez o para terminar esta (Squires, 2003).

A diferencia de las razas ovinas originarias y criadas en las zonas templadas, las cuales se caracterizan por presentar estacionalidad reproductiva, las ovejas explotadas en el trópico ciclan y son capaces de concebir durante todos los meses del año, registrándose un aumento de la parición en las épocas de mayor disponibilidad de forraje (Martínez-Tinajero et al., 2007). Sin embargo, en ocasiones se deben utilizar técnicas que permitan inducir el celo en casos de anestro estacional, o bien, se requiere programar los celos y los partos durante el año según los objetivos de mejoramiento genético y de productividad del hato.

Los tratamientos hormonales basados en progestágenos y gonadotropinas para el control del estro y la ovulación permiten inducir y sincronizar el estro en hembras en anestro y sincronizar el estro en hembras ciclando (Uribe-Velásquez et al., 2008). Estos métodos permiten calendarizar las épocas de empadre, las gestaciones y las pariciones (Espinoza et al., 2003), con el fin de programar la disponibilidad comercial de los productos primarios de carne y leche (Martins et al., 2010), de manera que se organice la producción para que se disponga de corderos durante todo el año y se incremente la misma en las épocas de mayor demanda.

La sincronización del celo permite utilizar tanto la monta controlada con machos mejorados, como la inseminación artificial (Santos et al., 2010). Esta última es la base de las tecnologías disponibles para la mejora genética (Naim et al., 2009). En las regiones tropicales es difícil la importación de machos de alto valor genético, debido a las regulaciones sanitarias, o bien, a la inadaptabilidad de los animales al trópico. El uso de la inseminación artificial permite introducir material genético que promueva la mejora genética de la población local, lo que mejora la calidad y cantidad de la producción de carne o leche (Godfrey et al., 1999).

Además, la sincronización de las hembras, tanto donadoras como receptoras, es vital en la técnica de superovulación y trasplante de embriones.

Existen diversos protocolos que permiten sincronizar el celo en ovejas. Estos se dividen en naturales y hormonales. Los métodos naturales se basan en el "efecto macho", el cual consiste en el aislamiento de las hembras en anestro y posterior introducción del macho. Como consecuencia, en la hembra se produce aumento en la secreción de la hormona luteinizante y un subsecuente celo silente. Cuando el cuerpo lúteo regresa, se presenta un nuevo celo de 17-19 días después de la introducción del macho, que es apto para la reproducción de la hembra (Ungerfeld et al., 2003; Hernández-Olivos, 2010).

Los métodos hormonales se han utilizado con un grado de éxito variable. Esta variabilidad depende de factores como la edad, raza, latitud en la que viven los animales, peso, condición corporal y el estado fisiológico (Godfrey et al., 1999; Catalano et al., 2007). Un gran número de preparaciones hormonales se encuentran disponibles para la manipulación de la fertilidad, como análogos de la Hormona Estimulante de las Gonadotropinas (GnRH), la Gonadotropina Coriónica Equina (eCG), progestágenos sintéticos, estrógenos y prostaglandinas (Squires, 2003).

Prostaglandina $F_{2\alpha}$

La prostaglandina ($PGF_{2\alpha}$) es un agente luteolítico producido por el endometrio, siendo secretado al final del diestro y al final de la gestación. La $PGF_{2\alpha}$ resulta en una disminución en la progesterona circulante al producir la regresión del cuerpo lúteo y disminuir la producción de progesterona placentaria. La $PGF_{2\alpha}$ actúa activando la ruta del inositol trifosfato-calcio (IP_3-Ca^{2+})-proteinkinasa C, mediante la activación del receptor acoplado a la proteína G, ruta que conduce al decremento en la esteroidogénesis y a la luteólisis. Existen diversos análogos sintéticos que son ampliamente usados para sincronizar el estro, para inducir el aborto y el parto (Riviere y Papich, 2009).

La $PGF_{2\alpha}$ ha sido utilizada por su acción luteolítica (Squires, 2003). Al administrarse a la mitad o final de la fase luteal, se puede inducir la regresión del cuerpo lúteo, eliminándose la producción de progesterona, por lo que la hipófisis aumenta la liberación de gonadotropinas, que estimulan el crecimiento folicular y el estro se manifiesta a los dos a tres

días. Es importante tener presente que el cuerpo lúteo solo responde a la prostaglandina entre los días 4 y 15 del ciclo estral, por lo que es necesaria la aplicación de dos inyecciones con un intervalo de ocho días para la sincronización completa de un rebaño (Evans y Maxwell, 1990; Noakes et al., 2001).

El protocolo Synchrovine™ consiste en la inyección de dos dosis de $PGF_{2\alpha}$ separadas de seis a ocho días, inseminando de 42 a 48 horas después de la segunda aplicación (Menchaca y Rubianes, 2004; Olivera et al., 2007; Olivera-Muzante et al., 2011). También se han establecido protocolos utilizando prostaglandinas en combinación con progesterona y sus análogos (Godfrey et al., 1999; Martínez-Tinajero et al., 2007; Uribe-Velásquez et al., 2008).

Los protocolos basados en prostaglandinas sólo son efectivos en hembras que presentan un cuerpo lúteo, por lo que son ineficientes si estas no están ciclando (Martemucci y D´Alessandro, 2011).

Progestágenos

La progesterona (P_4) es una hormona esteroidea cuyo mecanismo de acción involucra la unión al receptor esteroideo intracelular, que controla la mayoría de las funciones biológicas de los esteroides. Estos receptores se encuentran ubicados dentro de la célula, en el núcleo o citoplasma. Las hormonas esteroideas difunden fácilmente a través de la membrana celular e interactúan con receptores intracelulares en el citoplasma, que interactúan directa y específicamente con sitios en el ADN y actúa como un factor de transcripción para activar o inhibir la transcripción del gen cercano. El ARN mensajero que se genera se traduce en una proteína específica que provoca un cambio en el metabolismo u otra función de la célula. Los efectos de las hormonas esteroideas generalmente toman de horas a días por lo complejo de su cascada de señales (Riviere y Papich, 2009).

La progesterona y sus derivados han sido utilizados de manera extensa en la mayoría de los animales domésticos como método de control del ciclo estral, especialmente en la sincronización del mismo. En general, la progesterona exógena actúa de la misma manera que el cuerpo lúteo, produciendo una retroalimentación negativa durante el ciclo estral suprimiendo la secreción de FSH y LH, el estro y la ovulación. Al suprimir el tratamiento con los progestágenos, la hipófisis incrementa la liberación de gonadotropinas, estimulando el

crecimiento y la subsecuente ovulación de los folículos. La progesterona natural tiene una absorción baja por vía oral y una vida corta en plasma, aproximadamente 20 minutos, por lo que se han desarrollado derivados sintéticos. En ovejas, se utilizan dispositivos intravaginales impregnados con acetato de medroxiprogesterona o con acetato de fluorogestona y dispositivos impregnados con progesterona natural como el Controlled Internal Drug Release (CIDR) (Evans y Maxwell, 1990; Brander et al, 1991; Godfrey et al., 1999; Noakes et al, 2001; Squires, 2003; Martínez-Tinajero et al., 2007; Uribe-Velásquez et al., 2008; Riviere y Papich, 2009).

Con la utilización de progestágenos se reporta una baja fertilidad de los celos inducidos (Evans y Maxwell, 1990; Noakes et al, 2001; Araya, 2007; Martins et al., 2010). Por lo tanto, es ideal la utilización de combinaciones hormonales en los protocolos de sincronización para mejorar resultados, especialmente en las épocas en las que la fertilidad se encuentra disminuida (Zarwaki, 2001; Barrett et al., 2004; Dogan y Nur, 2006; Martínez-Tinajero et al., 2007; Martins et al., 2010).

Gonadotropina Coriónica Equina y Hormona Liberadora de las Gonadotropinas

La GnRH es un decapéptido liberado por el hipotálamo responsable de estimular la liberación de las gonadotropinas, la FSH y la LH. La GnRH tiene una secreción pulsátil y una vida media muy corta (dos a cuatro minutos). Las gonadotropinas y los esteroides gonadales regulan la producción de GnRH al producir una retroalimentación negativa. Actúa al activar el receptor de GnRH que es un receptor metabotrópico acoplado a la proteína G, activando la ruta del IP_3-Ca^{2+} (Riviere y Papich, 2009).

La gonadorelina es una preparación sintética de GnRH que estimula la síntesis y secreción de FSH y LH al interactuar con los receptores de la GnRH en la hipófisis. En medicina veterinaria es utilizada para inducir la ovulación en vacas y yeguas, inducir el estro en perras y gatas con anestro prolongado y en el tratamiento de quistes ováricos en ganado de leche. También, asociada con prostaglandinas, se ha utilizado para la sincronización del estro (Riviere y Papich, 2009).

La eCG es una glicoproteína que tiene efectos biológicos de larga duración. Tiene efecto principalmente tipo FSH, aunque también un poco como LH y es utilizada para la inducción del estro y la superovulación (Squires, 2003; Riviere y Papich, 2009). Los usos

clínicos de la eCG se concentran en la estimulación del crecimiento folicular y la ovulación al combinarlo con progesterona y sus análogos, y la inducción del ciclo estral en cerdas jóvenes (Brander et al, 1991; Catalano et al., 2007; Martínez-Tinajero et al., 2007; Riviere y Papich, 2009). La eCG asociada al dispositivo intravaginal estimula la ovulación en la estación reproductiva y fuera de esta (Uribe-Velásquez et al., 2008). La dosis de eCG debe ser adecuada a cada sistema ya que, si es muy baja, no produce efecto alguno, pero en dosis elevadas produce partos múltiples que afecta el peso de los corderos (Catalano et al., 2007).

Olivera- Munzante y colaboradores (2011) compararon los resultados reproductivos del protocolo de sincronización basado en prostaglandinas Synchrovine® y un grupo control sincronizado con un protocolo tradicional basado en progestágenos más eCG para la inseminación artificial a tiempo fijo. Se utilizaron en total 1297 ovejas Merino australianas, 322 sincronizadas con esponjas intravaginales impregnadas con 60 mg de medroxiprogesterona más 300 UI de eCG y 975 sincronizadas con el protocolo Synchrovine®. Los autores observaron que sin importar el tiempo en que se realice la inseminación artificial ni la ruta por la cual se insemina, los animales sincronizados con el protocolo Synchrovine® tuvieron tasas más bajas en los parámetros reproductivos que los sincronizados con el protocolo tradicional (Olivera-Muzante et al., 2011). De igual manera, Silva y colaboradores (2010) realizaron un trabajo comparando el protocolo tradicional (esponjas intravaginales impregnadas con acetato de medroxiprogesterona + eCG) con un protocolo basado en la aplicación de dos dosis de PGF2α separados por nueve días y observaron que la tasas de sincronización de estros y la preñez fue similar en ambos grupos. Sin embargo, el protocolo tradicional presenta la ventaja de que aumenta los niveles de P_4 en sangre, obteniendo resultados ligeramente superiores. Además, este se puede utilizar en hembras en anestro mientras que el protocolo basado en prostaglandinas no (Martemucci y D´Alessamdro, 2011).

1.2. Justificación

En Costa Rica la producción ovina se encuentra en una etapa inicial. Sin embargo, el sector ovino-caprino ha ido en crecimiento en los últimos años y cuenta con aproximadamente 2000 productores y un hato estimado de 26.941 hembras y 8.859 machos. La mayor parte de la producción se ubica en la provincia de Alajuela con 9165 animales y Guanacaste con 8228 animales (INEC. VI Censo Nacional Agropecuario, 2010). Ante la creciente demanda de productos ovinos, el principal reto de este sector es mejorar la calidad de la carne mejorando las razas cárnicas y de esta manera consolidarse en el mercado nacional (Fernández, 2007).

La falta de genética y tecnologías de mejora de la misma han limitado el desarrollo del sector ovino. Además, el desconocimiento en el tema de protocolos de sincronización por parte de los productores y los veterinarios ha generado que las casas comerciales no dispongan de productos, como los dispositivos intravaginales, para su uso en la sincronización de celos en pequeños rumiantes. Ante esta situación, los ovinocultores interesados en implementar programas de mejora genética se han visto obligados a importar productos no registrados en el país, lo que incrementa los costos de los programas y genera desinterés por parte del gremio productor.

Ante la situación nacional con respecto a la disponibilidad de hormonas para los programas de sincronización de celos en ovinos, se plantea utilizar hormonas registradas en el país para fabricar dispositivos (esponjas) intravaginales que el médico veterinario pueda elaborar en condiciones de campo. Para su elaboración este proyecto plantea utilizar progestágenos previamente reportados en la literatura, específicamente, el acetato de medroxiprogesterona (MAP) (Robinson et al., 1968; Fukui et al., 1987; Fukui et al., 1999; Simonetti et al., 2000; Zarwaki et al., 2001; Espinoza et al., 2003; Ungerfeld et al., 2003; Barret et al., 2004; Wulster-Radcliffe et al., 2004; Catalano et al., 2005; Dogan y Nur, 2006; Catalano et al., 2007; Martínez-Tinajero et al., 2007; Hernández-Olivos, 2010; Santos et al., 2010). Esto implica el uso de fármacos extra etiqueta, incluyendo medicamentos registrados por el Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA), en una especie animal y por una vía y dosificación distintas a las aprobadas.

A nivel nacional se ha observado un interés creciente en la ovinocultura y en el consumo de carne de cordero. Sin embargo, sin la implementación de programas de mejora

genética, el desarrollo de los productos derivados de este sistema se va a ver limitado, ya que el hato nacional no presenta características que permitan contar con un producto competitivo.

En Costa Rica, el SENASA actualmente permite la importación de embriones de Nueva Zelanda y Australia y semen ovino de Australia. Sin embargo, para implementar el uso de la inseminación artificial e implantación de embriones es fundamental la utilización de protocolos de sincronización de celos e inducción de la ovulación adaptados a nuestras condiciones (Santos et al., 2010) y con esto, lograr mejorar la genética del hato nacional, los parámetros productivos y reproductivos, así mejorar la rentabilidad de la producción ovina en el país.

1.3. Objetivos

1.3.1. General

Determinar la eficacia farmacológica y los efectos secundarios de las esponjas de fabricación casera elaboradas con acetato de medroxiprogesterona en la sincronización del estro en ovinos de pelo en diversas explotaciones en Costa Rica.

1.3.2. Específicos

1.3.2.1. Fabricar una esponja casera elaborada con acetato de medroxiprogesterona para su uso intravaginal en ovejas de pelo.

1.3.2.2. Determinar la eficacia farmacológica del dispositivo intravaginal de fabricación casera dentro de un protocolo estándar de sincronización del estro en ovinos de pelo.

1.3.2.3. Determinar los efectos secundarios, locales y sistémicos, generados en el animal al utilizar el dispositivo intravaginal de elaboración casera.

1.3.2.4. Comparar la eficacia de la esponja intravaginal casera contra un dispositivo comercial empleando un mismo protocolo de sincronización de celos.

2. METODOLOGÍA

El proyecto se realizó en dos fases entre Agosto del 2011 y Julio del 2014. El objetivo de la Primera Fase fue analizar la eficacia y los efectos secundarios de la esponja intravaginal casera para la sincronización del celo. La Segunda Fase se realizó con el fin de comparar la tasa de sincronización de celos y el porcentaje de preñez utilizando la esponja intravaginal casera y un dispositivo intravaginal comercial.

2.1. Animales y manejo

Los animales a utilizar se seleccionaron luego de analizar seis fincas diferentes ubicadas en diversas zonas del territorio nacional. Se revisaron un total de 387 hembras adultas como posibles candidatas para el proceso de sincronización del estro. Se seleccionaron 84 hembras con las condiciones necesarias para incluirlas en el proyecto.

Cuadro 1. Localización de fincas utilizadas y animales evaluados por finca.

Finca	Ubicación Geográfica	Hembras Revisadas	Machos evaluados
Finca A	San Pedro de Pérez Zeledón	75	2
Finca B	Aguas Zarcas de San Carlos	39	2
Finca C	Ciudad Colón	32	2
Finca D	El Carmen de Guadalupe	6	0
Finca E	Aguas Zarcas de San Carlos	125	2
Finca F	Las Nubes de Coronado	110	5

2.1.1. Hembras

Las hembras seleccionadas para utilizar en las dos fases del proyecto fueron ovejas de pelo, cruces de diversas razas, ya que en el país no se cuenta con animales puros. Además, cumplían con los siguientes requisitos de inclusión:

- Condición corporal entre 2,5 y 3,5, en una escala de 1 a 5 (Thompson y Meyer, 1994; Scott, 2007).
- No presentaban preñez. Para lo cual se realizaron dos diagnósticos ecográficos por animal con un intervalo de 15 días entre ambos. Se utilizó el equipo Aloka SSD-500 con un transductor lineal de 5 MHz. Se implementó el método ecográfico transrectal siguiendo las indicaciones mencionadas por Bidinost et al. (2001).
- Se incluyeron hembras de al menos un parto, por lo que se descartó cualquier animal nulíparo (Espinoza et al., 2003; Ungerfeld et al., 2003).
- No debieron presentar anormalidades uterinas como piómetras, mucómetras y, en caso de presentarse, la hembra fue eliminada del estudio.

Con respecto a la alimentación, estas se encontraban en pastoreo y se les suministraba concentrado diario y sales minerales. Además, el programa de desparasitación se manejaba al día.

La primera fase se realizó en las fincas A (n=9) y B (n=9) con un total de 18 hembras. En esta fase se evaluó la efectividad de las esponjas caseras para sincronizar celos y los efectos secundarios locales y sistémicos producidos por las mismas, lo que se detallará más adelante.

En la segunda fase, se utilizaron las fincas C (n=8), D (n=6), E (n=13) y F (n=39) y se realizó una comparación en la efectividad de sincronización de celo y las tasas de preñez, entre la utilización de las esponjas caseras y esponjas comerciales, lo que se describirá más adelante

El total de hembras revisadas y seleccionadas por finca se muestra en la siguiente figura.

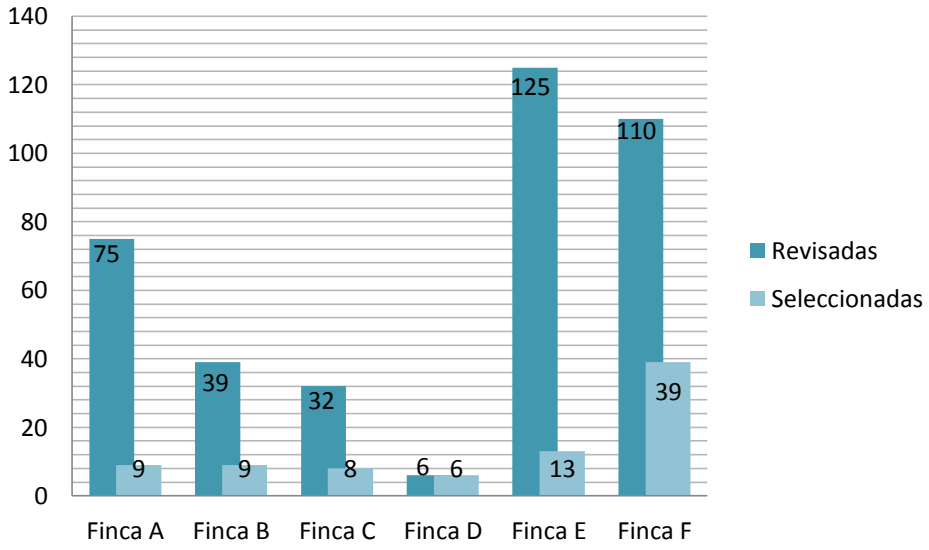

Figura 2. Hembras utilizadas por finca.

2.1.1.1. Determinación de la ciclicidad

En la primera fase del proyecto se determinó la ciclicidad de las hembras a utilizar. Para esto, se realizaron citologías vaginales y mediciones de P_4. La muestra de citología fue tomada por hisopado vaginal, el cual se realizó siguiendo la técnica mencionada por López-Crispín (2010), con la diferencia que el hisopo no fue impregnado con solución salina. Una vez tomado el hisopado, la muestra se extendió por rodamiento en un portaobjetos, debidamente rotulado y se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente, como se muestra en la Figura 3, las células se fijaron colocándoles etanol al 90% y fueron teñidas con la tinción de Hema 3® (Fisher Scientific Company L.L.C, USA) para ser observadas al microscopio (Nikon E200, Japón), a una magnificación de 10X. La clasificación celular de las citologías vaginales se realizó tomando como base la utilizada por López-Crispín (2010), en la que incluye las células basales, intermedias, superficiales y escamosas anucleadas. Sin embargo, esta fue modificada para incluir las células parabasales y las células diestrales o "foam". Se realizó un conteo diferencial con la clasificación anterior de las células hasta llegar a 100 células. También, se hizo un conteo de polimorfonucleados en 10 campos del microscopio a una magnificación de 10X.

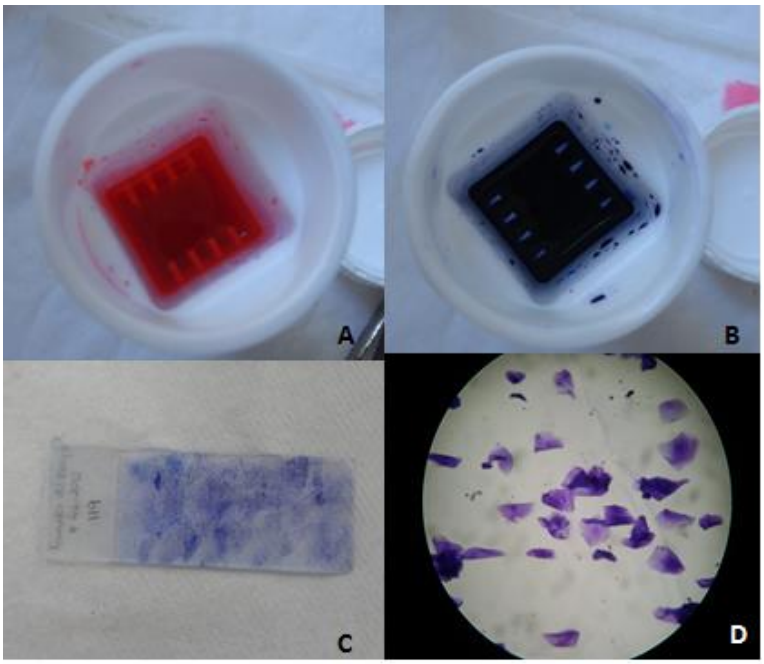

Figura 3. Tinción de citologías vaginales. (A) Solución 1, (B) Solución 2, (C) Lámina teñida, (D) Vista en microscopio magnificación 10X

Para realizar las mediciones hormonales se utilizó la técnica de quimioluminiscencia con un equipo AIA 360 (TOSOH BIOSCIENCE®). Se usó como muestra el suero obtenido de una muestra sanguínea tomada de la vena yugular. La muestra se colocó en un tubo sin anticoagulante y se dejó reposar por lo menos 45 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 2000 revoluciones por minuto durante 10 minutos y el suero separado se colocó en un tubo tipo Eppendorf debidamente identificado. El suero se preservó a -20ºC hasta su procesamiento (Barret et al., 2004; Hernández-Olivos, 2010).

2.1.2. Machos

Los machos se seleccionaron luego de realizarles un examen andrológico completo. El examen incluyó una evaluación física general, de los órganos reproductivos y del semen (Penzzanite et al., [s.f.]; Bagley, 1997; McNeal, 1998).

Las características que debieron cumplir para ser catalogados como candidatos para el proyecto fueron las siguientes:

- Buen libido.

- Condición corporal entre 3 y 3,5 en una escala de 1 al 5 (Penzzanite et al., [s.f.]; Scott, 2007).
- No presentar ninguna lesión en miembros ni mala conformación, maloclusión o algún defecto que pueda interferir en el proceso de reproducción (Penzzanite et al., [s.f.]; Bagley, 1997; McNeal, 1998).
- Los órganos reproductivos se debían palpar de manera normal, tener movilidad y no presentar inflamación, dolor o lesiones. La circunferencia escrotal debía ser la ideal de acuerdo con la edad, como se muestra en la Figura 4 (Penzzanite et al., [s.f].
- El semen debía presentar una motilidad progresiva mayor al 30% y presentar más del 70% de los espermatozoides con morfología normal (Penzzanite et al., [s.f.]; Bagley, 1997).

Figura 4. Evaluación de los órganos reproductores del macho.

La extracción del semen para la evaluación del mismo se realizó por medio de electroeyaculación. La motilidad y el vigor se evaluaron al momento de la toma de la muestra. Una gota del semen se colocó en un portaobjetos y cubrió con un cubreobjetos para observarla al microscopio (Nikon E200, Japón) a una magnificación de 10X. También se tomó una muestra para realizar el conteo de espermatozoides y determinar la concentración del mismo. Adicionalmente, se tomaron 15µL del semen y se preservaron en formaldehido al 37% para

evaluar su morfología en el Laboratorio de Andrología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional, Costa Rica.

2.2. Preparación de las esponjas

Las esponjas intravaginales caseras se prepararon con espuma de poliuretano del número 20 (20 Kg/m^3) y fueron cortadas en forma cilíndrica con un diámetro de cuatro centímetros y una altura de cuatro centímetros. Además, se les introdujo un hilo de algodón para extraerlas (Fukui et al., 1987; Espinoza et al., 2003). Las esponjas se impregnaron con 60 mg de MAP (Laboratorios Afford, obtenidos de Laboratorios Calox, Costa Rica) (Fukui et al., 1999; Zarwaki, 2001; Ungerfeld et al., 2003; Barrett et al., 2004; Catalano et al., 2005; Catalano et al., 2007; Santos et al., 2010).

Como se muestra en la Figura 5, previo a la impregnación de la hormona, las esponjas se desinfectaron por inmersión en etanol al 90%, se exprimieron para eliminar los excesos y se dejaron secar en la cámara de flujo laminar. Una vez secas, se les impregnó la superficie de la esponja con la dosis indicada de MAP diluida en un mililitro de etanol al 90% (Robinson et al., 1968). Posteriormente, se secaron en una cámara de flujo laminar con protección de la luz solar. Las esponjas se empacaron en papel aluminio nuevo y en bolsas con cierre hermético, con el fin de proteger la sustancia de la luz solar y del aire ambiental.

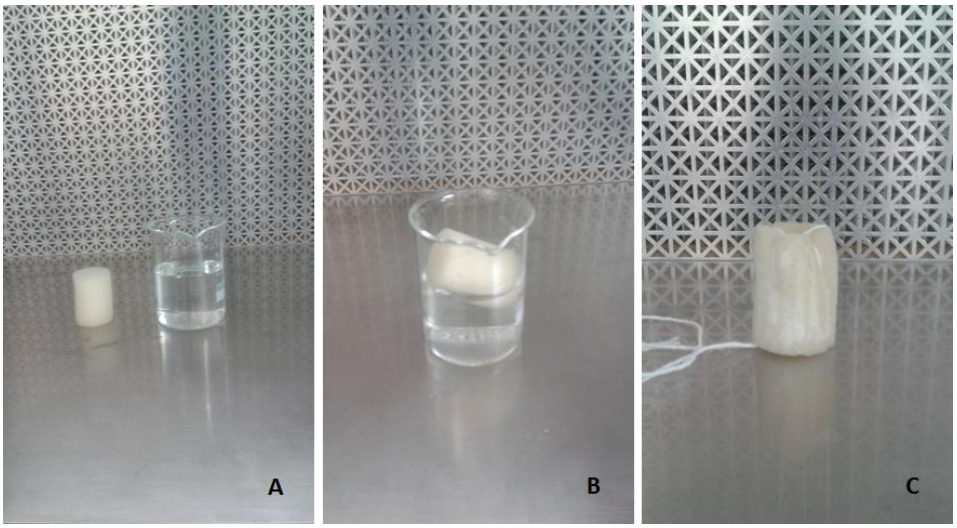

Figura 5. Elaboración de esponjas intravaginales. Desinfección (A y B) y secado (C) de la esponja casera.

2.3. Sincronización del estro

En la Finca A (primera fase del proyecto) se utilizó el protocolo descrito en la Figura 6. Las esponjas intravaginales se colocaron en las hembras seleccionadas, como se indica en la Figura 7 y permanecieron durante 12 días (Fukui et al., 1999; Barrett et al., 2004; Catalano et al., 2005; Martínez-Tinajero et al., 2007).

El día que se extrajeron las esponjas, a cada hembra se le colocó 330 IU de eCG (FOLLIGON®, Intervet Internacional, Holanda) y 15 mg de dinoprost trometamina (Lutalyse®, Lab.Pharmacia & Lepjohn Inc, USA obtenido de Lab. Pfizer, Centroamérica), ambas por vía intramuscular. El día de la inseminación artificial a tiempo fijo se aplicó 0,05 mg de Gonadorelina (6-D-Phe) por vía intramuscular (Gonavet Veyx®, Lab Bayer).

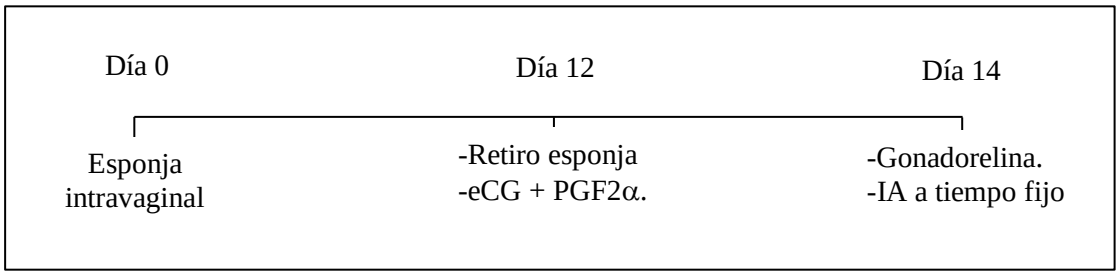

Figura 6: Protocolos de sincronización de celo
eCG: Gonadotropina Coriónica Equina
PGF2α: Prostaglandina F2α (Dinoprost trometamina)
IA: Inseminación artificial

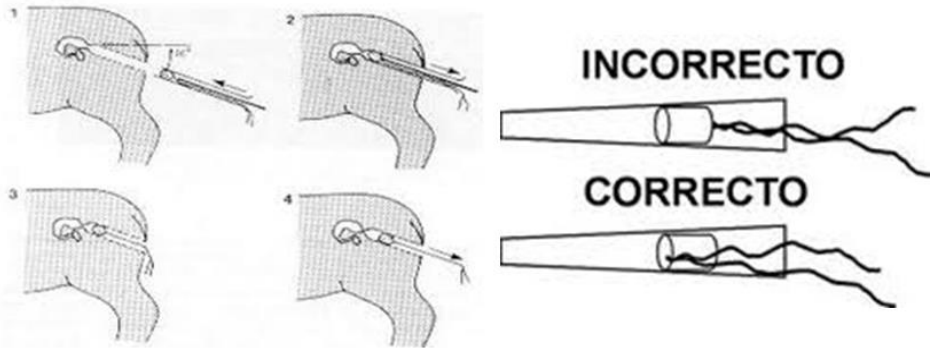

Figura 7. Colocación correcta de la esponja intravaginal (Gibbons y Cueto, 2004; Boggio, 2005)

En la Finca B y en la segunda fase del proyecto se decidió replantear el protocolo de sincronización disminuyendo la dosis de eCG y eliminando la gonadorelina. Por lo tanto, en las Finca B, C, D, E y F se utilizó el protocolo resumido en la Figura 8. Las esponjas intravaginales permanecieron durante 12 días en las hembras y el día que se retiraron se administró 200 UI de eCG (FOLLIGON®, Intervet Internacional, Holanda) y cinco miligramos de dinoprost trometamina (Lutalyse®, Lab.Pharmacia & Lepjohn Inc, USA obtenido de Lab. Pfizer, Centroamérica) por vía intramuscular.

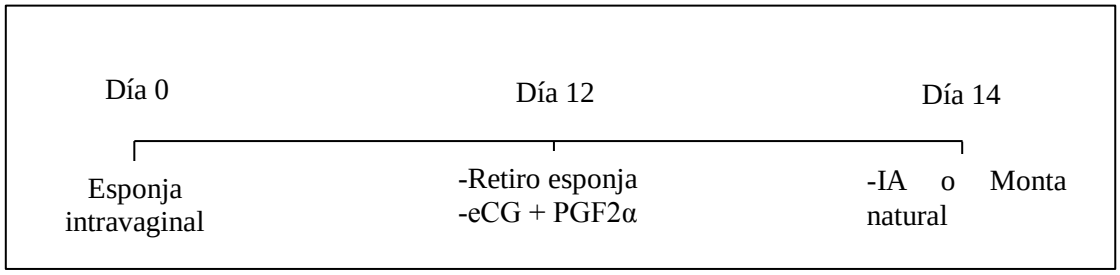

Figura 8. Segundo protocolo de sincronización de celo
eCG: Gonadotropina Coriónica Equina
PGF2α: Prostaglandina F2α (Dinoprost trometamina)
IA: Inseminación artificial

En la segunda etapa del proyecto las hembras fueron divididas al azar en dos grupos. El Grupo 1 (n=30) fue sincronizado con la esponja casera y el Grupo 2 (n=30) con la esponja comercial impregnada con 60 mg de MAP (Progespon®, Laboratorios Syntex, Argentina).

En la primera fase del proyecto se realizó inseminación artificial a tiempo fijo, mientras que en la segunda fase se utilizó monta natural.

2.4. Inseminación artificial y monta natural

La IA a tiempo fijo realizada en la primera fase del proyecto, se efectuó a las 48 horas post-retiro del dispositivo intravaginal y se utilizó semen fresco diluido. El semen se recolectó por medio de electroeyaculación y se preparó con el diluyente AndroMed® (Minitüb GmbH, Alemania), de manera que cada dosis tuviese una concentración mínima de 150 x 10^6 espermatozoides (Santos et al., 2010). La técnica de inseminación utilizada en la primera finca fue la transcervical y, como se muestra en la Figura 9, se utilizó una pinza Aliss para anclarla al orificio externo del cérvix y retraerlo con el fin de alinear el lumen cervical y disminuir las obstrucciones hacia el lumen del útero (Wulster-Radcliffe et al., 2004).

Figura 9. Retracción del cérvix (A, B) e IA (C,D)

En la segunda fase se utilizó monta natural con el fin de disminuir las variantes introducidas por este método que pudiesen afectar la preñez. Los machos se introdujeron una

vez iniciado el estro y se mantuvieron mínimo dos días con las hembras. Se padrearon máximo 10 ovejas por macho.

2.5. Determinación de la eficacia farmacológica

La eficacia farmacológica se evaluó al observar la ausencia del estro durante el tratamiento con el MAP, así como la presentación y sincronización del estro al retirar la esponja y el lapso de duración del estro.

Una vez finalizado el protocolo de sincronización, la detección del celo se realizó cada 12 horas durante 96 horas (Zarwaki, 2001; Catalano et al., 2007). De acuerdo con los datos obtenidos se estableció el porcentaje de hembras sincronizadas y la duración del estro, tomando como dato el intervalo entre inicio y finalización del estro en cada hembra.

Como dato adicional se determinó el porcentaje de preñez, tomando en cuenta que el porcentaje de preñez no se relaciona directamente con la eficacia farmacológica, ya que este puede ser alterado por las condiciones propias del manejo del semen y el tiempo y método de la inseminación artificial (Fukui et al., 1999), pero sí es un dato que permite comparar entre ambos preparados farmacéuticos hormonales. El diagnóstico de preñez se realizó de 30 a 40 días después de la IA por medio de ultrasonido (Bidinost et al., 2001; Santos et al., 2006). La técnica utilizada fue la transrectal con un transductor lineal de 5 MHz empleando un equipo Aloka® modelo SSD-500.

2.6. Determinación de los efectos secundarios

2.6.1. Determinación de la respuesta inflamatoria

Con el fin de establecer la respuesta inflamatoria producida por el dispositivo intravaginal se realizó un leucograma y medición del fibrinógeno el día que se colocó la esponja intravaginal y el día que se retiró. Además, se realizó la inspección vaginal clínica y el conteo de polimorfonucleados en la citología antes de la colocación de la esponja y el día del retiro de la misma.

La muestra sanguínea se tomó de la vena yugular y se colocó en un tubo con EDTA como anticoagulante. La muestra se transportó en una hielera al Laboratorio de Análisis

Clínicos de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional para realizar los procedimientos respectivos.

Para realizar el conteo de polimorfonucleados se utilizó como muestra un hisopado vaginal siguiendo la técnica de tinción anteriormente mencionada. En el Laboratorio de Fertilización in-vitro de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional se contó 10 campos microscópicos seleccionados al azar con una magnificación de 10X.

Al realizar la inspección vaginal clínica se observó la eventual presencia de alteraciones en la mucosa como enrojecimiento, irritación y presencia de úlceras. El procedimiento se realizó introduciendo en la vagina un espéculo estéril, lubricado, posterior a la desinfección de los labios vulvares con etanol al 70%, como se muestra en la Figura 10.

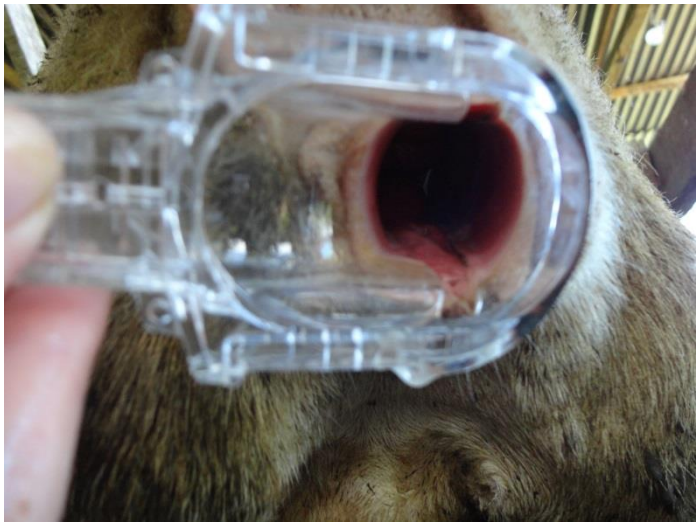

Figura 10. Vaginoscopía posterior a la extracción del dispositivo intravaginal

2.6.2. Cultivo vaginal

Para analizar los cambios en la flora vaginal producidos por la presencia de las esponjas caseras se realizó un cultivo vaginal para determinar un aumento en coliformes, especialmente en *E. coli*, tomando una muestra antes de colocar la esponja y una al momento de retirarla. La muestra se tomó directamente de la vagina, introduciendo un hisopo estéril impregnado con solución salina estéril, posterior a la desinfección de los labios vulvares con

alcohol al 70%. La muestra se mantuvo a 4ºC hasta que fue procesada en el Laboratorio de Bacteriología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional.

2.7. Análisis estadísticos

Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA., USA). Para los datos obtenidos en la primera etapa del proyecto se realizó estadística descriptiva.

Con los datos obtenidos de la segunda etapa se compararon los grupos tratados utilizando la prueba de chi-cuadrado para muestras no pareadas. Las variables a analizar serán el número de hembras en celo y el número de hembras preñadas.

Las variables de presencia o ausencia de adherencias y presencia o ausencia de lesiones locales fueron analizadas por una tabla de contingencia utilizando la prueba de Fisher.

Las diferencias en cuanto a los parámetros conteo de segmentados en sangre antes y después del uso de la esponja fue analizada mediante la prueba t-Student para muestras pareadas. La diferencia en animales con fibrinógeno aumentado (>600 mg/dL) y la presencia de *E.coli* en los hisopados vaginales antes y después del uso de la esponja fueron analizadas mediante la prueba exacta de Fisher.

Se estableció un valor α de 0,05 y el intervalo de confidencialidad de un 95%.

3. RESULTADOS

3.1. Animales y manejo

3.1.1. Hembras

Se revisaron en total 387 hembras en seis diferentes fincas para ser incluidas tanto en la primera como en la segunda fase. Del total de hembras analizadas se utilizaron 84, descartándose del proyecto 303 hembras. Las hembras se descartaron por baja o alta condición corporal, patologías reproductivas, por encontrarse en periodo de lactancia, ser nulíparas o estar preñadas y otras razones, por ejemplo, por no encontrarse en el hato al momento de iniciar el protocolo de sincronización. En el Anexo 1 se pueden observar diversas imágenes de lo observado en las ecografías. Las razones de descarte se resumen en la Figura 11.

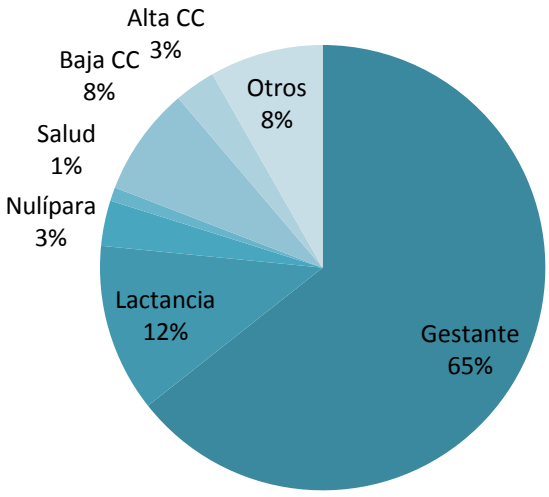

Figura 11. Razones de descarte de las hembras

La media de la condición corporal (CC) de las hembras revisadas fue 2,5 (donde 1 es emaciada y 5 obesa), con una desviación estándar de 0,65 unidades. La CC máxima fue de 5 y la mínima de 1. La distribución de la condición corporal se muestra en la Figura 12.

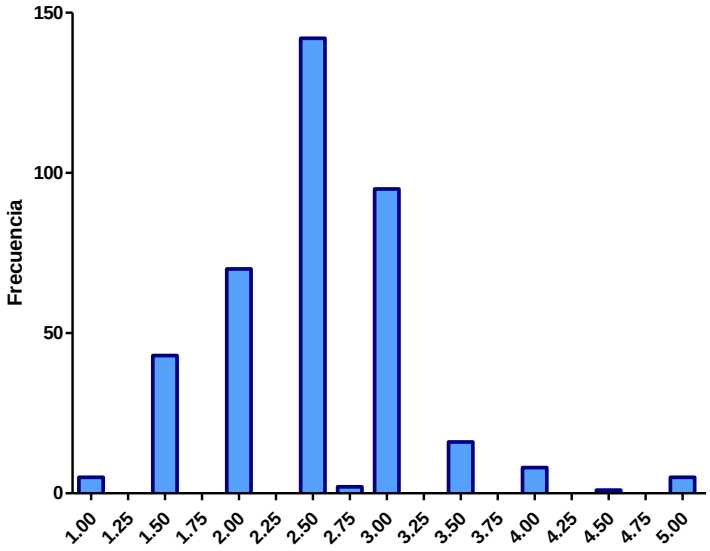

Figura 12. Histograma de la CC de las hembras revisadas

3.1.2. Machos

Para realizar la monta o inseminación artificial posterior a la sincronización del estro se les realizó el examen andrológico a los carneros. Se revisaron en total 13 machos, de los cuales se utilizaron ocho.

Al realizar el examen físico general todos los animales presentaron un estado de salud satisfactorio y sin condiciones de conformación indeseables. El promedio de condición corporal fue de 3 (escala de 1 al 5, en el que 1 es caquéctico y 5 obeso), con un mínimo de 2,5 y un máximo de 4,5. Los machos tenían una edad promedio de 16,1 meses, siendo la edad mínima de cinco meses y la máxima de 30 meses.

Al efectuar la evaluación reproductiva se determinó que, a la palpación, ningún animal presentaba anormalidades en el epidídimo. Al observar el pene los carneros presentaron una estructura normal y la ausencia de lesiones. Los testículos de todos los machos analizados eran simétricos, móviles, de una consistencia normal y no presentaban dolor. El detalle de los parámetros obtenidos se detalla en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Parámetros de los carneros evaluados.

ID	Finca	Edad (meses)	Circunferencia testicular (cm)	Forma del testículo
Barack	A	9	30	Ovoide
Tétano	A	16	34	Ovoide
Dorper	B	12	31	Ovoide
Katahdin	B	18	33	Ovoide
#50	C	24	27	Ovoide
#60	C	8	21	Ovoide
Brutus	E	5	26	Ovoide
Cohia	E	5	25,5	Alargado
#425	F	30	35,5	Ovoide
#2714	F	6	26	Alargado
#74	F	30	39	Redondo
#300	F	30	38	Ovoide
#100	F	18	31	Ovoide

La muestra de semen se tomó por medio de electroeyaculación y 12 eyaculados presentaban características normales de color y olor. Sin embargo, en la muestra del número 100 se observaron grumos en el eyaculado, por lo que se descartó del programa. Los datos de la evaluación microscópica del semen se resumen en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Resultados de la evaluación microscópica del semen.

ID	Volumen del eyaculado (mL)	Motilidad del eyaculado (%)	Vigor del eyaculado	Concentración espermática	Clasificación
Barack	0,5	95	4	840×10^6	Insatisfactorio$^+$
Tétano	1	95	4	7232×10^6	Satisfactorio
Dorper	0,8	100	5	8845×10^6	Satisfactorio*
Kathadin	1	95	5	15282×10^6	Satisfactorio
#50	2	95	4	35100×10^6	Satisfactorio
#60	0,8	90	4	31530×10^6	Insatisfactorio$^+$
Brutus	0,8	90	4	1710×10^6	Insatisfactorio$^+$
Cohia	1	100	5	10585×10^6	Satisfactorio
#425	0,5	95	4	11145×10^6	Satisfactorio
#2714	0,3	98	5	37145×10^6	Satisfactorio
#74	2	100	5	29010×10^6	Satisfactorio
#300	1	95	5	46370×10^6	Satisfactorio

*: descartado del estudio por preferencia del propietario
$^+$: descartado del estudio por problemas reproductivos

Se le realizó una evaluación morfológica a 12 de las muestras de semen colectadas. De estas, 11 presentaron más del 70% de los espermatozoides normales, con un promedio de 91,3% con morfología normal. En la muestra restante el 70% de los espermatozoides presentaron características normales. Los defectos observados y frecuencia en la que se presentaron se muestran en la Figura 13.

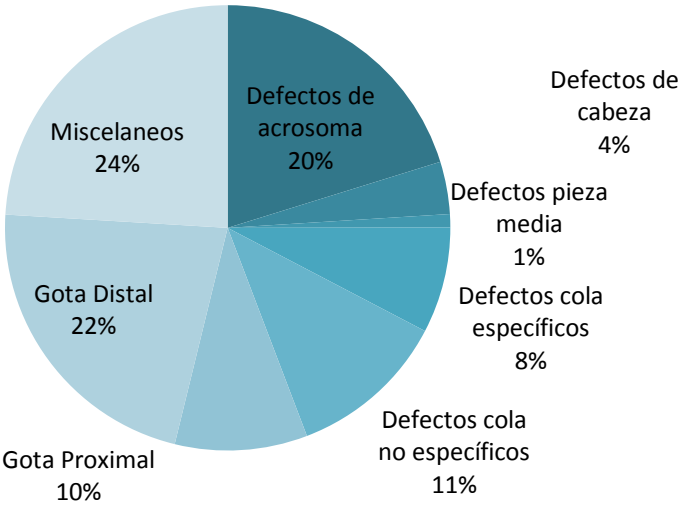

Figura 13. Porcentaje de los defectos espermáticos observados en las muestras

En resumen, nueve de los machos revisados fueron clasificados como satisfactorios reproductivamente. Los machos identificados como Barack y Brutos presentaron una concentración espermática menor a los 2500 millones de espermatozoides por mL, cantidad mínima aceptable para utilizar un macho como reproductor según Naim et al. (2009) y Menchaca et al. (2005), por lo que fueron descartados del proyecto. De igual forma, el animal número 60, no se utilizó ya que presentó una circunferencia testicular de 21 cm y la medida mínima para animales menores al año de edad es de 25 cm (McNeal, 1998). Además, solamente se observaron normales el 70% de sus espermatozoides, lo que lo clasifica con una capacidad cuestionable según los estándares descritos por Penzzanite et al. (s.f). Como se mencionó anteriormente, el número 100 no se incluyó por presentar grumos en el semen y el identificado como Dorper se descartó por preferencias del productor.

3.2. Primera Fase

3.2.1. Determinación de la ciclicidad

La primera fase del proyecto se realizó en las fincas A (n=9) y B (n=9) con un total de 18 hembras. Con el fin de detectar la ciclicidad de las hembras a utilizar en la sincronización se realizó una citología vaginal y medición hormonal previa a la sincronización. Los resultados obtenidos en las muestra tomadas de las ovejas de la Finca A se muestran en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Relación de las concentraciones de P_4, estrógenos (E_2) y células vaginales

ID	P_4 (ng/mL)	E_2 (pg/mL)	Células Basales (%)	Células Parabasales (%)	Células intermedias (%)	Células superficiales (%)	Células anucleadas (%)
1	-	-	0	0	2	4	94
2	0,83	45,30	0	1	92	5	2
3	-	-	0	0	0	8	92
4	-	-	0	0	1	4	95
5	-	-	0	0	0	8	92
6	0,84	38,50	0	2	93	5	0
7	3,23	66,90	0	0	97	3	0
8	-	-	0	0	3	4	93
9	4,47	76,80	0	0	88	9	3

Como se observa en el cuadro anterior, cinco de ellas presentaron una población celular predominante de células anucleadas (ver Figura 14), evidenciando que se encontraban en estro, razón por la que no se les realizó la medición hormonal. En las citologías de las cuatro hembras restantes, se observó mayor presencia de células intermedias. Según lo descrito por López-Crispín (2010) y Clemente y colaboradores (2013) esto sucede durante el proestro y el diestro. Por lo tanto, al realizar la medición de progesterona en sangre se determinó que dos hembras presentaban con valores >3 ng/mL, lo que según Chacón (2010), indica la presencia de un Cuerpo Lúteo (CL), característico de la fase de diestro. Valores inferiores indican la ausencia de un CL, por lo que se concluye que estas ovejas se hallaban en la fase de proestro.

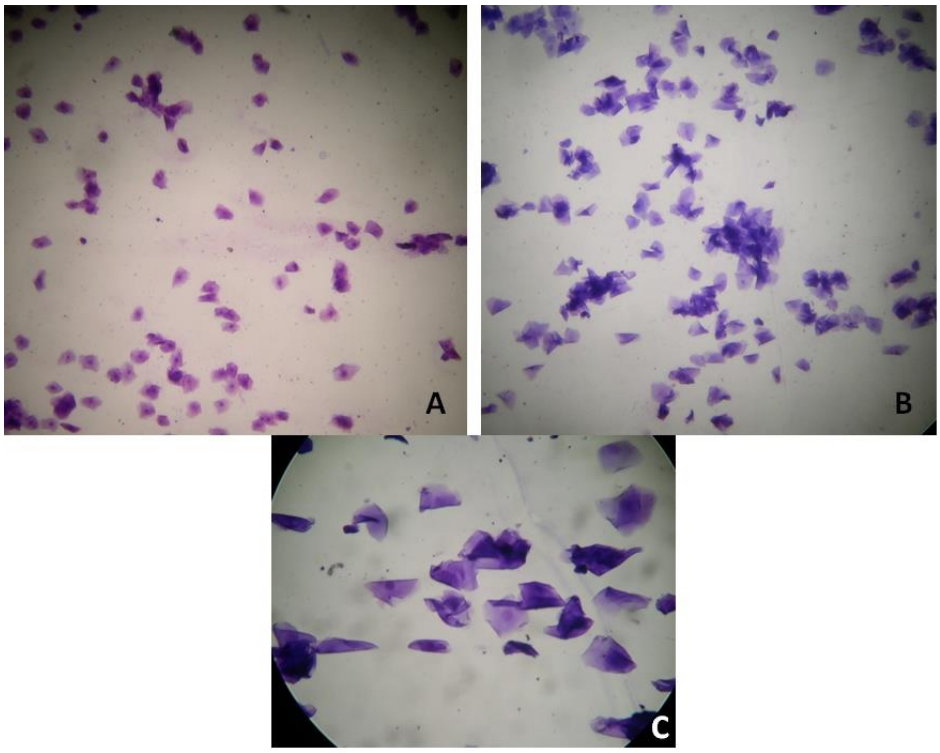

Figura 14.Citologías vaginales. (A) Células superficiales 10X (B) Células anucleadas 10X (C) Células anucleadas 40X

Al analizar las citologías tomadas en la Finca B se observó que una oveja presentaba células mayormente superficiales y escamosas, determinándose la presencia del estro. En cuatro hembras, se observó una predominancia de células intermedias, con un promedio del 89% de estas. En otras cuatro hembras se observó muy pocas células y las presentes se encontraban deformes, razón por la cual no se pudo determinar la celularidad. Sin embargo, al momento de tomar las muestras el laboratorio no contaba con las herramientas necesarias, por un tema de proveeduría, por lo no se pudo realizar la medición de P_4 en sangre ni determinarse exactamente la fase del ciclo estral en la que se encontraban. Adicionalmente, en dos hembras se observó abundantes bacterias, ya que presentaban alteraciones debido a una ingesta inadecuada de concentrado (Ver Anexo 2). Sin embargo, basados en lo analizado se determinó que todas las hembras se encontraban ciclando.

3.2.2. Elaboración de esponjas intravaginales

Durante el desarrollo del proyecto se elaboraron aproximadamente 100 esponjas para su utilización en la sincronización del estro en ovinos. El costo de cada una fue de 105 colones más 1.670 colones de la hormona, con un costo final de 1.775 colones por dispositivo.

El dispositivo intravaginal de fabricación casera fue colocado durante 12 días en las hembras previamente seleccionadas. La pérdida del dispositivo se dio en dos hembras de la Finca B solamente, lo que representa un 2,3% de las esponjas colocadas. Esos individuos fueron retirados del proyecto.

3.2.3. Sincronización del estro

En la I fase del proyecto se colocaron esponjas a un total de 18 hembras, pertenecientes a dos establecimientos; sin embargo, se descartaron dos animales por pérdida del dispositivo, por lo que la muestra de la sincronización se redujo a 16 animales pertenecientes a la Finca A (n=9) y Finca B (n=7).

3.2.4. Determinación de la eficacia farmacológica

Las hembras sincronizadas fueron observadas durante el lapso que fueron tratadas con las esponja intravaginal para determinar la presencia o ausencia de estro en ese periodo. En las 16 hembras se observó la ausencia de celo durante los 12 días que utilizaron la esponja y la presencia del mismo una vez retirado el dispositivo.

El total de las hembras presentaron celo a las 48 horas post retiro de la esponja y la distribución de estos se puede observar en la Figura 15.

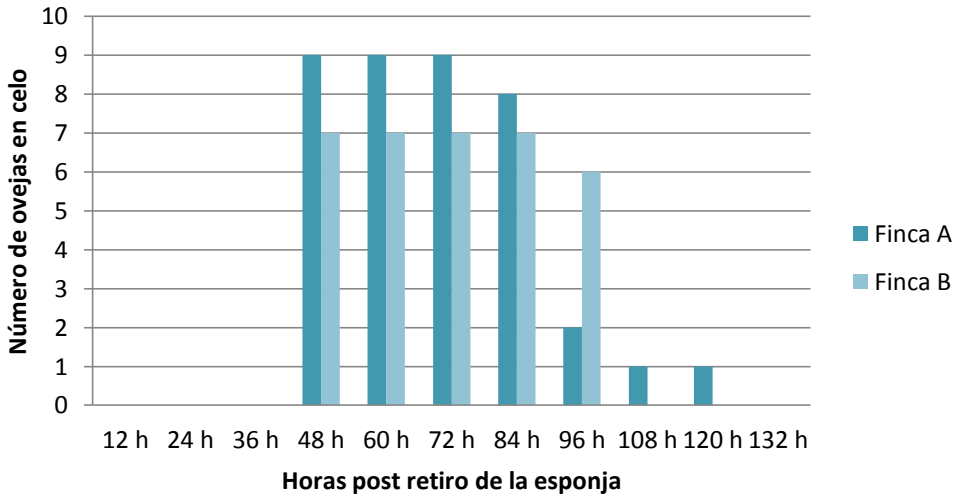

Figura 15. Duración del estro en las hembras tratadas.

Como se muestra en la figura anterior, el 100% de las hembras se mantuvieron en estro entre las 48 y 84 horas, momento en el que una hembra rechazó al macho. En la Finca A las hembras presentaron un estro con una manifestación muy evidente. Mostraron inflamación marcada de la vulva, abundante secreción de moco vaginal y notoria búsqueda del macho, características que no se observan tan fuertes en un celo natural. El rango de duración del estro fue de 48 a 120 horas post retiro del dispositivo, con un promedio de 53,3 horas y una mediana de 84 h. Como las manifestaciones de celo fueron muy fuertes y prolongadas, se determinó cambiar ligeramente el protocolo de sincronización para la Finca B.

En la Finca B las hembras iniciaron el estro 48 h post retiro de la esponja intravaginal y se mantuvieron en estro entre las 48 h y las 96 h luego de extraído el dispositivo. Tuvieron una duración promedio de 48 horas y una mediana de 72 horas.

En ambas fincas se realizó IA con semen fresco a las 48 horas luego de retirado el dispositivo intravaginal; se utilizó la técnica transcervical. Los machos fueron electroeyaculados y el semen se diluyó con el diluyente AndroMed® (Minitüb GmbH, Alemania). En la Finca A se utilizó el macho identificado como Tétano y se cargaron las pajillas con 0,2 mL de semen diluido. En la Finca B se utilizó al macho Kathadin.

En la Finca A 3/9 hembras se preñaron, lo que representa un 33,3%, mientras que en la Finca B ninguna hembra resultó gestante.

3.2.5. Determinación de efectos secundarios

3.2.5.1. Respuesta inflamatoria

La respuesta inflamatoria desarrollada por las hembras que utilizaron la esponja intravaginal de fabricación casera se determinó observando la presencia de neutrofilia y/o aumento de los valores del fibrinógeno en sangre. Además, se analizó la presencia de vaginitis en la inspección vaginal y el conteo de polimorfonuacleados en las respectivas citologías vaginales.

En la finca A, en el leucograma realizado de la muestra tomada el día 0 del protocolo de sincronización, siete ovejas de nueve presentaron leucocitosis, las nueve hembras mostraron eosinofilia y en cinco hembras se observó neutrofilia. En el leucograma obtenido de la muestra sanguínea recolectada el día 12 del tratamiento, ninguna hembra presentaba leucocitosis y en una hembra se observaba leucopenia. También, solo en una muestra se detectó eosinofilia y dos hembras presentaban neutrofilia. Los resultados se detallan en el Anexo 3. La comparación del conteo de neutrófilos de ambos días se muestra en la siguiente figura.

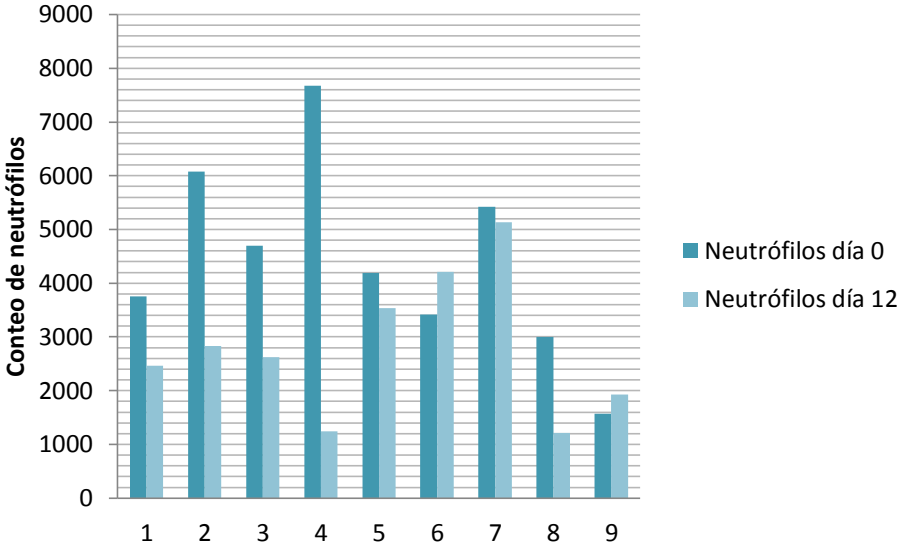

Figura 16. Conteo de segmentados de las muestra tomadas en la Finca A

Como se observa en la figura anterior, en 7/9 muestras el conteo de segmentados disminuyó, aunque en una de las muestras se presentó neutrofilia. En 2/9 se puede observar un

aumento en el conteo de neutrófilos; sin embargo, solo en una oveja los valores muestran una neutrofilia.

En la finca B, en el leucograma realizado de la muestra tomada el día 0 del protocolo de sincronización ninguna oveja presentó leucocitosis, ni neutrofilia y seis hembras de siete mostraban eosinofilia. En el leucograma obtenido de la muestra sanguínea recolectada el día 12 del tratamiento, cuatro hembras de siete presentaban leucitosis y cinco ovejas mostraron neutrofilia. También, solo en dos muestras se detectó eosinofilia. Los resultados completos se detallan en el Anexo 3.

En la Figura 17 se muestran la comparación del conteo de neutrófilos obtenido el día 0 y el día 12 de la colocación de la esponja en la Finca B.

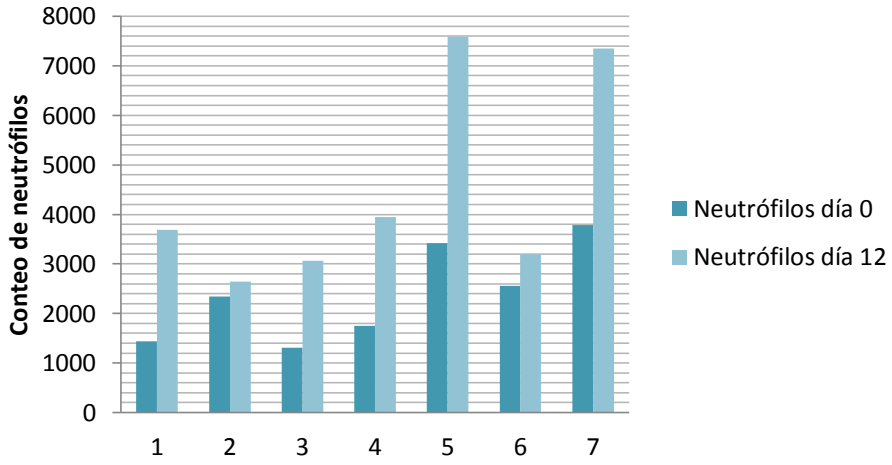

Figura 17. Conteo de segmentados de las muestra tomadas en la Finca B

A pesar que solo en dos muestras se presenta neutrofilia, es importante observar que en todas las hembras se produjo un aumento de los neutrófilos como respuesta a la presencia de la esponja intravaginal.

Al realizar las mediciones de fibrinógeno plasmático en las muestras obtenidas el día 0 en la Finca A, ninguna hembra presentaba valores superiores a 600 mg/dL; sin embargo, el día 12 del protocolo de sincronización tres ovejas obtuvieron mediciones superiores al valor anteriormente mencionado. En la finca B ninguna hembra presentó valores aumentados ni el día 0 del protocolo, ni el día 12 del mismo. Los valores se muestran en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Resultados de medición de fibrinógeno

Finca A			Finca B		
ID	*Día 0*	*Día 12*	*ID*	*Día 0*	*Día 12*
1	182	329	1	427	230
2	266	729	2	476	233
3	275	702	3	437	225
4	194	287	4	548	250
5	118	340	5	460	355
6	330	303	6	417	233
7	227	626	7	447	445
8	284	324			
9	183	372			

En el Cuadro 6 se muestran los parámetros indicativos de inflamación e infección

Cuadro 6. Parámetros de inflamación e infección

Parámetro	Día 0	Día 12	Valor p
E. coli en hisopado vaginal (animales positivos)	2	8	0,027[a]
Segmentados por µl sangre	3524 ±1791	3540 ±1844	0,491[b]
Fibrinógeno plasma (>600 mg/dl)	0	3	0,113[a]

a: Fischer`s Exact test. b: t-Test, muestras pareadas

Con el fin de evaluar las alteraciones presentes en la mucosa vaginal debido a la presencia de la esponja, se realizó una vaginoscopía el día que se retiró la misma. Además, se inspeccionó la mucosa al momento de colocar la esponja, la cual se encontró sin alteraciones en la Finca A. Sin embargo, en la Finca B todas las hembras presentaban la mucosa vaginal enrojecida y en algunos casos con materia fecal. El día 12 todas las hembras, tanto de la Finca A como de la B, presentaron enrojecimiento de la mucosa vaginal. Al retirar el dispositivo, 13 animales presentaron secreción purulenta y tres tenían secreción sanguinolenta. En ninguna de las hembras se observaron úlceras o abrasiones en la mucosa. Además, 3/16 animales presentaron adherencias a la esponja, presentando cierta dificultad al momento de su retiro. Lo observado se muestra en la Figura 18.

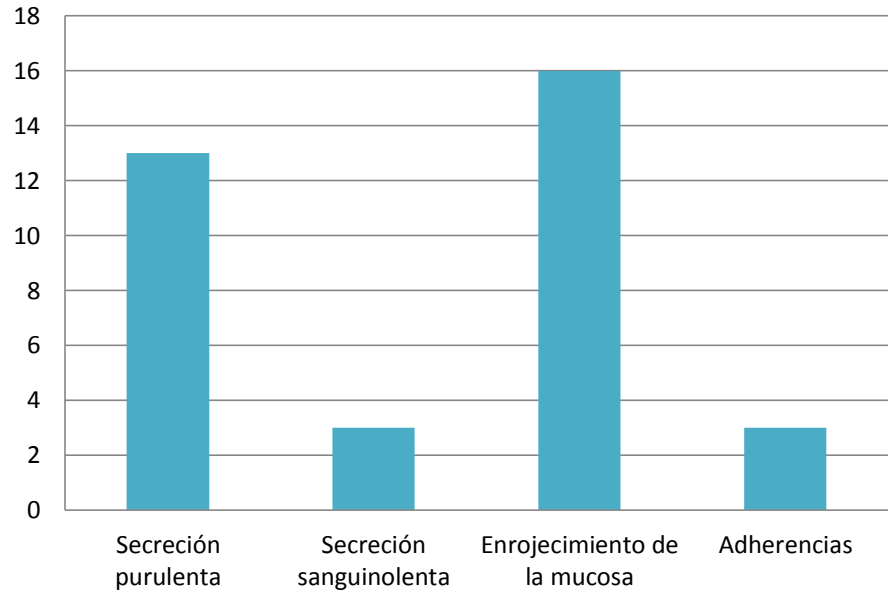

Figura 18. Resultados de la inspección vaginal realizada el día 12 del protocolo de sincronización

Con el objetivo de observar la respuesta de la mucosa vaginal al dispositivo se efectuó una citología vaginal el día 0 y el día 12 del tratamiento para realizar un conteo de polimorfonucleados. En las muestra tomadas en ambas Fincas el día 0 no se observaron polimorfonucleados. En las citologías realizadas el día 12, en la Finca A, 3/9 citologías presentaron pocos polimorfonucleados y en una muestra estos eran incontables (Ver Figura 19). En las muestras tomadas en la Finca B no se pudieron contabilizar.

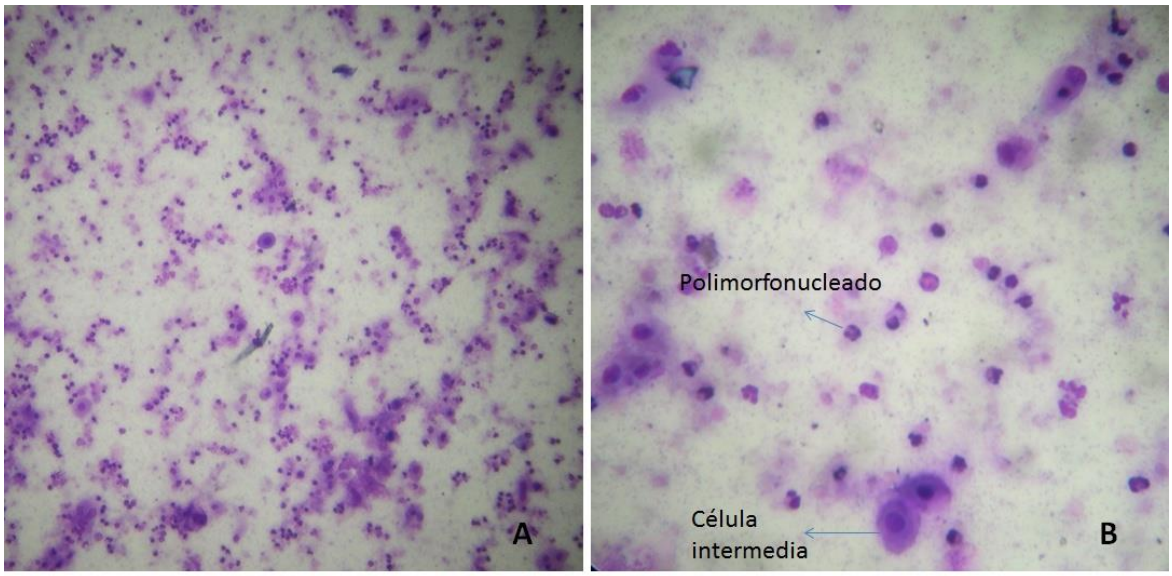

Figura 19. Frotis de hisopado vaginal que muestra los polimorfonucleados y las células intermedias. (A) 100X. (B) 400X

3.2.5.2. Cultivo vaginal

Se determinó la presencia o ausencia de *Escherichia coli* el día 0 y el día 12 del tratamiento con la esponja intravaginal de fabricación casera. En la finca A no se dio crecimiento bacterial el día 0; sin embargo, el día 12 en dos muestras se aisló *E. coli*. En la Finca B, el día 0 en tres muestras hubo crecimiento y en una (muestra número 4) las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) fueron incontables, lo cual indica contaminación secundaria. El día 12, en 6/7 muestras se determinó la presencia de la bacteria, aunque en dos de estas muestras el valor fue inferior al obtenido el día 0. En la figura 20 se muestra el conteo de UFC para cada muestra.

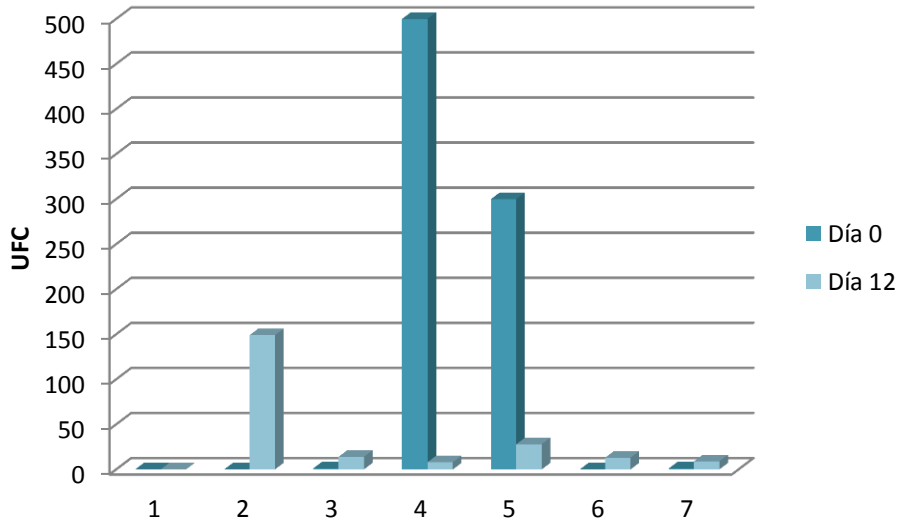

Figura 20. Conteo de UFC en Finca B

Cabe recalcar que las hembras de la Finca B presentaban una ligera vaginitis previo a la colocación de la esponja, lo cual afectó la tinción de las láminas.

3.3. Segunda Fase

En la segunda fase, se utilizaron las fincas C (n=8), D (n=6), E (n=13) y F (n=39), para un total de 66 animales. Sin embargo, debido a fallos en el manejo no se padrearon seis hembras de la Finca F, por lo que fueron eliminadas del proyecto. En consecuencia, al dividir las hembras aleatoriamente en dos grupos cada uno de estos se conformó por 30 animales. Las hembras tanto del Grupo 1 como del 2 presentaban una condición corporal mínima de 2,5 y máxima de 3,5, con un promedio de 2,8 ±0,3 unidades CC.

Durante los 12 días que se mantuvo la esponja intravaginal ninguna hembra, tanto del Grupo 1 como del 2, perdió el dispositivo o manifestó celo. Asimismo, los 60 animales mostraron signos de celo una vez retirado el dispositivo. El celo inició 48 horas después de retirado el dispositivo y presentó una duración promedio de 48 horas.

Al realizar el diagnóstico de preñez el día 35 de gestación, en el Grupo 1 se detectaron el 80% de las hembras preñadas, mientras que en el Grupo 2 se encontraron gestantes el 76,6%

de las mismas. En el Cuadro 7 se detalla el porcentaje de preñez alcanzado en cada finca tanto para la esponja casera como para la comercial.

Cuadro 7. Porcentaje de preñez alcanzado en cada finca.

Finca	Número de animales	Porcentaje de sincronización	Porcentaje de Preñez	Preñez Esponja Casera (%)	Preñez Esponja Comercial (%)
C	8	100%	87,5%	75%	100%
D	6	100%	66,6%	66,6%	66,6%
E	13	100%	92,3%	83,3%	100%
F	39	100%	72,7	82,3%	62,5%

En la Figura 21 se detallan los resultados de preñez analizados con el Fisher`s exact test p = 1,000.

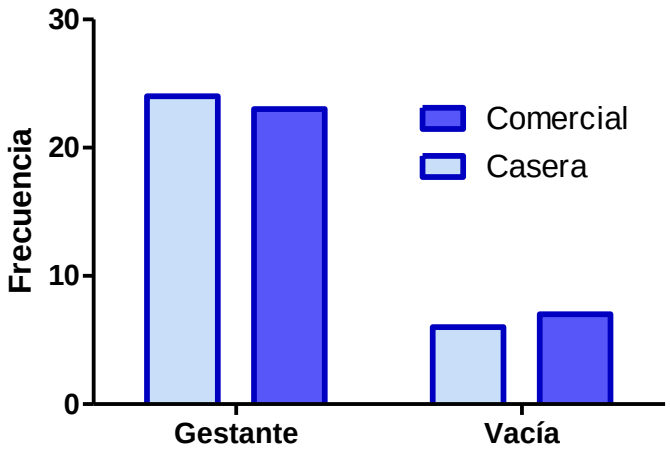

Figura 21. Comparación de los resultados de preñez entre ambos grupos

En la Figura 22 se observan imágenes de embriones con diferentes edades gestacionales. En la Figura 22(A) se observa el embrión con feto forma esférica. A partir del día 28 se puede identificar la membrana amniótica (Figuras 22(B) y 22(C)). La cabeza, miembros, cordón umbilical y cotiledones pueden verse a los 40 días de preñez (Figura

22(D)). La presencia de placentomas agiliza el diagnóstico de preñez (Figura 23) (Bidinost et al., 2001).

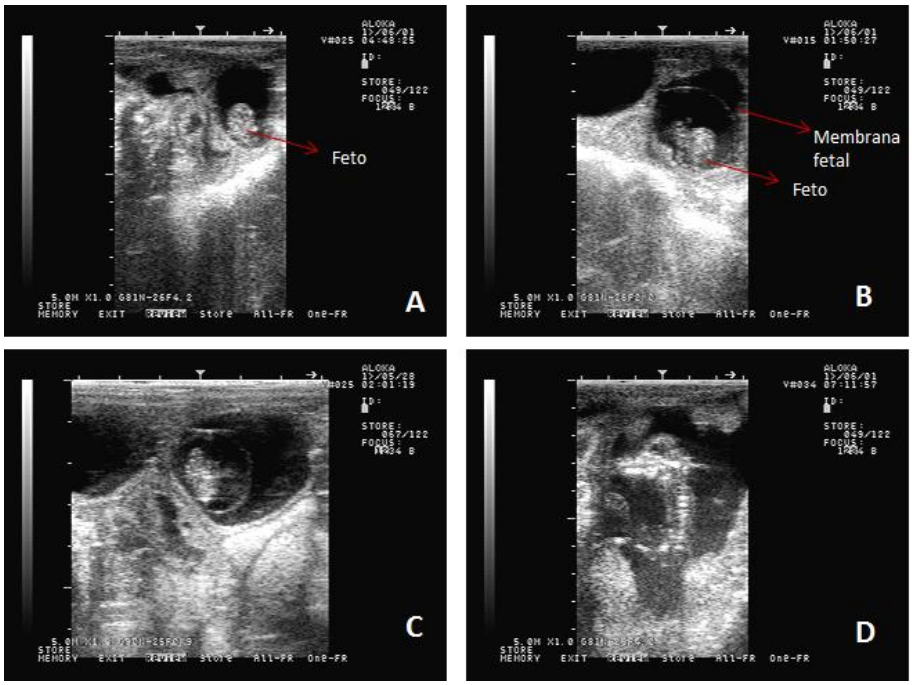

Figura 22. Preñez temprana.

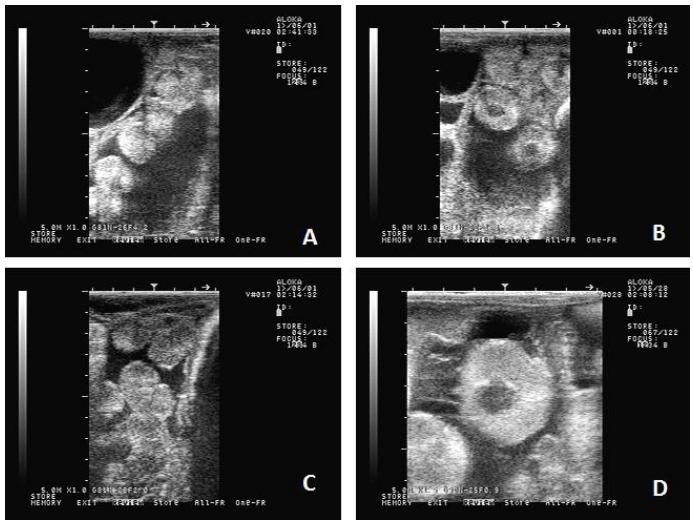

Figura 23. Placentomas.

4. DISCUSIÓN

Brand y colaboradores en un estudio realizado en el año 2014, obtuvieron un 100% de concepción acumulativa a los 100 días post parto, al tener a las hembras en un sistema intensivo (caracterizado por cultivo de pasturas, rotación de potreros y el uso de técnicas reproductivas para mejorar rendimiento reproductivo) y con monta continua, concluyendo que el manejo intensivo permite que las hembras mantengan una adecuada condición corporal para ovular y concebir durante el periodo de lactancia. En este proyecto, las fincas participantes del estudio eran manejadas bajo sistemas extensivos y con monta continua, por lo que al evaluar el hato para seleccionar a las hembras a utilizar, un alto porcentaje de estas se encontraban en diversos estados de gestación, en lactancia o con una condición corporal en promedio de 2,5. Como consecuencia, se disminuía el porcentaje de hembras que presentaban las características ideales para implementar un programa de sincronización de estros.

Las esponjas vaginales impregnadas con progestágenos sintéticos han sido ampliamente utilizadas para la sincronización e inducción del estro en ovinos (Fukui et al., 1987). En este estudio, el 6,5% de las ovejas que se sincronizaron con la esponja de fabricación casera presentaron adherencias. Resultados similares obtuvieron Espinoza et al. (2003) y Martins et al. (2010) en los trabajos realizados, en los que 14% y 10%, respectivamente, de las hembras tratadas presentaron adherencias al momento de retirar el dispositivo. Sin embargo, al retirar el dispositivo, era necesario ejercer más fuerza que con las esponjas comerciales, ya que al rotarlas sobre su propio eje se atoraban ligeramente en el cuerpo vaginal. Las esponjas comerciales, al tener un diámetro menor (dos centímetros en comparación con cuatro centímetros de diámetro de la casera) permitían una extracción más sencilla y rápida. Por consiguiente, es necesario valorar la implementación de una reducción del diámetro del cilindro de espuma para facilitar el uso de las esponjas de fabricación casera.

Robinson et al. (1968), Gibbons y Cueto (1995) y Simonetti et al. (2000), en el proceso de elaboración de las esponjas caseras, establecen la inyección de la hormona dentro de la esponja como el método a utilizar. Con el fin de obtener una mejor distribución de la hormona y facilitar su absorción al estar en contacto con la mucosa vaginal, las esponjas utilizadas en este proyecto fueron impregnadas de manera uniforme en toda la superficie de la esponja, procedimiento usado por Espinoza et al. (2003) y Martins et al. (2010). Sin embargo, es

necesario determinar si esta aplicación favorece la absorción y por lo tanto permite la utilización de una dosis menor, lo cual disminuiría el costo de la elaboración, haciéndolo más accesible a los productores nacionales. La sugerencia anterior, se plantea a raíz de estudios como el de Simonetti y colaboradores (2000), quienes evaluaron los niveles residuales y absorbidos de MAP y el efecto en la sincronización del estro y la preñez, al utilizar diferentes dosis de MAP en la elaboración de esponjas intravaginales. Asimismo, observaron que al utilizar una dosis de 40 mg, 50 mg y 60 mg, solamente se absorbían 21 mg, 19,7 mg y 24 mg, respectivamente. Por lo tanto, sin importar la dosis inicial, la cantidad de hormona absorbida no mostraba diferencias significativas entre los grupos. Además, demostraron que el porcentaje de preñez fue similar con las tres dosis utilizadas. No obstante, es importante tomar en cuenta que altos niveles de progesterona al final del tratamiento no mejoran la sincronización y más bien pueden disminuir la fertilidad al reducir la viabilidad de los oocitos y provocar atresia de los folículos dominantes (Simonetti et al., 2000; Martemucci y D´Alessandro, 2011).

Los tratamientos hormonales para la sincronización del estro se basan en la utilización combinada de hormonas con el uso de un agente bloqueador del ciclo estral como lo es el MAP y la posterior ocurrencia de ovulaciones fisiológicas, (Martínez-Tinajero et al., 2008). Las esponjas impregnadas con MAP controlan vida del cuerpo lúteo y suprimen el desarrollo de los folículos dominantes, por lo que inhiben temporalmente la ciclicidad. Sin embargo, para que estas sean efectivas, es necesaria una cantidad adecuada de gonadotropina para iniciar los eventos preovulatorios, razón por la que se utiliza la administración de eCG exógena, debido a que presenta un importante efecto FSH (Abecia et al., 2012). Además, en dosis adecuadas aumenta la tasa de ovulación ya que induce el reclutamiento folicular, permitiendo una mayor tasa de partos múltiples (Fernández-Abella et al., 2003; Barret et al., 2004).

El uso de eCG administrada después del tratamiento con progestágenos disminuye el intervalo de aparición del estro comparado solo con el uso de progestágenos y, dependiendo de la dosis, permite que se agrupen más (Barret et al., 2004; Dogan y Nur, 2006) La administración de una dosis luteolítica de $PGF_{2\alpha}$, administrada al final o 24-48 horas antes de retirar el dispositivo intravaginal, ha resultado en un aumento en la tasa de fertilidad y puede ser utilizada para disminuir el tiempo del tratamiento con progestágenos (Martemucci y

D´Alessandro, 2011). Al utilizar inseminación artificial a tiempo fijo, el uso de análogos de GnRH, para ayudar a inducir la ovulación, permite una mejor sincronización de esta, lo cual es fundamental para obtener porcentajes de preñez aceptables (Fernández-Abella et al., 2003; Martemucci y D´Alessandro, 2011).

En el presente estudio se obtuvo un 100% de sincronización del estro, tanto en la primera fase como en la segunda. Resultados similares fueron obtenidos por Martínez-Tinajero et al. (2007) al utilizar una esponja intravaginal impregnada con 65 mg de MAP durante 12 días y administrar 200 UI de eCG 48 horas antes, al retiro ó 48 horas después de la extracción del dispositivo. Wuster-Radcliffe et al. (2004), al implementar un protocolo con esponjas con 60 mg de MAP durante 12 días, 15 mg de PGF2α el día 10 y 400 UI de eCG al retirar el dispositivo en un total de 420 ovejas, logró que 418 mostraran signos de celo. De igual manera, Fukui et al. (1987 y 1999) obtuvieron 100% de manifestación del estro al aplicar esponjas impregnadas con 60 mg de MAP durante 12 días y el día 12 del tratamiento administrar 600 UI en el primer estudio (1987) y 500 UI de eCG en el segundo estudio (1999). En el trabajo realizado por Hernández-Olivos (2010) se observó un 100% de presentación de celo y menciona que Martínez (2006) y Uribe-Velázquez (2008) obtuvieron el mismo resultado en sus respectivos trabajos. Asimismo, Naim et al. (2009) utilizaron 60 mg de MAP durante 14 días más 200 UI eCG y Espinoza et al. (2003) sincronizaron con esponjas de fabricación casera elaborada con 60 mg de MAP durante 12 días y en ambos estudios todas las hembras sincronizadas manifestaron signos de celo.

Todas las hembras sincronizadas en el presente estudio manifestaron signos de celo en promedio a las 48 horas post retiro de la esponja intravaginal, datos que se comparan con los de diferentes estudios. Diversos autores establecen que al utilizar progestágenos impregnados en un dispositivo intravaginal las hembras muestran signos de celo, tanto para padrear o inseminación artificial 48 horas después de extraer el dispositivo (Espinoza et al., 2003; Hernández-Olivos, 2010; Abecia et al., 2012). Los resultados de Barret et al. (2004) fueron ligeramente distintos, siendo en promedio necesarios 2,6 días para que las hembras iniciaran el estro. De igual manera, en el trabajo realizado por Silva et al. (2010) las hembras sincronizadas con 50 mg de MAP durante 12 días más 250UI de eCG IM el día 12 mostraron signos de celo 67 ± 2,8 horas posteriores a la extracción de la esponja. En diversos estudios el

intervalo entre el retiro del dispositivo y el inicio del estro fue menor al obtenido en el presente proyecto: Fukui et al. (1987) 32 horas, Santos et al. (2010) 37 horas y Martínez-Tinajero et al. (2007) y Catalano et al. (2007) 38 horas. A pesar que con el protocolo utilizado para la Finca A el porcentaje de sincronización fue excelente, la agrupación del mismo fue deficiente. Las hembras iniciaron el estro a las 48 horas post retiro de la esponja pero este tuvo una duración en algunas hembras hasta de 72 horas y mostraron signos de celo exacerbados.

En países con estacionalidad reproductiva, diversos autores han utilizado dosis de 500 UI de eCG en protocolos para la sincronización del estro combinados con dispositivos impregnados con progestágenos durante la época reproductiva (Fukui et al., 1999; Zarwaki, 2001; Barret et al., 2004). Bajo las mismas condiciones, Wulsfer-Radcliffe et al. (2004) y Oliveira-Munzante et al. (2011) utilizaron dosis inferiores de eCG, 400 IU y 300 UI respectivamente. Hernández-Olivos (2010) utilizó 400 IU para la sincronización del estro en ovejas en condiciones tropicales. Sin embargo, a pesar que la dosis utilizada fue menor a la utilizada por la mayoría de los trabajos anteriormente mencionados, los resultados observados en la Finca A indican que, por el peso y las condiciones de las hembras utilizadas, la eCG y la gonadorelina, al tener un efecto tipo FSH, estimulan la secreción de estrógenos por parte de los folículos provocando una secreción mayor de estos y las correspondientes manifestaciones físicas (Squires 2003; Catalano et al, 2007).

Como consecuencia de lo anterior, realizamos ajustes en el protocolo utilizado disminuyendo la dosis de eCG a 200 UI y eliminando la gonadorelina, con el fin de adaptar el protocolo a la situación encontrada en el país con respecto al peso de los animales y las condiciones tropicales. Por consiguiente, los resultados obtenidos con este último protocolo muestran una excelente presentación de estros (100%) y sincronización de los mismos, tanto en inicio como en duración. Es importante mencionar la necesidad de realizar más estudios que permitan determinar las dosis aceptables para utilizar con los animales (por peso, raza y condición corporal), las condiciones climáticas y de nutrición del país.

En la segunda fase del proyecto se obtuvo un 80% de preñez con la esponja de elaboración casera y un 76,6% con la comercial y no se observaron diferencias significativas entre ambas. A pesar que no se encontraron datos que permitan comparar con exactitud la aplicación del protocolo de sincronización utilizado en nuestro estudio, diversos autores

reportan resultados similares utilizando un protocolo basado en la esponja impregnada con MAP y la administración de eCG al retirar la misma, e implementando un padreo con monta controlado. Zarwaki (2001) y Martínez-Tinajero et al. (2007) reportan un 80% de preñez; mientras que Hernández-Olivos (2010) un 77% de preñez en hembras de raza Pelibuey y un 85% en hembras Katahdin en época reproductiva. Espinoza et al. (2003), al sincronizar un grupo de ovejas con una esponja de fabricación casera, impregnada con 50mg de MAP, y otro grupo con una esponja comercial impregnada con 40 mg de FGA obtuvieron una tasa de preñez del 70% en ambos grupos. De igual manera, Catalano et al. (2005 y 2007) reportan resultados inferiores, 61,5% y 56,3% respectivamente, al utilizar hembras adultas de raza Frisona-Corridale en época no reproductiva. Lo anterior pone en evidencia la importancia de establecer las expectativas del tratamiento basados en las características específicas de cada raza y del ambiente. Asimismo, cabe recalcar que en nuestro estudio, la tasa de preñez obtenida con el uso de la esponja casera es mayor que la observada con esponjas comerciales.

Es importante tomar en cuenta que al utilizar esponjas impregnadas con progestágenos las tasas de inducción del estro son altas, pero las tasas de fertilidad son variables (Silva et al., 2010; Manes et al., 2014). Diversos factores han sido asociados al fallo en la fertilidad de los protocolos al utilizar esponjas intravaginales. Silva et al. (2010) menciona que los protocolos con una duración de 12 – 14 días suelen provocar la ovulación de un oocito envejecido, ya que se genera un lapso excesivo para el crecimiento folicular, debido a la prolongada permanencia del implante intravaginal y al hecho de que se requieren aproximadamente 4 días para alcanzar el tamaño del folículo preovulatorio posterior al retiro del implante (Duggavathi, 2004).

La concepción reducida también se ha atribuido a una deficiencia en el transporte de los espermatozoides en el tracto genital como resultado del cambio en el patrón hormonal (Noakes et al., 2001; Martemucci y D´Alessandro, 2011). Asociado a lo anterior se encuentra la alteración del ambiente vaginal provocado por el dispositivo intravaginal (Manes et al., 2010). En el trabajo realizado por Manes et al. (2014), en el que se comparó la tasa de fertilidad en ovejas luego de sincronizar el estro con una esponja impregnada con MAP (n=200), una esponja placebo (n=156) y un grupo control (n=213) y realizar la inseminación artificial cervical con semen fresco, demostró que la tasa de concepción se afectó negativamente en los grupos en los que se utilizó esponja intravaginal. El aumento en la flora

vaginal provoca que se dé una infiltración de leucocitos en el epitelio vaginal que actúa en contra de los espermatozoides (Manes et al., 2014). Además, las sustancias biológicas secretadas en la respuesta inflamatoria y la acción de los componentes de las bacterias Gram negativas pueden tener un efecto negativo en la viabilidad y motilidad de los espermatozoides, ya que provoca adhesión y aglutinación del esperma y cambios morfológicos que alteran la funcionalidad del semen (Manes et al., 2014). Sin embargo, realizando un protocolo de sincronización adecuado a las condiciones específicas se pueden lograr buenos porcentajes de preñez, como los obtenidos en este proyecto, y una mejora en la tasa de gestaciones gemelares al utilizar la eCG.

Los resultados de este proyecto muestran que todas las ovejas que fueron tratadas con una esponja intravaginal, tanto casera como comercial, presentaron vaginitis. El uso de esponjas intravaginales es un factor predisponente para la aparición de vaginitis causada por microorganismos oportunistas, los cambios se pueden atribuir a la acción física, la constante absorción y retención de las secreciones vaginales por la esponja intravaginal durante el tiempo que permanece dentro de la vagina (Manes et al., 2010). Suárez et al. (2006) citados por Manes et al. (2010) reportan que la presencia de un cuerpo extraño, en este caso la esponja, estimula el crecimiento bacteriano, la inflamación localizada con la acumulación de secreciones mucosas y fluidos con un olor fétido. Otro factor a considerar es que, en ovejas, vacas y cerdas, se ha reportado que la progesterona tiene un efecto local inmunosupresor, lo cual contribuye al desarrollo de la vaginitis, aunque todavía se tiene que determinar si la MAP al administrarse localmente afecta la respuesta inmune local como lo hacen otras progestinas (Gatti et al., 2011). Al realizar la inspección vaginal, las observaciones concuerdan con diversos estudios al describir la presencia de eritrema, descargas hemorrágicas y purulentas, aumento de leucocitos en la mucosa vaginal (Martins et al., 2009; Manes et al., 2010; Martins et al., 2010, Gatti et al., 2011; Manes et al., 2014).

La inflamación es un mecanismo de protección cuyo propósito biológico es diluir, aislar, eliminar la causa de la lesión y reparar el tejido dañado. El proceso de la respuesta de fase aguda puede activarse por estímulos exógenos como bacterias, virus, parásitos, cuerpos extraños y estímulos mecánicos, físicos o químicos. Durante el desarrollo de la respuesta de fase aguda se liberan citoquinas y otros mediadores que aumentan la concentración de

proteínas como el fibrinógeno. Además, se da un aumento de leucocitos con el fin de fagocitar, matar o digerir lo que está causando el estímulo (Martínez-Subiela et al., 2001; McGavin y Zachary, 2007). Por tanto, ante el efecto producido localmente por la esponja intravaginal, controlar indicadores sistémicos de inflamación permite obtener información acerca del efecto que producen los dispositivos en general. El fibrinógeno es una proteína plasmática que, durante la fase aguda, es liberado en mayor cantidad por los hepatocitos aumentándose considerablemente sus niveles (McGavin y Zachary, 2007). Martínez-Subiela et al. (2001) mencionan que en ocasiones los niveles pueden permanecer invariables o descender porque su consumo excede la producción. Los neutrófilos son los encargados de fagocitar los microorganismos y eliminar el contenido de sus gránulos con el fin de aumentar la respuesta inflamatoria, por lo que sus niveles se ven incrementados ante la presencia de un agente o estímulo (McGavin y Zachary, 2007). La respuesta inflamatoria observada ante la presencia del dispositivo intravaginal muestra un ligero aumento en los valores del conteo de neutrófilos y fibrinógeno, sin que estos lleguen a los valores superiores que determinan la presencia de un proceso infeccioso importante (4000 neutrófilos/µL y 600 mg/dL). Esto indica que, aunque se dé una ligera respuesta, el dispositivo intravaginal de fabricación casera no compromete la salud general del animal.

Al realizar el cultivo del hisopado vaginal se observó un incremento en la cantidad de muestras en las que se aisló *E. coli* en el hisopado realizado el día 12 (8/16) con respecto al tomado el día 0 del tratamiento (2/16). Este aumento era esperado ya que en ovejas, como consecuencia del uso de esponjas intravaginales, se ha observado un aumento importante en la flora vaginal (Gatti et al., 2011). En un estudio realizado por Manes et al. (2010) se reporta que la flora bacteriana predominante, al momento de introducir el dispositivo, estaba formada por bacterias Gram positivas como *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp. y *Corinebacterium* sp. Al momento de retirar el mismo, las bacterias predominantes fueron Gram negativas del grupo Enterobacteriaceae y *Escherichia coli* la más aislada. Gatti et al. (2011) reportan que el abundante crecimiento bacteriano se debe a un incremento en los coliformes, siendo *E.coli* y *Klebsiella* spp. los grupos más aislados. Los cambios en la flora bacteriana pueden atribuirse a los cambios inflamatorios producidos en la vagina causados por la presencia del dispositivo, que a su vez promueve el desarrollo de enterobacterias oportunistas (Manes et al., 2010).

Es importante mencionar que al momento de realizar la inseminación artificial, 48 horas después de retirar el dispositivo, las ovejas no presentaban signos de vaginitis y la mucosa vaginal se observó con características normales, sin enrojecimiento ni acumulación de secreciones. Martins et al. (2010) y Gatti et al. (2011) reportan en sus estudios que dos días después del retiro de la esponja intravaginal la población bacteriana de la vagina presenta valores similares a los observados el día de la inserción del dispositivo. Esta disminución está relacionada con una respuesta inmune localizada, causada por la fase estrogénica durante el proestro y el estro, observándose la presencia de un número importante de macrófagos (Martins et al., 2010; Gatti et al., 2011). Además, la presencia de un cuerpo extraño y bacterias gram negativas provocan la infiltración de leucocitos (Manes et al., 2010). A pesar de las dificultades presentadas al contabilizar los polimorfonucleados en las citologías vaginales realizadas el día 0 y el día 12 del tratamiento, se pudo observar la presencia de estas células en algunas de las citologías del día 12, evidenciando la respuesta inmune localizada que se genera a causa del dispositivo intravaginal.

Gatti et al. (2011) demostraron que la aplicación local de oxitetraciclina, impregnándose en la esponja, es más eficaz que el tratamiento antibiótico sistémico en el control del aumento de la flora bacteriana producido por la inserción del dispositivo. Manes et al (2010) mencionan que al ser una práctica común se ha reportado resistencia en coliformes aislados de ovejas con vaginitis y Martins et al. (2009) reporta que el 85% de los coliformes aislados presentaron resistencia a las tetraciclinas. Manes et al. (2014) menciona que el tratamiento antibiótico local solo controla el incremento en el conteo bacteriano pero no los cambios producidos en la composición de la flora. Además, Gatti y Ungerfeld (2012) reportan que el atractivo sexual de la hembra tratada con dispositivos intravaginales disminuye con respecto al de hembras con estro natural, sin embrago, la presencia de antibiótico no presenta diferencia significativa. En la segunda fase del proyecto, la esponja comercial utilizada incluía como antibiótico la oxitetraciclina, mientras que la esponja de fabricación casera no tenía antibiótico impregnado. En ambos grupos se observaron los mismos signos de vaginitis, sin diferencias en cuanto a enrojecimiento, cantidad y características de la secreción, confirmando lo descrito por los estudios anteriormente mencionados.

Es importante resaltar que los resultados obtenidos en este proyecto evidencian que la esponja de fabricación casera es un dispositivo que no genera reacciones inflamatorias que afecten el bienestar del animal, siendo una herramienta valiosa para su uso en la sincronización del estro en ovinos de pelo en Costa Rica.

5. CONCLUSIONES

5.1. La sincronización de estros es la base de las técnicas de mejora en la base genética y la producción. La elaboración de un dispositivo aplicable al hato nacional se realizó de manera satisfactoria, siendo una herramienta útil, cuyo proceso de fabricación es sencillo y aplicable a las condiciones cotidianas del trabajo del médico veterinario. No obstante, al ser requerida la utilización de los medicamentos de forma extra-etiqueta, está sujeto al uso exclusivo por parte de los médicos veterinarios.

5.2. Las esponjas de elaboración casera permitieron una sincronización del estro, mostrando alta eficacia en su utilización. Además, la combinación de hormonas utilizada fue apropiada dado que permitió alcanzar resultados satisfactorios de sincronización y porcentajes de preñez, siendo por tanto, un protocolo apto para uso en los hatos ovinos del país.

5.3. Los efectos secundarios observados durante el tratamiento con la esponja intravaginal casera no revelaron la presencia de un proceso inflamatorio importante, por lo que es seguro el uso del dispositivo. De igual manera, el cambio en las características de la flora bacteriana durante el periodo en que se realiza el tratamiento es transitorio, volviendo a los valores normales luego del retiro del dispositivo. A pesar de la presencia de alteraciones locales, la tasa de preñez alcanzada indica que dichas alteraciones tienen una influencia muy baja sobre la fertilidad en el momento de la monta natural. Aunque el uso de la esponja podría afectar negativamente la preñez, la magnitud del impacto es baja y los beneficios obtenidos son mayores, por lo que la implementación de este procedimiento sería altamente favorable para mejorar la producción ovina nacional.

5.4. La eficacia de la esponja de fabricación casera no mostró diferencias significativas con respecto a los resultados obtenidos con la esponja comercial bajo el mismo protocolo de sincronización del estro. Por lo tanto, la esponja de fabricación casera es una alternativa para su implementación en las producciones ovinas del país por parte de los médicos veterinarios.

6. RECOMENDACIONES

6.1. Se recomienda que antes de iniciar un programa de sincronización de estros se implemente la monta controlada con el fin de evitar que las hembras genéticamente más aptas estén preñadas por el padrote de la finca en el momento de iniciar el programa de sincronización para mejorar genética.

6.2. Con el fin de facilitar la colocación y extracción de la esponja intravaginal es necesaria la disminución del diámetro del dispositivo casero usando como referencia la medida de la esponja comercial (dos centímetros). Esto no solo favorece su colocación usando un aplicador que permita reducir el estrés en el animal, sino también disminuye la retención de fluidos vaginales en el dispositivo, reduciendo la inflamación causada.

6.3. Valorar el uso de las esponjas de fabricación casera en protocolos de sincronización de tiempo corto, en los que se coloca el dispositivo durante seis a ocho días, lo que permitiría disminuir los efectos secundarios locales y sistémicos.

6.4. Una de las limitantes para la implementación de programas de sincronización de celos en los hatos ovinos es la inversión económica necesaria. Por ende, realizar estudios que valoren la disminución de la dosis de MAP utilizada por esponja van a permitir disminuir el costo de los dispositivos y, de esta manera, hacerlos más accesibles a los productores. El acceso a este tipo de información permitirá una mejora profesional en el trabajo realizado, generando mayor confianza en el productor y así la disponibilidad para seguir implementando procedimientos que permitan mayor competitividad de los ovinos nacionales.

6.5. Al utilizarse MAP de forma extra-etiqueta el médico veterinario deberá dar una recomendación acerca del eventual periodo de descarte de la carne de los animales tratados, ya que alguno de ellos podría ser sacrificado para el consumo humano. Como referencia se puede usar el periodo de retiro indicado por las casas que comercializan dispositivos intravaginales con semejante concentración de MAP. En este sentido se encuentra que algunos mencionan un periodo de retiro de cero días, mientras que otros mencionan 15 ó 30 días. Tomando en cuenta la regla farmacológica que al cumplirse diez vidas medias del fármaco en sangre se ha eliminado el 99% del producto, y que en varias especies se reportan vidas medias de 30 a 60 horas, el periodo de retiro se establecería en dos a cuatro semanas. En conclusión, y tomado en

cuenta la seguridad para el consumidor, se recomienda un periodo de descarte mínimo de un mes posterior al retiro de la esponja. Al ser un periodo de retiro tan prolongado no se recomienda el uso de MAP intravaginal en ovejas cuya leche se va a destinar al consumo humano.

6.6. Al desarrollar la sincronización de estros en un hato en nuestras condiciones tropicales, es importante tomar en cuenta que los cuatro primeros meses del año, en la región Central y Pacífica, se da una diminución en la disponibilidad de forrajes, lo que provoca baja condición corporal y una respuesta disminuida a los protocolos de sincronización (Martínez-Tinajero et al., 2007).

6.7. Es recomendable que antes de implementar un programa de sincronización de estros el productor posea las instalaciones mínimas necesarias para garantizar la separación de las hembras tratadas de los machos. Además, se debe asegurar ofrecer una dieta adecuada a las hembras seleccionadas para evitar que estas disminuyan la CC y, de esta manera, la eficacia del protocolo. También, se debe controlar la suplementación excesiva con concentrado para evitar que se generen condiciones indeseadas, como por ejemplo la acidosis ruminal aguda, que repercuten negativamente en la preñez.

6.8. Una mayor comunicación entre el gremio productor y los médicos veterinarios es necesaria para fomentar un crecimiento del sector basado en una asesoría oportuna de las necesidades específicas de cada producción ovina, buscando una constante mejoría e implementación de técnicas que permitan que el hato nacional adelante, no solo en genética, sino también en manejo, disponibilidad de producto para comerciar y características de ese producto.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abecia, J.A., F. Forcada & A. González-Bulnes. 2012. Hormonal control of reproduction in small ruminants. Anim. Reprod. Sci. 130: 173-179.

Araya, C.A. 2007. Sincronización de celo en ovejas mediante el uso de Acetato de Fluorogestona y Acetato de Melengestrol en Costa Rica. Tesis de Licenciatura en Medicina Veterinaria. Universidad Nacional. Heredia, C.R.

Bagley, C.V. 1997. Breeding soundness in rams: how to do it and how to interpret it [en línea]. Utah State University Cooperative Extension Service, United States.http://extension.usu.edu/files/publications/factsheet/AH_Sheep_13.pdf (Consulta: 30 Agost. 2011).

Barrett, D.M.W., P.M, Bartlewski, M. Batista-Arteaga, A. Syminton & N.C. Rawlings. 2004. Ultrasound and endrocine evaluationof the ovarian response to a single dose of 500 IU of eCG following a 12-days treatment with progesterone-releasing intravaginal sponges in the breeding and nonbreeding season in ewes. Theriogenology 61: 311-327.

Bidinost, F., A.E. Gibbons & M. Cueto. 2001. Ecografía para el diagnóstico de la preñez en ovinos y caprinos [en línea]. INTA EEA Bariloche. Argentina. www.biblioteca.org.ar/libros/210336.pdf (Consulta: 1 Set. 2011)

Boggio, J.C. 2005. Consejos y datos para la sincronización del estro en lanares con esponjas intravaginales [en línea]. Ergomix, Argentina. https://www.engormix.com/MA-ovinos/articulos/consejos-datos-sincronizacion-estro-t548/103-p0.html. (Consulta: 6 Ene. 2015)

Bouda, J., L. Paasch-Martínez & A.Y. Osorio. 1997. Desarrollo y empleo del método de diagnóstico preventivo en los trastornos ruminales y metabólicos en bovinos. Vet Mex 28(3): 189-195

Brand, T.S., S. Terblanche & J.W.Jordaan. 2014. Conception rate and fecundity of Dohne Merino ewes in a continuous mating system. S. Afr. J. Anim. Sci 44(5): 64-69

Brander, G.C., D.M. Pugh., R.J. Bywater, & W.L. Jenkins. 1991. Veterinary Applied Pharmacology and Therapeutics. 5 th. ed. Bailliére Tindall. London. UK.

Catalano, R., C. González, M. Teruel, J. Cabodevila & S. Callejas. 2005. Efecto del estado fisiológico y del porcentaje de raza Frisona sobre la respuesta reproductiva de ovejas en servicio de primavera. In. Vet. 7: 99- 105.

Catalano, R., C. González, M. Teruel, J. Cabodevila & S. Callejas. 2007. Efecto de diferentes dosis de gonadotrofina coriónica equina sobre la respuesta reproductiva de hembras ovinas con un tratamiento para inducción de celos [en línea]. In Vet. 9 (1): 11-17. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S1668-34982007000100001&script=sci_arttext (Consulta: 18 Set. 2011).

Chacón, G., J.A. Abecia, C. Palacios & R. Baselga. 2010. Determinación de progesterona mediante quimioluminiscencia en ganado ovino [en línea]. p 168-172 In XXXV Congreso de la SEOC. Set 22-25. Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Valladolid, España. http://www.google.co.cr/url?sa=t&source=web&cd=7&ved=0CEQQFjAG&url=http%3A%2F%2Fwww.seoc.eu%2Fdocs%2Fjornadas%2F35_jornadas_seoc.pdf&ei=ZUNmTsy (Consulta: 18 Set. 2011)

Clemente, O.N., A. Orihuela, F.I. Flores & V. Aguirre. 2013. Citología y Análisis morfométrico de las células del epitelio vaginal durante el ciclo estral en ovejas de pelo (*Ovis aries*). Int. J. Morphol. 31 (3): 888-893.

Dogan, I. & Z. Nur. 2006. Different estrous induction methods during the non-breeding season in Kivircik ewes. Veterinární Medicina 51: 133-138.

Duggavathi, R. 2004. Dynamics and regulation of ovarian antral follicular waves in sheep. Tesis de Doctorado, Universidad de Saskatchewan, Can.

Espinoza R.R., E.E Fraga & M.M Domínguez. 2003. Esponjas intravaginales manufacturadas con acetato de medroxiprogesterona para sincronizar el estro en ovinos de pelo [en línea]. p 50 In XXVII Congreso Nacional de Buiatría. Jun 10-14. Ammveb, México. http://ammveb.net/XXVII%20CNB/memorias/Reproduccion/Oral/htm/Trabajo_50_Esponjas_intravaginales_manufacturadas.htm (Consulta: 18 Set. 2011)

Evans G., & W.M.C. Maxwell. 1990. Inseminación Artificial de ovejas y cabras. 1st. ed. Acribia S.A. Zaragoza, España.

Fernández, A. 2007. Producción ovina quiere engordarse [en línea]. El Financiero. C.R. http://wvw.elfinancierocr.com/ef_archivo/2007/agosto/26/economia1202775.html. (Consulta: 18 Oct. 2013)

Fernández-Abella, D., C. Bonilla-Riera, O, Irabuena & S. Sterla. 2003. Efecto del método de sincronización de celos y el manejo del semen conservado sobre la fecundidad ovina [en línea] Ovinos-Caprinos.com. Arg. http://www.ovinos-caprinos.com/FERTILIDAD/EFECTO%20DEL%20METODO%20DE%20SINCRONIZACION%20DE%20CELOS%20Y.pdf (Consulta: 5 Ene. 2015).

Fukui, Y., D. Ishikawa, N. Ishida, M. Okada, R. Itagaki & T. Ogiso. 1999. Comparison of fertility of estrous synchronized ewes with four different intravaginal devices during the breeding season. J. Reprod. Develop. 45: 337-343.

Fukui, Y., M. Tetsuka, M. Akaikf, K. Machiyama & H. Ono. 1987. Effects of types of vaginal sponge impregnated with progestogen on estrous induction and lambing rate in seasonally anestrous ewes. Anim. Reprod. Sci. 33: 181-187

Gatti, M., P. Zunino & R. Ungerfeld. 2011. Changes in the aerobic vaginal bacterial mucous load after treatment with intravaginal sponges in anoestrous ewes: Effect of medroxiprogesterone acetate and antibiotic treatment use. Reprod. Dom. Anim. 46: 205-208.

Gatti, M. & R. Ungerfeld. 2012. Intravaginal sponges to synchronize estrus decrease sexual attractiveness in ewes. Theriogenology 78: 1796- 1799.

Gibbons, A. & M. Cueto. 2004. Manual de inseminación artificial de la especie ovina [en línea]. INTA EEA Bariloche. Arg. http://inta.gob.ar/documentos/manual-de-inseminacion-artificial-en-la-especie-ovina/ (Consulta: 25 Set. 2011)

Gibbons, A. & M. Cueto. 2004. Jornadas de inseminación artificial con semen fresco en ovinos [en línea]. INTA EEA Bariloche. Arg. http://www.inta.gov.ar/bariloche/info/documentos/animal/reproduc/ct-443.pdf (Consulta: 10 Set. 2011)

Godfrey, R.W., J.R. Collins, E.L. Hensley & J.E. Wheaton. 1999. Estrus synchronization and artificial insemination of hair sheep ewes in the tropics. Theriogenology 51: 985-997.

Granja-Salcedo, Y.T., C.S. Ribeiro-Junior, D.J. Toro-Gomez, L.G. Rivera- Calderón, M. Machado & A. Manrique-Ardila. 2012. Acidosis ruminal en bovinos lecheros: implicaciones sobre la producción y salud animal. [en línea]. Rev. Electron. Vet 13 (4). http://www.veterinaria.org/revistas/redvet. (Consulta: 4 Ene. 2015)

Hernández-Olivos, J.L. 2010. Fertilidad en ovejas de pelo sincronizadas con acetato de medroxiprogesterona y gonadotropina coriónica equina. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. Universidad Veracruzana. Veracruz, Méx.

INEC. VI Censo Nacional Agropecuario. 2010. Censo Nacional Agropecuario 2014 [en línea]: Costa Rica total de fincas con ganado ovino por cantidad de animales y sexo según provincia. Instituto Nacional de Estadística y Censos, C.R. http://www.inec.go.cr/Web/Home/GeneradorPagina.aspx. (Consulta: 26 jun. 2015)

Kennedy, D. 2012. Sheep reproduction basics and conception rates. [en línea]. Ministry of agricultura, food and rural affairs. Ont. Can. http://www.omafra.gov.on.ca/english/livestock/sheep/facts/12-037.htm.

López-Crispín, J. 2010. Relación de hallazgos de citología vaginal exfoliativa y concentraciones séricas de progesterona dentro de un esquema de sincronización de estros en ovejas de pelo. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. Universidad Veracruzana. Veracruz, Méx.

Manes, J., F. Hozbor, R. Alberio & R. Ungerfeld. 2014. Intravaginal placebo sponges affect negatively the conception rate in sheep. Small Rumin. Res. 120: 108-111.

Manes, J., M.A. Fiorentino, G. Kaiser, F. Hozbor, R. Alberio, E. Sanchez & F. Paolicchi. 2010. Changes in the aerobical vaginal flora after treatment with different intravaginal devices in ewes. Small Rumin. Res. 94: 201-204.

Martemucci, G. & A.G. D´Alessandro. 2011. Synchronization of oestrus and ovulation by short time combined FGA, $PGF_{2\alpha}$, GnRH, eCG treatments for natural service of AI fixed-time. Anim. Reprod. Sci. 123: 32-39.

Martínez-Subiela, S., F. Tecles, M.D. Parra & J.J. Cerón. 2001. Proteínas de fase aguda: conceptos básicos y principales aplicaciones en medicina veterinaria. An. Vet. 17: 97-114.

Martínez-Tinajero, J.J., F. Izaguirre-Flores, L. Sánchez-Orozco, C.G. García-Castillo, G. Martínez-Priego & G.Torres-Hernández. 2007. Comportamiento reproductivo de ovejas barbados barriga negra sincronizadas con MPA y diferentes tiempos de aplicación de eCG durante la época de baja fertilidad. Rev. Cient-Fac. Cien. V XVII: 47-52.

Martínez- Tinajero, J.J., M.T. Sánchez, G. Torres-Hernández, J.G. Herrera-Haro, L. Bucio-Alanís, R. Rojo-Rubio & J. Hernández-Martínez. 2008. Comportamiento reproductivo de ovejas F1 (Damara X Merino) sincronizadas con CIRD y dos tiempos de aplicación de GnRH. Universidad y Ciencia 24(3): 175-182.

Martins, G., L. Figueira, B. Penna, F. Brandão, R. Varges, C. Vasconcelos & W. Lilenbaum. 2009. Prevalence and antimicrobial susceptibility of vaginal bacteria from ewes treated witn progestin-impregnated intravaginal sponges. Small Rumin. Res. 81: 182-184.

Martins, L.T., P.C. dos Santos-Neto, S.G. Neto, L. Pereira-Rauber, M. Bertolini, A. Diniz-Viera & A. Mezzalira. 2010. Microbiological and functional evaluation of an alternative device (OB®) for estrous synchronization in ewes. Cienc. Rural 40: 389-395.

McGavin, M.D. & J.F. Zachary. 2007. Pathologic basis of veterinary disease. 4th. Ed. Mosby Inc. Mo. EE.UU.

McNeal, L. 1998. Ram breedeing soundness evaluation [en línea]. The Navajo Sheep Project. Utah. http://navajosheepproject.com/images/pdf/rams/bse.pdf (Consulta: 30 Agost. 2011)

Menchaca, A. & E. Rubianes. 2004. New treatments associated with time artificial insemination in small ruminants. Reprod. Fertil. Develop. 16: 403-413

Murguía-Olmedo, M.L., J.A. Pacheco-Aguirre & A.F. Castellanos-Ruelas. 2003. La rumenitis causada por acidosis ruminal no afecta la digestibilidad de los nutrimentos en los ovinos Pelibuey. Téc. Pecu. Mex. 41 (3): 329-336

Naim, P., M. Cueto & A. Gibbons. 2009. Inseminación artificial a tiempo fijo con semen ovino refrigerado. Arch. Zootec. 58: 435-440

Noakes, D.E., T.J. Parkinson & G.C.W. England (ed). 2001. Arthur´s Veterinary Reproduction and Obstetrics. 8th. ed. Saunders, London, UK.

Olivera, J., J. Gil, S. Fierro, A. Araujo, E. Filliol, G. Stoletniy. 2007. Sincronización de celos en ovinos: efecto del intervalo entre dosis de PGF2α y el momento de IA a tiempo fijo con el protocolo Synchrovine® [en línea]. In XXXV Jornadas Uruguayas de Buiatría. Jun 7-9. Centro Médico Veterinarios de Paysandú, Uruguay. http://www.ovinos-caprinos.com.ar/FERTILIDAD/Sincronizacion%20de%20celos%20en%20ovinos.pdf (Consulta: 2 Nov. 2011)

Olivera-Muzante, J., S. Fierro, V. López & J. Gil. 2011. Comparison of prostaglandin and progesterone-based protocols for time artificial insemination in sheep. Theriogenology 75: 1232-1238

Penzzanite, L., A. Bridges, M. Neary & T. Hutchens. [s.f.]. Breeding soundness examinations of rams and bucks [en línea]. Purdue University Cooperative Extension Service. United States. http://www.extension.purdue.edu/extmedia/AS/AS-599-W.pdf (Consulta: 1 Set. 2011)

Pineda, M. H. & M.P. Dooley (ed). McDonald´s veterinary endocrinology and reproduction, 5th. ed. Iowa State Press, Iowa, EEUU.

Riviere, J.E. & M.G. Papich (ed.). 2009. Veterinary pharmacology and therapeutics. 9th. ed. Wiley-Blackwell. UK

Robinson, T.J., T.D. Quinlivan & C. Baxter. 1968. The relationship between dose of progestagen and method of preparation of intravaginal sponges on their effectiveness for the control of ovulation in the ewe. J. Reprod. Fertil. 17: 471-483.

Santos, I.W., L.C. Binsfeld, R.R. Weiss & L.E Kozicki. 2010. Fertility rates of ewes treated with medroxiprogesterone and injected with equine chorionic gonadotropin plus human chorionic gonadotropin in anoestrous season. Vet. Med. Int. 2010: 1-4.

Scott, P.R. 2007. Sheep Medicine. Manson Publishing. London, UK.

Sienra, R. 2009. Acidosis en bovinos [en línea]. Guillermo Alejandro Bavera. Arg. http://www.produccionanimal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/metabolicas/metabolicas_bovinos/36-acidosis.pdf. (Consulta: 5 Ene. 2015)

Silva, B.D.M., R. Sartori, T.A. Silva, D.M.M. Cardozo, M.A.L. Oliveira & J.P. Neves. 2010. Estrus synchronization with prostaglandin F2α compared to progestogen treatment associated with equine chorionic gonadotropin (eCG) in Santa Ines breed ewes reared in Federal District, Brazil. Ci. Anim. Bras. 11(2): 417-424.

Simonetti, L., M.R. Blanco & J.C. Gardón. 2000. Estrus synchronization in ewes treated with sponges impregnated with different doses of medroxiprogesterone acetate. Small Ruminant Res. 38: 243-247.

Squires, E.J. 2003. Applied Animal Endocrinology. CABI Publishing. UK.

Thompson, J. & H. Meyer. 1994. Body condition scoring of sheep [en línea]. Oregon State University Extension Service. United States.

http://ir.library.oregonstate.edu/xmlui/bitstream/handle/1957/14303/ec1433.pdf;jsessionid=88471CD05DC32B17C93CE09FD511076D?sequence=1 (Consulta: 1 Set. 2011)

Ungerfeld, R., G. Suárez, B. Carbajal, L.Silva, M. Laca, M. Forsberg & E. Rubianes. 2003. Medroxiprogesterone priming and response to the ram effect in Corriedale ewes during the nonbreeding season. Theriogenology 60: 35-45.

Uribe-Velásquez, L.F., E. Oba & M.I.L. Souza. 2008. Población folicular y concentraciones plasmáticas de progesterona (P4) en ovejas sometidas a diferentes protocolos de sincronización. Arch. Med. Vet. 40:83-88.

Vyas, D. A. Uwizeye, W.Z. Yang & K.A. Beauchemin. Importance of the yeast viability of reducing the effects of ruminal acidosis in beef heifers during and following and imposed acidosis challenge. 2014. Anim. Feed Sci. Technol. 197(2014):103-113

Zarwaki, M. 2001. Oestrous and twinning rate of Syrian Awassi ewes treated with progesterone and PMSG during the breeding season. New Zeal J. Agr. Res. 44: 159-163.

Wang, D.S., R.Y. Zhang, W.Y. Zhu & S.Y. Mao. 2013. Effects of subacute ruminal acidsis challenge on fermentation and biogenic amines in the rumen of dairy cows. Livestock Science 155 (013): 262-272

Wulster-Radcliffe, M.C., S. Wang & G.S. Lewis. 2004. Transcervical artificial insemination in sheeps: effects of a new transcervical artificial insemination instrument and traversing the cervix on pregnancy and lambing rates. Theriogenology. 62: 990-1002.

ANEXOS

ANEXO N°1

Hallazgos Ecográficos de las ovejas del estudio

Durante las diferentes giras que formaron parte de las actividades de campo de este proyecto se realizaron en total 584 ultrasonidos (US) con el fin de determinar el estado gestacional de las hembras, observándose principalmente el útero. En la Figura 24 se detallan los porcentajes de los hallazgos generales y en el Cuadro 8 se muestran los valores obtenidos en cada finca visitada.

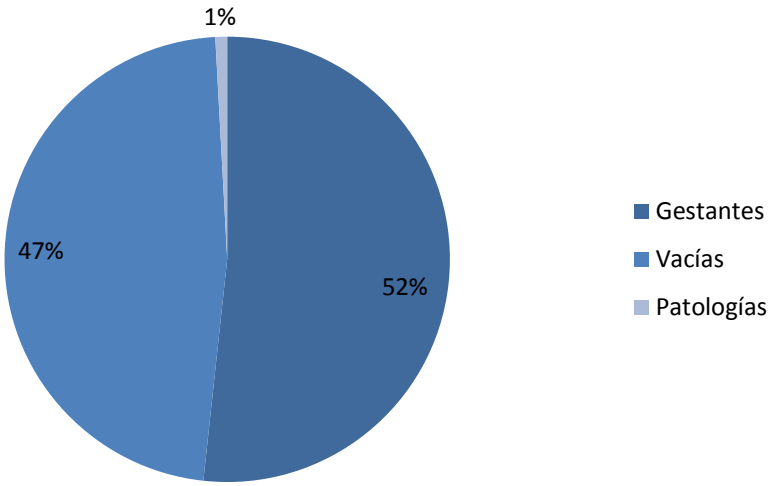

Figura 24. Hallazgos observados en los diagnósticos ecográficos.

Cuadro 8. Detalle de los hallazgos ecográficos por finca

Finca	Total de US	Observación de gestación	Útero vacío	Patologías
A	102	54	45	3
B	65	24	41	
C	40	23	17	
D	12	4	8	
E	173	100	73	
F	160	84	74	2
Finca Santa Lucía	27	13	15	
Escuela MedVet	5	0	5	
Totales	584	302	277	5

De las patologías encontradas se observaron tres piómetras, una mucómetra (Figura 25) y una reabsorción.

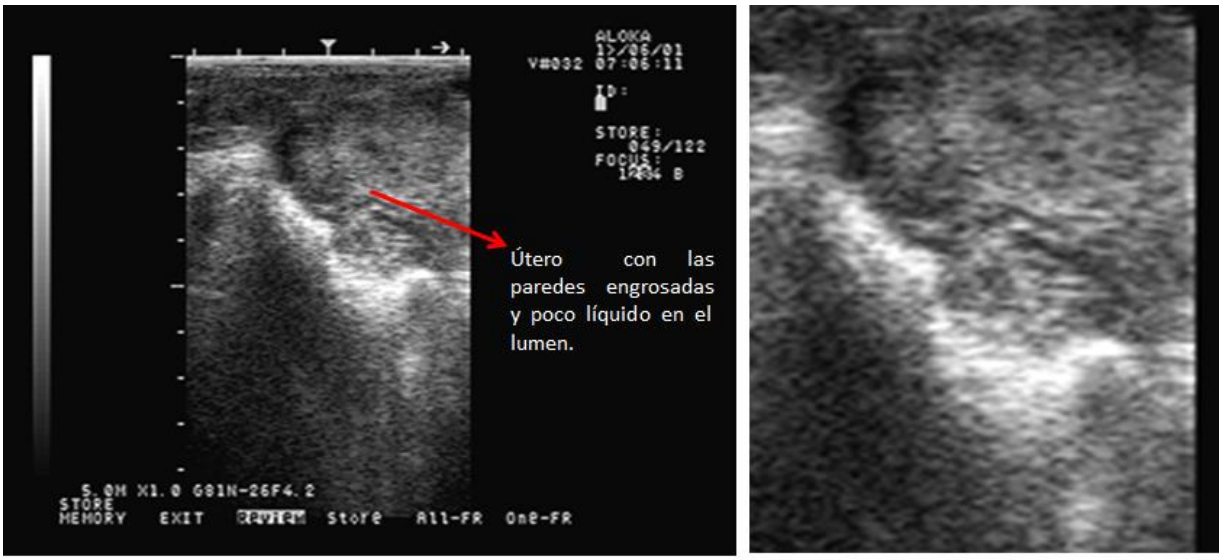

Figura 25. Mucómetra.

En las Figuras 26 y 27 se muestran imágenes de diversos cortes de úteros vacíos.

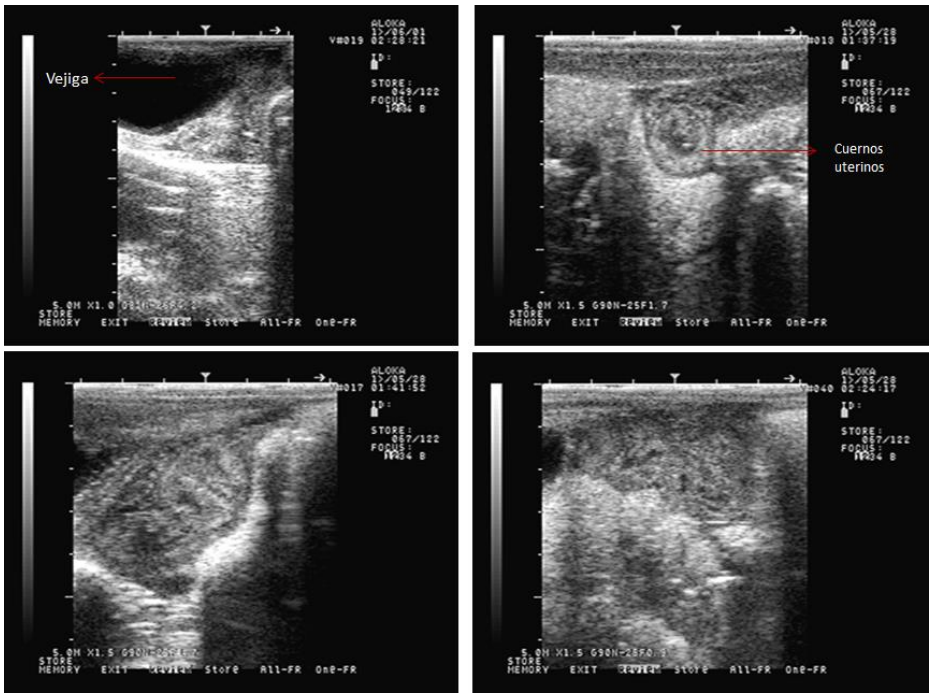

Figura 26. Cortes transversales de los cuernos uterinos de hembras vacías.

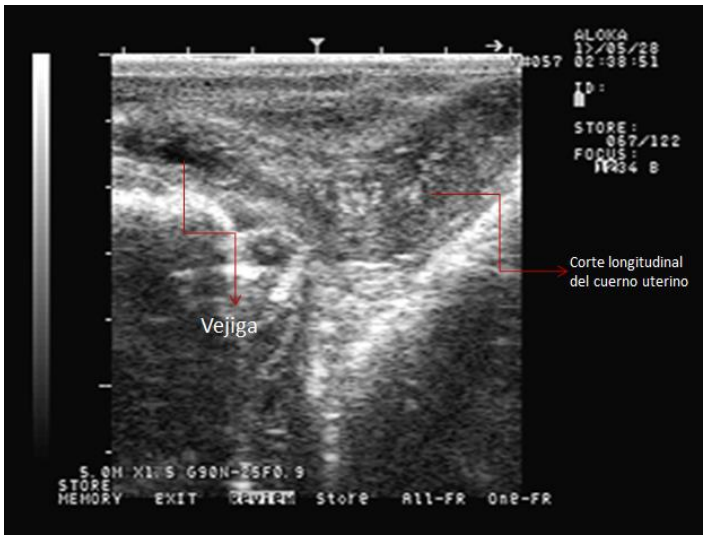

Figura 27. Corte longitudinal de los cuernos uterinos de hembras vacías

En la Figura 28 se muestra un cuerno uterino de una hembra en estro en la que se observa el filamento ondulante característico.

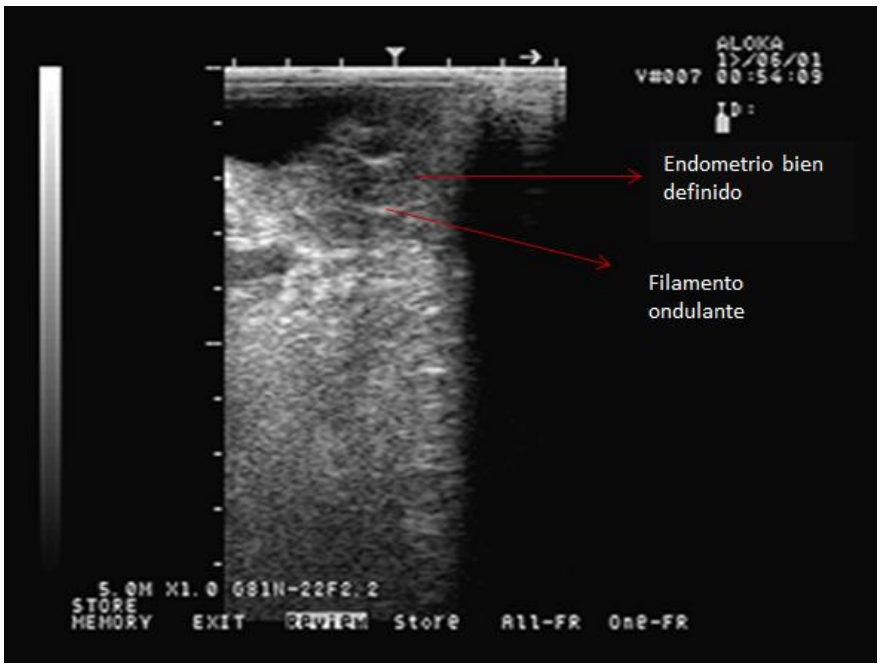

Figura 28. Endometrio de una hembra vacía en estro

ANEXO N° 2

Acidosis Ruminal Subaguda: descripción del caso clínico

Durante la implementación del protocolo de sincronización, específicamente el día 0 del tratamiento, se observó que los animales pertenecientes a la Finca B presentaban heces suaves, baja condición corporal, pelo áspero. A la inspección vaginal se observó que la mucosa vaginal se encontraba enrojecida y, en algunas hembras, se encontraron restos de heces en el vestíbulo vaginal. En visitas posteriores se observaron los machos postrados ya que presentaban una severa laminitis, tanto en miembros anteriores como en los posteriores. Las hembras se encontraban en pastoreo y los machos eran alimentados con silo y heno de paca. Además eran suplementados con concentrado molido dos veces por día. Al realizar la anamnesis respectiva, se determinó que la suplementación con concentrado era excesiva, en cantidad y frecuencia. Este aumento en la cantidad de concentrado administrado a los animales se dio con el objetivo de implementar un "flushing" alimenticio con el fin de mejorar los resultados reproductivos que se esperaban obtener con el protocolo de sincronización.

La acidosis ruminal es una condición provocada por la disfunción ruminal derivada de la ingestión de cantidades excesivas de hidratos de carbono de fácil digestión, lo que provoca un bajo pH ruminal causado por la acumulación de ácidos grasos volátiles (AGV) y ácido láctico. (Sienra, 2009; Vyas, D., et al, 2014; Wang, D., et al, 2013). Adicionalmente, el déficit en la producción de saliva, debido a la carencia de fibra, favorece le descenso del pH en el rumen (Sienra, 2009). La alta acidosis provoca la muerte de algunos microorganismos ruminales y favorece la proliferación de bacterias ácido tolerantes, que producen lactato, generando una exagerada producción de ácido láctico y manteniendo el pH ruminal en valores bajos lo que conduce a la acidosis metabólica y a la aparición de signos clínicos (Granja-Salcedo et al., 2012).

La acidosis ruminal se clasifica en aguda o subaguda (SARA por sus siglas en inglés). En la aguda los animales afectados evidencian signos clínicos de 2-4 horas luego de la ingestión del grano y presentan anorexia, depresión creciente, diarrea de color claro, ataxia y en el transcurso de horas presentan severa deshidratación, debilidad y postración. En los casos

graves el animal no se reincorpora y muere. Los animales que se recuperan tiene una convalecencia prolongada por la rumenitis crónica y secuelas como la formación de abscesos hepáticos (Sienra., 2009; Granja-Salcedo et al., 2012).

La acidosis ruminal subaguda es consecuencia de periodos transitorios repetidos de pH ruminal moderadamente bajos que no son suficientes para producir la sintomatología aguda. Los signos y lesiones que produce son disminución en el consumo de materia seca, pérdida del estado corporal, pelo opaco y de mal aspecto, menor consistencia de la materia fecal e hiperqueratosis del rumen (Sienra., 2009; Granja-Salcedo et al., 2012). También se asocia a desplazamientos de abomaso, laminitis, abscesos hepáticos, infertilidad, disminución en la calidad de la leche o carne, aumento en la morbilidad y mortalidad de las crías e inmunosupresión (Bouda et al., 1997; Granja-Salcedo et al., 2012).

La laminitis es causada por un aumento en el flujo de sangre y en el pulso digital, consecuencia de los cambios en el pH ruminal y sanguíneo, que provoca una ruptura en los vasos capilares en las anastomosis arteriovenosas de la pezuña, que se traduce en la irritación y aparición de úlceras en el corión, con un crecimiento constante y exacerbado de la pezuña y claudicación (Murguía-Olmedo, et al., 2003). En el caso en cuestión, los machos respondieron a la terapia con vendajes y hielo local, fluidos intravenosos, antiinflamatorios no esteroideos y bicarbonato por vía oral.

ANEXO N° 3

Resultados hematológicos de las Fincas A y B

En el Cuadro 9 y el Cuadro 10 se detallan los resultados obtenidos al realizar los hemogramas el día 0 y el día 12 del tratamiento para la Finca A y la Finca B.

Cuadro 9. Leucograma día 0 vs. día 12 en la Finca A (número de células/µl).

ID	LE_0	LE_{12}	NE_0	NE_{12}	EO_0	EO_{12}	LO_0	LO_{12}
1	12500	8200	3750	2460	2750	820	6000	4950
2	13500	5450	6075	2834	3915	1417	3510	1199
3	11450	4850	4694	2619	1374	194	5381	2037
4	13700	3350	7672	1239	2192	0	3836	2110
5	17450	8850	4188	3540	3490	442	9792	4867
6	12650	7650	3415	4207	939	0	8475	3442
7	13550	9000	5420	5130	3523	0	4607	3870
8	12500	5500	3000	1210	1750	0	7750	4290
9	8700	4200	1566	1932	1566	0	5394	2268
∅	12888,8	6338,8	4420	2796	2388,7	410,4	6082,7	3225,8

LE: Leucocitos; NE: Neutrófilos; EO: Eosinófilos; LO: Linfocitos; ∅: Promedio.

Cuadro 10. Leucograma día 0 vs. día 12 en la Finca B (número de células/µl).

ID	LE_0	LE_{12}	NE_0	NE_{12}	EO_0	EO_{12}	LO_0	LO_{12}
1	10300	12700	1442	3683	1957	1270	6695	7747
2	9000	12000	2340	2640	1530	1320	5040	8040
3	10900	11800	1308	3068	1308	1537	6867	7198
4	10950	11950	1752	3943	219	717	8650	7289
5	11400	17650	3420	7589	2736	2471	5244	7589
6	7950	6950	2554	3197	2067	486	3339	3366
7	8800	13600	3784	7344	616	272	4312	5984
∅	9900	12378,5	2371,4	4494,8	1490,4	1153,3	5735,3	6744,7

LE: Leucocitos; NE: Neutrófilos; EO: Eosinófilos; LO: Linfocitos; ∅: Promedio .