

ACTUALIZACIÓN EN PROTOCOLOS PARA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL A TIEMPO FIJO EN OVEJAS

Update on protocols for fixe-timed artificial insemination in sheep

Federico Cuadro^{1,2}, Pedro C. dos Santos-Neto², Alejo Menchaca^{1,2} *

¹ Instituto de Reproducción
Animal Uruguay,
Fundación IRAUy,
Montevideo, Uruguay.

² Instituto Nacional de
Investigación
Agropecuaria (INIA),
Montevideo, Uruguay.

* Corresponding author:
Alejo Menchaca,
e-mail:
menchaca.alejo@gmail.com

Recibido: 07/04/2022

Aceptado: 11/05/2022

Publicado: 31/07/2022

ABSTRACT

Fixed-time artificial insemination (FTAI) in cattle has had a marked growth in South American countries in the last two decades, mainly based in the use of pharmacological treatments with estradiol and progesterone. To improve the pregnancy rate obtained with this technology, the focus has recently been on other aspects of the hormonal protocols that had not been considered previously. The most novel approaches propose studying preovulatory strategies to improve postovulatory conditions to improve pregnancy outcomes. In this paper we review the main results obtained by extending the proestrus length (i.e., the interval from progesterone removal to insemination). The results show that these new approaches allow an improvement in pregnancy rate, which deserves to be taken into account to be included in the implementation of FTAI programs.

Keywords: FTAI, Synchronization, ovulation, short treatments, small ruminants

RESUMEN

La Inseminación Artificial a Tiempo Fijo (IATF) es una importante herramienta en los sistemas ganaderos y probablemente la biotecnología reproductiva que más ha crecido en los últimos años, tanto en vacas como en ovejas y cabras. Sin embargo, para lograr programas reproductivos exitosos, se necesita un amplio conocimiento sobre la fisiología reproductiva y de los protocolos hormonales utilizados. Esta revisión tiene como objetivo mencionar los aspectos más relevantes vinculados a la fisiología reproductiva de las ovejas, que permitirá comprender y abordar de forma exitosa los protocolos hormonales para IATF en ovinos. Se realiza una actualización de los trabajos científicos más recientes que nuestro laboratorio ha desarrollado vinculados al control de la ovulación e IATF en ovinos.

Palabras clave: IATF, , sincronización, ovulación, tratamientos cortos, pequeños rumiantes

INTRODUCCION

El uso de la ultrasonografía transrectal para el estudio de la dinámica folicular en distintas especies permitió determinar de manera inequívoca que el crecimiento folicular se realiza por ondas, tanto en ovinos (Ginther et al., 1995; Evans, 2003) como en caprinos (Ginther et al., 1994; de Castro et al., 1999). Las ondas foliculares fueron reportadas durante la estación reproductiva (Ginther et al., 1995; Rubianes et al., 1996), anestro estacional (Souza et al., 1996), y durante la gestación (Bartleswki et al., 2000). Durante la fase luteal, el anestro estacional y la gestación, el folículo dominante no alcanza la ovulación y regresa a la atresia, lo que lleva nuevamente al inicio de una nueva onda folicular. Durante la fase folicular en cambio, el folículo preovulatorio de la última onda folicular continúa creciendo y alcanza la ovulación. Las principales características de las ondas foliculares en ovejas pueden resumirse en: 1) durante una onda folicular, al menos un folículo es seleccionado y alcanza un diámetro de 5 mm o más; 2) El folículo seleccionado (folículo dominante) crece durante 5-7 días, con una tasa de 1 mm/día; 3) el diámetro máximo de los folículos dominantes de cada onda dentro de un ciclo estral son diferentes, siendo el folículo de la primera onda y el folículo de la onda ovulatoria los de mayor diámetro; 4) el folículo de mayor diámetro el día de la luteólisis es el que alcanza la ovulación; 5) en ciclos con ovulación doble, los folículos ovulatorios emergen de la misma onda folicular; 6) si la ovulación ocurre con más de un folículo, el intervalo de ovulación es menor a 12 horas.

Desde que se demostró la existencia de las ondas foliculares, se han propuesto nuevas estrategias para el control de la ovulación e Inseminación Artificial a Tiempo Fijo (IATF). En esta actualización mencionamos los trabajos más recientes que nuestro laboratorio ha desarrollado, y también incluiremos información publicada por otros grupos de investigación que merecen una revisión adicional.

PROGESTERONA Y DINÁMICA FOLICULAR

Los primeros reportes de sincronización del estro en ovinos con el uso de dispositivos intravaginales impregnados con progesterona o sus análogos sintéticos datan de principio de la década de los 60s con los trabajos pioneros de T.J. Robinson (revisado por González-Bulnes et al., 2020). Sin embargo, debieron pasar más de 30 años hasta que en los 90s se publicaron los primeros estudios científicos donde se estudió el efecto de la progesterona sobre la dinámica folicular en ovejas (Rubianes et al., 1996; Leyva et al., 1999; Viñoles et al., 1999). Estos estudios demostraron que los niveles de progesterona circulante tienen relación negativa con el tamaño del folículo dominante, es decir, altos niveles de progesterona (>2 ng/mL) causan regresión del folículo dominante y acelera el recambio folicular. Por el contrario, bajas concentraciones de esta hormona en niveles subluteales (<2 ng/mL) inducen al aumento de la frecuencia de los pulsos de LH, promoviendo el crecimiento excesivo del folículo dominante, convirtiéndolo en un folículo persistente con la consecuente ovulación de un ovocito de menor fertilidad (revisado por Menchaca y Rubianes, 2004). Estos avances permitieron establecer que para que un protocolo sea realmente eficaz para sincronizar el celo, debe asegurar el recambio folicular e inducir la ovulación de un folículo joven con un ovocito saludable y de buena fertilidad.

PROTOCOLOS CORTOS CON PROGESTERONA

En los últimos años se ha incrementado el interés por eliminar la detección de celo y realizar la inseminación de manera más simple, surgiendo entonces la necesidad de mejorar los protocolos de IATF. Por lo tanto, el comportamiento del estro pasó a un segundo plano y los grupos de investigación han puesto foco en tratamientos que mejoren el control de la dinámica folicular y la ovulación. Los protocolos de IATF más populares se basan en tratamientos con progesterona y gonadotropina coriónica equina (eCG). En ovejas y cabras la administración de progesterona se realiza de manera intravaginal usando dispositivos de silicona tipo CIDR o de poliuretano tipo esponjas. En los primeros años estos dispositivos se utilizaban por 12 a 14 días (protocolos tradicionales), siempre asociado a una dosis de eCG en el momento de retirar el dispositivo. Esta técnica es basada en el rol inhibitorio que ejerce la progesterona sobre el eje hipotálamo-hipófisis, actuando como un cuerpo lúteo exógeno.

La información publicada posteriormente sobre dinámica folicular, endocrinología y control del cuerpo lúteo, abrió nuevos cuestionamientos sobre el uso de estos tratamientos largos. Con el pasar de los años y muchos trabajos de investigación, se concluyó que el período de exposición de 12-14 días era innecesario y por diferentes motivos era recomendable modificarlo. Cuando se coloca un dispositivo intravaginal de silicona con 0,3 g de progesterona en ovejas y cabras, el tratamiento induce un incremento rápido de la concentración sanguínea de esta hormona (>5 ng/mL) durante 4 a 5 días aproximadamente, estos niveles hormonales son similares a los observados durante fase luteal media y tardía (Menchaca y Rubianes, 2004). Sin embargo, después del día 6-7 de tratamiento, las concentraciones sanguíneas de esta hormona disminuyen a niveles bastante bajos (<2 ng/mL) que son suficientes para bloquear la ovulación, pero son insuficientes para promover el recambio folicular generando folículos persistentes (Menchaca y Rubianes, 2004). Por lo tanto, al mantener un dispositivo intravaginal durante 12 a 14 días se inducen bajas concentraciones de progesterona circulante durante un periodo excesivo de tiempo, determinado la formación de un folículo persistente con una disminución en la fertilidad.

Diferentes estudios han demostrado que para inducir estro en anestro estacional, no es necesario la exposición de progesterona durante largos periodos de tiempo como 14 días. Ungerfeld y Rubianes (1990) demostraron que 3 días de tratamiento con acetato de medroxiprogesterona (MAP) fue igual de efectivo para inducir el estro que tratamientos de 6 o 12 días en ovejas en anestro estacional. Este estudio fue asociado con monta natural y la tasa de preñez fue similar entre los tres periodos de tratamiento.

Teniendo en cuenta esta información y con el objetivo de evitar la ovulación de un folículo persistente, hace algunos años pusimos en práctica los Tratamientos Cortos que consiste en un protocolo con dispositivo de progesterona transvaginales durante 6 a 7 días (revisado por Menchaca y Rubianes, 2004). Este tratamiento es asociado con la administración de 300 UI de eCG y una dosis luteolítica de PGF $_{2\alpha}$ al momento de retirar el dispositivo. Este es el protocolo más recomendable en la actualidad (Figura 1).

Tratamientos Cortos

Menchaca & Rubianes 2004



Figura 1. Tratamientos Cortos para IATF en ovejas y cabras. Al retirar el dispositivo se administra 300 UI de eCG y una dosis luteolítica de PGF2alfa. La IATF en ovejas se realiza entre las 48 h y 54 h de retirar el dispositivo.

Como resultado de varios estudios en serie realizado durante varios años, se ha publicado mucha información de este protocolo tanto en cabras como en ovejas, en estación reproductiva y anestro estacional, con diferentes dispositivos intravaginales, evaluando diferentes dosis y análogos de PGF2 α , asociado a monta natural, inseminación con detección de celo y en programas de IATF a gran escala (Menchaca y Rubianes, 2004, Menchaca et al., 2007, Vilariño et al., 2010; 2011; 2013 dos Santos Neto et al., 2015).

PERIODO DE EXPOSICIÓN A LA PROGESTERONA

En diversos estudios realizados a gran escala y con un buen número de animales, hemos comparado el Tratamiento Corto (6 días) vs. Tratamiento Largo o Tradicional (12 a 14 días), todos los experimentos que vamos a describir se realizaron usando dispositivos de silicona intravaginales (0,3 g de Progesterona) e IATF. En un experimento, sobre 1.750 ovejas multíparas que fueron inseminadas por vía intrauterina usando laparoscopia, la tasa de preñez fue significativamente mayor en las ovejas que recibieron un Tratamiento Corto comparadas con las ovejas que recibieron el Tratamiento Largo (43,5% vs. 37,8%, respectivamente; $P < 0.05$). En un siguiente experimento realizado sobre 922 ovejas multíparas que fueron inseminadas a tiempo fijo y usando semen fresco por vía cervical. Las ovejas fueron tratadas con Tratamientos Corto (6 días) vs. Largo (14 días) utilizando dispositivo intravaginal tipo CIDR de segundo uso (en ambos casos, previamente los dispositivos habían sido utilizados durante 6 días). Nuevamente la tasa de preñez fue mayor en el grupo de Tratamiento Corto que con el Tratamiento Largo (41.2% vs. 29.1%, respectivamente; $P < 0.05$). Esta información genera evidencia adicional al concepto antes mencionado que el uso de dispositivos intravaginales durante periodos largos, disminuyen los niveles de progesterona y se predispone a condiciones negativas que bajan la fertilidad de la hembra.

DISPOSITIVOS INTRAVAGINALES Y ANÁLOGOS DE PROGESTERONA

Durante estos años hemos evaluados diferentes dispositivos intravaginales y tipos de progesterona. Uno de ellos fue el dispositivo de silicona DICO (Dispositivo Intravaginal Caprino y Ovino, Syntex), que al igual que el dispositivo original disponible a nivel comercial llamado CIDR-G (Zoetis) son elaborados en una matriz de silicona que contienen 0,3 g de progesterona. Al evaluar ambos dispositivos, DICO vs CIDR, no se encortaron diferencias en los niveles de progesterona sérica, dinámica folicular, tiempo de ovulación o tasa de preñez (Vilariño et al., 2010; dos Santos Neto et al., 2015). La mayor disponibilidad en el mercado de distintos dispositivos

intravaginales, así como otros productos hormonales e insumos necesarios para aplicar esta tecnología, facilitan el acceso y la adopción por el sector productivo.

Usando un Tratamiento Corto, estos dispositivos de silicona con progesterona fueron comparados con esponjas intravaginales que contienen 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP). La tasa de preñez por IATF fue menor cuando se utilizó las esponjas con MAP en comparación con los dispositivos de silicona, tanto para inseminación cervical como intrauterina por laparoscopia (dos Santos Neto et al., 2015). Además del tipo de progesterona y sus diferencias farmacocinéticas, las características del dispositivo elaborado con silicona o con esponjas también podrían afectar la fertilidad de las ovejas. Manes et al. (2014) demostraron que colocar una esponja intravaginal impregnada con placebo (es decir, sin MAP) durante 13 días antes de un celo espontáneo disminuye la tasa de preñez en comparación con las ovejas que no recibieron una esponja. Al igual que ha ocurrido en vacas, la tendencia en el mundo es a utilizar dispositivos intravaginales en base a silicona y posiblemente con el pasar de los años las esponjas vayan quedando en desuso.

REUTILIZACIÓN DE LOS DISPOSITIVOS INTRAVAGINALES

Los dispositivos de silicona intravaginales (es decir, CIDR-G y DICO) fueron diseñados para su uso durante 14 días, al acortar el tratamiento a 6 días surgió la pregunta si era posible reutilizar estos dispositivos. Con este objetivo, en una serie de experimentos en ovejas y cabras evaluamos la eficacia de los dispositivos nuevos, de segundo y tercer uso (Vilariño et al., 2010; 2013; dos Santos Neto et al., 2015). La proporción de ovejas y cabras que mostraron celo y ovularon no fue afectada por el uso de los dispositivos nuevos, de segundo o tercer uso. Sin embargo, la tasa de preñez fue levemente menor con el dispositivo usado por tercera vez, en comparación con los dispositivos nuevos o de segundo uso. A su vez, en cabras la tasa de preñez con los dispositivos de segundo uso fue intermedia entre los dispositivos nuevos y de tercer uso. En ambas especies la inserción de un dispositivo nuevo indujo recambio folicular en todas las hembras, sin embargo, cuando se utilizaron los dispositivos nuevamente (por segunda o tercera vez) en el 20% de las hembras no se observó recambio folicular. En estas hembras se produjo la ovulación de un foliculo grande y de mayor edad (foliculo persistente). Esto podría explicar la menor tasa de preñez en las hembras que fueron tratadas con los dispositivos reutilizados, principalmente en el tercer uso. Como conclusión, los resultados muestran que es posible reutilizar los dispositivos teniendo en cuenta que la tasa de preñez se puede ver levemente disminuida. Por lo tanto, la decisión de reutilizar los dispositivos con silicona requiere de un estudio costo-beneficio y tiene que ser considerada caso a caso.

MOMENTO DE LA IATF

Los trabajos de dinámica folicular con ultrasonografía permitieron demostrar que al aplicar un Tratamiento Corto la ovulación en promedio ocurre a las 60 h de retirado el dispositivo, tanto en ovejas (Vilariño et al., 2010; 2013) como en cabras (Menchaca y Rubianes, 2004; Menchaca et al., 2007; Vilariño et al., 2011). Considerando que la inseminación debe realizarse algunas horas antes de que ocurra la

ovulación, el momento óptimo de IATF de este protocolo utilizando dispositivos de silicona intravaginal fue evaluado sobre 3.893 ovejas (datos sin publicar). Las ovejas fueron inseminadas entre las 46 h y 56 h de haber retirado el dispositivo, y cuando se realizó IATF por vía intrauterina con laparoscopia, la mayor tasa de preñez fue obtenida cuando la inseminación se realizó entre las 52 h y 56 h del retiro de los dispositivos. Sin embargo, con inseminación por vía cervical con semen fresco, la tasa de preñez fue mayor cuando la inseminación se realizó entre las 46 h y 50 h del retiro de los dispositivos. Estos resultados se vieron modificados cuando usamos un dispositivo intravaginal que ya había sido usado previamente (usado una o dos veces durante 6 días), no habiendo diferencia de inseminar entre las 46 h y 50 h o entre las 52 h y 56 h de retirar el dispositivo, tanto para inseminación intrauterina como cervical.

CONCLUSIONES

Los estudios sobre dinámica folicular de la oveja y cabra demuestran que el uso de dispositivos intravaginales durante 14 días, no son adecuados para asegurar una alta fertilidad de las hembras. Por esta razón ya hace algunos años propusimos acortar el tiempo de tratamiento de progesterona para protocolos de IATF a 6 - 7 días. Este Tratamiento Corto incluye una dosis de PGF2 α y eCG al retirar el dispositivo. La IATF debe realizarse entre las 46 y 56 h del retiro del dispositivo dependiendo de la vía de inseminación y la cantidad de progesterona que contenga el dispositivo (es decir, dispositivos nuevos o reutilizados). El uso de tratamientos cortos resulta en una serie de beneficios, tales como una mejor respuesta folicular, una aceptable tasa de fertilidad, una menor duración del tratamiento facilitando el trabajo a gran escala, y en algunos casos la reutilización de dispositivos. Todas estas ventajas tienen gran importancia e implicancias prácticas cuando vamos a organizar y realizar un programa de IATF en ovinos.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Contribución de los autores

Los autores de este trabajo prepararon el artículo y contribuyeron de manera similar con las figuras y referencias del mismo, y todos realizaron los ajustes finales y la supervisión de la escritura del artículo.

REFERENCIAS

- Adams GP. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *J Reprod Fertil Suppl.* 1999;54:17-32.
- Bartlewski PM, Vanderpol J, Beard AP, Cook SJ, Rawlings NC. Ovarian antral follicular dynamics and their associations with peripheral concentrations of gonadotropins and ovarian steroids in anoestrous Finnish Landrace ewes. *Anim Reprod Sci.* 2000;58(3-4):273-291. doi:10.1016/S0378-4320(99)00092-5
- de Castro T, Rubianes E, Menchaca A, Rivero A. Ovarian dynamics, serum estradiol and progesterone concentrations during the interovulatory interval in goats. *Theriogenology.* 1999;52(3):399-411. doi:10.1016/S0093-691X(99)00138-7
- dos Santos Neto PC, García Pintos C, Pinczak A, Menchaca A. Fertility obtained with different progestogen intravaginal devices using Short-term protocol for fixed-time artificial insemination (FTAI) in sheep. *Livestock Sci.* 2015; 182:125-128.
- Evans AC. Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. *Anim Reprod Sci.* 2003;78(3-4):289-306. doi:10.1016/S0378-4320(03)00096-4
- Ginther OJ, Kot K. Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. *Theriogenology.* 1994;42(6):987-1001. doi:10.1016/0093-691X(94)90121-X
- Ginther OJ, Kot K, Wiltbank MC. Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. *Theriogenology.* 1995;43(3):689-703. doi:10.1016/0093-691X(94)00074-5
- Gonzalez-Bulnes A, Menchaca A, Martin GB, Martinez-Ros P. Seventy years of progestagen treatments for management of the sheep oestrous cycle: where we are and where we should go. *Reprod Fertil Dev.* 2020;32(5):441-452. doi:10.1071/RD18477.
- Leyva V, Buckrell BC, Walton JS. Regulation of follicular activity and ovulation in ewes by exogenous progestagen. *Theriogenology.* 1998;50(3):395-416. doi:10.1016/S0093-691X(98)00148-4
- Manes J, Hozbor F, Alberio R, Ungerfeld R. Intravaginal placebo sponges affect negatively the conception rate in sheep. *Small Rumin. Res.* 2014; 120: 108-111.
- Menchaca A, Rubianes E. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reprod Fertil Dev.* 2004;16(4):403-413. doi:10.10371/RD04037
- Menchaca A, Miller V, Salveraglio V, Rubianes E. Endocrine, luteal and follicular responses after the use of the short-term protocol to synchronize ovulation in goats. *Anim Reprod Sci.* 2007;102(1-2):76-87. doi:10.1016/j.anireprosci.2006.10.001
- Rubianes E, de Castro T, Carbajal B. Effect of high progesterone levels during the growing phase of the dominant follicle of wave 1 in ultrasonically monitored ewes. *Can J Anim Sci.* 1006; 76:473-475.
- Souza CJ, Campbell BK, Baird DT. Follicular dynamics and ovarian steroid secretion in sheep during anoestrus. *J Reprod Fertil.* 1996;108(1):101-106. doi:10.1530/jrf.0.1080101
- Ungerfeld R, Rubianes E. Effectiveness of short progestagen priming for the induction of fertile oestrus with eCG in ewes during late seasonal anoestrus. *Anim Sci.* 1999; 68: 349-353,
- Vilariño M, Rubianes E, Menchaca A. Re-use of intravaginal progesterone devices associated with the Short-term Protocol for timed artificial insemination in goats. *Theriogenology,* v.75, p.1195-1200, 2011.
- Vilariño M, Rubianes E, Menchaca A. Re-use of intravaginal progesterone devices associated with the Short-term Protocol for timed artificial insemination in goats. *Theriogenology.* 2011;75(7):1195-1200. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.11.030

- Vilarinho M, Rubianes E, Menchaca A. Ovarian responses and pregnancy rate with previously used intravaginal progesterone releasing devices for fixed-time artificial insemination in sheep. *Theriogenology*. 2013;79(1):206-210. doi:10.1016/j.theriogenology.2012.10.007
- Viñoles C, Meikle A, Forsberg M, Rubianes E. The effect of subluteal levels of exogenous progesterone on follicular dynamics and endocrine patterns during early luteal phase of the ewe. *Theriogenology*. 1999;51(7):1351-1361. doi:10.1016/s0093-691x(99)00079-5.