

# Medroxiprogesterona acetato para la elaboración de dispositivos intravaginales caseros usados en la sincronización del estro en ovinos de pelo: Evaluación de su eficacia, sus efectos secundarios y comparación con un dispositivo comercial en hatos de Costa Rica.

## Medroxyprogesterone acetate in homemade intravaginal devices for estrus synchronization in hair ewes: Evaluation of efficacy, adverse effects and comparison with a commercial device in Costa Rican herds.

González, Silvia<sup>1</sup>; Luna-Tortós, Carlos<sup>2</sup>✉

1. Médico veterinario. Práctica privada, [sil\\_gonzn@yahoo.es](mailto:sil_gonzn@yahoo.es)

2. Cátedra de Farmacología y Toxicología, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Heredia.

**Recibido:** 3 de Abril de 2017. **Corregido:** 14 de Junio de 2017. **Aceptado:** 28 de Junio de 2017.

### Resumen

El objetivo del trabajo fue determinar la eficacia farmacológica y los efectos secundarios de un dispositivo intravaginal de fabricación casera elaborado con acetato de medroxiprogesterona para la sincronización del estro en ovinos de pelo. Se incluyeron un total de 78 hembras adultas, multíparas y ciclando en un estudio de dos etapas. En la primera etapa se utilizaron 18 animales con el objetivo de analizar la eficacia y los efectos secundarios del dispositivo de elaboración casera. En la segunda etapa se utilizaron 60 hembras divididas aleatoriamente en dos grupos: (G1) dispositivo casero (n=30), (G2) dispositivo comercial (n=30). El fin de esta etapa fue comparar la tasa de sincronización de celos y la tasa de concepción por monta natural. Para la sincronización se colocó el dispositivo con 60mg de acetato de medroxiprogesterona durante 12 días, con inyección de 200 UI de eCG y 5 mg de dinoprost trometamina al retirar del dispositivo. Se evaluaron andrológicamente 13 machos, de los cuales 4 fueron descartados por ser insatisfactorios y se utilizaron 8 machos satisfactorios durante ambas fases del estudio. En ambas etapas la presentación de celo fue nula durante la presencia del dispositivo y 100% presentaron celo 48 horas después de su retiro. Los efectos adversos en la primera etapa fueron: Vaginitis leve al día 12 en todas las hembras, 3 presentaron adherencias, 2 hembras con aumento de fibrinógeno el día 12 y una disminución general de los leucocitos. En la segunda etapa no hubo diferencias en la sincronización entre los grupos, la tasa de concepción fue de 80,0% y 76,7% en G1 y G2, respectivamente. Basado en los resultados de este trabajo, el dispositivo intravaginal de fabricación casera es efectivo para la sincronización del estro en ovinos de pelo y para la obtención de altas tasas de preñez por monta natural.

**Palabras clave:** Sincronización del estro, ovinos, medroxiprogesterona acetato.

### Abstract

The goal of our study was to determine the pharmacological efficacy and adverse effects of a homemade intravaginal device containing medroxiprogesterone acetate for estrus synchronization in hair ewes. A total of

✉ Autor de correspondencia: [carlos.luna.tortos@una.cr](mailto:carlos.luna.tortos@una.cr)

78 adult, multiparous, cycling females were included in the two-phase experiment. During the first phase 18 ewes were included, and the efficacy and adverse effects of the homemade device were evaluated. In the second phase 60 ewes were aleatory assigned into two experimental groups: (G1) homemade intravaginal device (n-30), and (G2) commercial device (n-30) with the goal of comparing the estrus synchronization rate and conception rate among groups when using natural mating. The protocol consisted of 12-days treatment with 60mg of medroxyprogesterone acetate (MAP) by using the intravaginal device, followed by 200 UI eCG and 5 mg dinoprost tromethamine injection on day 12. A total of 13 males were tested by complete andrological evaluation, 8 were included as satisfactory males for the experiments. During both phases no signs of estrus were observed during the treatment with MAP, and 100% showed estrous signs 48 hours after device withdrawal. Adverse effects observed in the first part included: Mild vaginitis in all ewes, 3 females presented adherences, 2 showed fibrinogen increase at day 12, and a general lower leucocyte count after treatment was observed. In the second phase, no differences were observed among groups, and conception rates were 80.0% and 76.7% for G1 and G2 respectively. We conclude that the homemade intravaginal device is as effective as a commercial one for estrus synchronization, which allows obtaining high pregnancy rates in hairy sheep in Costa Rica.

**Keywords:** estrus synchronization, ewes, medroxyprogesterone acetate.

## Introducción

La producción ovina, en Costa Rica, es una actividad incipiente; sin embargo, ha crecido en los últimos años. El Censo Nacional Agropecuario más reciente, registró un total de 1.792 productores; un hato estimado de 35.800 animales con 26.941 hembras y 8.859 machos. La mayor producción se ubica en las provincias de Alajuela y Guanacaste, con 26% y 23% de la población ovina, respectivamente (INEC. VI Censo Nacional Agropecuario 2014).

Ante la creciente demanda, el reto principal del sector es mejorar las razas cárnicas, con el fin de consolidarse en el mercado nacional (Fernández 2007). Para lograrlo, se requiere de biotecnologías de la reproducción que permitan generar padrotes superiores. Estos padrotes pueden ser aprovechados, eficientemente, valiéndose de la sincronización del estro de las hembras; bien sea para monta controlada o para inseminación con semen fresco, al permitir un avance del pie de cría, así como una mejor calidad de los productos terminales.

La técnica de sincronización más aceptada, a nivel mundial, en esta especie, incluye el uso de esponjas impregnadas con progestágenos para uso intravaginal, con o sin la adición de otras hormonas, tales como prostaglandinas y sus análogos y gonadotropina coriónica equina (eCG) (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 & Nur 2006; Catalano *et al.* 2007; Martínez-Tinajero *et al.* 2007; Hernández-Olivos 2010; Santos *et al.* 2010). Según los autores citados, el progestágeno más utilizado es la medroxiprogesterona acetato (MAP). En Costa Rica, todos son clasificados como medicamentos del grupo II; por lo cual, requieren de receta veterinaria, controlada por el Colegio de Médicos Veterinarios, para su prescripción y venta.

A nivel nacional, se ha observado una baja implementación de estas herramientas farmacológicas, pues uno de los principales limitantes es la disponibilidad de fármacos apropiados. Los veterinarios no cuentan con dispositivos intravaginales, registrados en el país, que estén aprobados en la especie ovina. La escasa demanda de los productos ha redundado en un desinterés de las casas comerciales

por incurrir en gastos onerosos de registro e importación de esos fármacos, al grado que, el único dispositivo intravaginal aprobado venció su registro en el país (Servicio Nacional de Salud Animal 2016). Ante esta situación, los ovinocultores, interesados en implementar programas de mejora genética, al utilizar protocolos de sincronización, se han visto obligados a importar productos no registrados, incrementando los costos de los programas y fomentando el uso irregular de medicamentos.

La normativa nacional, acerca de los medicamentos veterinarios, es omisa con respecto a la autoridad del médico veterinario para utilizar los medicamentos de forma extra etiqueta. Sin embargo, esta es la opción más adecuada para corresponder puntualmente con las necesidades del sector, sin recurrir a la importación ilegal de medicamentos. Se puede utilizar MAP, aprobado en el país para otras especies, en la sincronización del estro en ovinos; en este caso, el médico veterinario es el responsable de prescribir y dictar las recomendaciones pertinentes.

Ante la situación nacional, en relación con la disponibilidad de hormonas para los programas de sincronización de celos en ovinos, se plantea utilizar hormonas registradas por el Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA) para uso en animales de compañía, en una especie animal, por una vía y dosificación distintas a las aprobadas en caninos. El objetivo de este estudio fue elaborar los dispositivos intravaginales impregnados con MAP y evaluar su eficacia farmacológica, así como los efectos secundarios asociados en ovinos de pelo de diversas explotaciones en Costa Rica, con el fin de validar esta herramienta en nuestro medio y ponerla a disposición de los médicos veterinarios del país.

## Materiales y métodos

El proyecto se realizó en dos fases. El objetivo de la primera fue analizar la eficacia en la sincronización del estro y los efectos secundarios presentados con el uso de la esponja intravaginal casera, para lo cual se evaluó 18 hembras (Finca A n=9 y Finca B n=9). La segunda se realizó con el fin de comparar la tasa de sincronización de celos y la tasa de concepción, utilizando el dispositivo intravaginal casero y uno comercial, para lo cual se utilizó 60 hembras de las fincas C (n=8), D (n=6), E (n=13) y F (n=33). En esta fase, las hembras fueron divididas, al azar, en 2 grupos. El Grupo 1 (n=30) fue sincronizado con el dispositivo casero (ver abajo) y el Grupo 2 (n=30) con el comercial (Sincro-Gest®, Laboratorios Ovejero, España), ambos conteniendo 60 mg de MAP.

## Animales

Los animales se seleccionaron de 6 fincas diferentes, ubicadas en diversas zonas del territorio nacional. Las hembras escogidas, para utilizar en ambas fases del proyecto, fueron ovejas de pelo, cruces de diversas razas, dado que, en Costa Rica, no se contaba con suficientes animales puros en el momento experimental. Además, cumplían con los requisitos de inclusión: Condición corporal entre 2,5 y 3,5 (Thompson & Meyer 1994; Scott 2007); no preñadas, con al menos un parto (Espinoza *et al.* 2003; Ungerfeld *et al.* 2003) y sin anomalías uterinas ecográficamente detectables. Se excluyó las hembras en lactancia, debido al riesgo de estar en anestro o presentarlo posteriormente. Con respecto a la alimentación, estas se encontraban en pastoreo y diariamente se les suministraba concentrado y sales minerales. Además, el programa de desparasitación se manejaba al día.

Las hembras se separaron del macho 15 días antes de la selección inicial. Para la selección, se inspeccionaron clínicamente; se realizó una ecografía reproductiva transrectal (equipo Aloka SSD-500, transductor lineal 5 MHz), la cual se repitió a los 15 días posteriores, a las hembras elegibles, ecográficamente normales y sin signos de preñez, con el fin de descartar preñez temprana en la primera ecografía. Se implementó el procedimiento descrito por Bidinost *et al.* (2001).

Los machos se seleccionaron luego de realizarles un examen andrológico completo, que incluyó una evaluación física general, de los órganos reproductivos y del semen y se emplearon los métodos de evaluación y los criterios de aceptación divulgados por varios autores (Penzanite *et al.* [s.f.]; Bagley 1997; McNeal 1998; Scott 2007) y descritos con detalle por González (2015).

### Determinación de la actividad estral en las hembras

Se determinó la ciclicidad de las hembras con el fin de descartar que los resultados de eficacia pudiesen ser influenciados por un estado de anestro en ellas. Para este fin, se realizó citologías vaginales y mediciones de progesterona ( $P_4$ ) y estrógenos (E2). La muestra de citología fue tomada por hisopado vaginal. Se extendió por rodamiento, en un portaobjetos y se dejó secar a temperatura ambiente. Las células se fijaron con etanol 90% y fueron teñidas con Hema 3<sup>®</sup>, (Fisher Scientific Company L.L.C, USA) para ser observadas a una magnificación de 10X, según la clasificación celular utilizada por López-Crispín (2010), con modificaciones. La concentración de  $P_4$  y E2, se determinó mediante quimioluminiscencia con un equipo AIA 360, (TOSOH BIOSCIENCE<sup>®</sup>) en suero obtenido de la vena yugular, separado por centrifugación en la finca, preservado a -20°C hasta su procesamiento (Barret *et al.* 2004; Hernández-Olivos 2010).

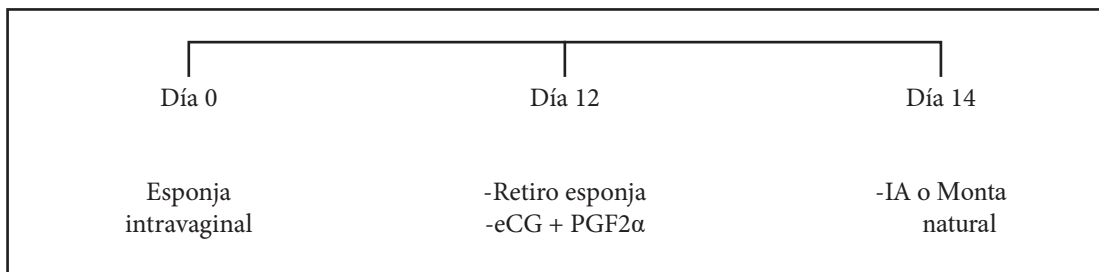
### Preparación de las esponjas

Los dispositivos intravaginales se prepararon con espuma de poliuretano número 20, (20 Kg/m<sup>3</sup>) cortada en forma cilíndrica, con un diámetro de 4cm y altura de 4 cm. Se introdujo un hilo de algodón para extraerlas (Fukui *et al.* 1987; Espinoza *et al.* 2003). Las esponjas se desinfectaron con etanol al 90%; se dejaron secar en cámara de flujo laminar; luego se impregnó la superficie 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); diluidos en 1 mL de etanol al 90%; dispersando el fármaco, en forma lineal, sobre la superficie (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, en bolsas con cierre hermético, para proteger la sustancia de la luz solar y del aire ambiental.

Las esponjas fueron colocadas en los animales de manera que al sacarlas tirando del hilo, estas rotaran sobre su eje horizontal, favoreciendo el desprendimiento de adherencias (Gibbons & Cueto 2004; Boggio 2005). Se realizó limpieza y desinfección de la vulva con solución de etanol al 70% antes de su colocación.

## Sincronización del estro

Se utilizó un protocolo para inseminación a tiempo fijo, según se describe en la literatura (Fukui *et al.* 1999; Barrett *et al.* 2004; Catalano *et al.* 2005; Martínez-Tinajero *et al.* 2007). Se colocaron las esponjas el día 0 y permanecieron hasta el día 12 del protocolo. Después de extraer las esponjas, se inyectó a cada hembra eCG (FOLLIGON®, Intervet Internacional, Holanda) y 15mg de dinoprost trometamina (Lutalyse®, Lab. Pharmacia & Lepjohn Inc, USA obtenido de Lab. Pfizer, Centroamérica), ambas por vía intramuscular. Hubo diferencias en el protocolo en la Finca A, de la primera fase, con relación a las demás fincas, básicamente en la dosis de eCG, pues, en el primer caso, se inyectó 330 UI, mientras que en el resto se utilizó 200 UI de la hormona (ver adelante la discusión).



**Figura 1.** Protocolo de sincronización de celo. eCG: gonadotropina coriónica equina, PGF2α: Prostaglandina F2α (dinoprost trometamina), IA: Inseminación artificial.

## 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. Se utilizó semen fresco diluido. El semen, se recolectó por medio de electroeyaculación y se preparó con el diluyente AndroMed® (Minitüb GmbH, Alemania), con una concentración mínima de  $150 \times 10^6$  espermatozoides (Santos *et al.* 2010). La técnica de inseminación, utilizada en la primera finca, (Finca A) fue la transcervical (Wulster-Radcliffe *et al.* 2004); mientras que, en la Finca B, se realizó la inseminación cervical colocando 0,1 ml de semen fresco, diluido en la entrada del orificio cervical, utilizando vaginoscopio y pistola de inseminación para ovinos. Dados los bajos resultados de preñez, en la primera fase, se decidió realizar solamente monta natural en la segunda, con el fin de eliminar las variables dadas por la técnica de inseminación artificial con respecto a la tasa de concepción. Por lo tanto, los machos se introdujeron una vez iniciado el estro y se mantuvieron mínimo 2 días con las hembras. Se padrearon máximo 10 ovejas por macho.

## Determinación de la eficacia farmacológica

La eficacia farmacológica se evaluó al determinar la ausencia del estro durante el tratamiento con MAP; el porcentaje de hembras en celo y la sincronización del estro al retirar la esponja. La detección del celo se realizó cada 12 horas, durante 96 horas, utilizando un macho amarrado (Zarwaki 2001; Catalano *et al.* 2007).



## Determinación de preñez

El diagnóstico de preñez se realizó entre 30 y 40 días post servicio, mediante ecografía transrectal (Bidinost et al. 2001).

## Determinación de la respuesta inflamatoria y los efectos secundarios en la primera fase

Se realizó un hemograma completo, medición del fibrinógeno, inspección vaginal, conteo de polimorfonucleados en la citología vaginal y cultivo de *Escherichia coli*, al comparar el día que se colocó la esponja intravaginal con el día que se retiró. La muestra de sangre completa, se tomó de la vena yugular con EDTA y se transportó en una hielera al Laboratorio de Análisis Clínicos de la Escuela de Medicina Veterinaria. Para realizar el conteo de polimorfonucleados vaginales se utilizó, como muestra, un hisopado vaginal siguiendo la técnica de tinción citológica mencionada supra. Se contó, en cada caso, 10 campos microscópicos seleccionados al azar, con una magnificación de 10X. Se realizó inspección vaginal con ayuda de un espéculo estéril. Se determinó el cambio en coliformes, especialmente en *E. coli*, al tomar una muestra directamente de la vagina, al introducir un hisopo estéril impregnado con solución salina estéril, posterior a la desinfección de los labios vulvares con alcohol al 70%. La muestra se conservó a 4°C hasta ser procesada en el Laboratorio de Bacteriología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional, donde se realizó conteo en placa de unidades formadoras de colonia.

## 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 al utilizar la prueba de chi-cuadrado para muestras no pareadas. Las variables analizadas fueron: el número de hembras en celo, el número y porcentaje de hembras preñadas. Las variables de presencia o ausencia de adherencias y presencia o ausencia de lesiones locales, se analizaron 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, se analizaron 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, se analizó mediante la prueba exacta de Fisher. Se estableció un valor  $\alpha$  de 0,05 y el intervalo de confidencialidad de un 95%.

## Resultados

### Localización de las fincas

El cuadro 1 resume la ubicación de las fincas y el número de animales revisados en cada una de ellas.

**Cuadro 1.** Localización de fincas utilizadas y animales revisados por finca.

Finca	Ubicación geográfica	Hembras	Machos
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

Se revisó un total de 387 hembras en 6 diferentes fincas, de las cuales 84 eran elegibles siendo la presencia de gestación la principal causa de descarte (cuadro 2). La media de la condición corporal (CC) de las hembras revisadas fue  $2,5 \pm 0,65$  (rango 1.0 a 5.0).

**Cuadro 2.** Razones de descarte de las hembras.

Causa de descarte	Frecuencia
Gestación	65%
Lactancia	12%
Baja condición corporal	8%
Nulípara	3%
Alta condición corporal	3%
Problemas de salud	1%
Otros	8%

Se revisaron en total 13 machos, de los cuales se utilizaron 8. El promedio de condición corporal fue de 3 (rango 2,5- 4,5). Los machos tenían una edad promedio de 16,1 meses (rango 5-30 meses). Ningún animal presentó anomalías de conformación general, del epidídimo, los testículos o el pene. La forma testicular más frecuente fue la ovoide ( $n=10$ ), con una baja frecuencia de formas alargada ( $n=2$ ) y redonda ( $n=1$ ). La circunferencia escrotal media fue de  $30,5 \pm 5,3$  cm (mínimo 21 cm, máximo 39 cm). De las 13 muestras de eyaculado sólo una presentó grumos macroscópicos y fue causa de descarte del macho. Los datos de la evaluación del semen se resumen en el cuadro 3, mientras que los defectos observados microscópicamente se describen en el cuadro 4.

**Cuadro 3.** Resultados de la evaluación del semen (n=12).

	Volumen (mL)	Motilidad (%)	Vigor (1-5)	Concentración espermática (x10 <sup>6</sup> /ml)
Media	1,0	96	4,5	19,57
SD	0,5	3,4	0,5	15,40
Mínimo	0,3	90	4	840,0
Máximo	2,0	100	5	46,37

**Cuadro 4.** Distribución de los defectos morfológicos encontrados en los espermias.

Anormalidad	Frecuencia
Gota distal	22%
Defectos de acrosoma	20%
Defectos de cola no específicos	11%
Gota proximal	10%
Defectos de cola específicos	8%
Defectos de cabeza	4%
Defectos de pieza media	1%
Miscelaneos	24%

Tres machos fueron descartados por ser insatisfactorios según el análisis completo del semen. Dos de ellos tuvieron una concentración espermática menor a la aceptable (2500 x10<sup>6</sup>/ml [Menchaca et al. 2005; Naim et al. 2009]). Un animal presentó una circunferencia testicular inferior según su edad (<25 cm para menores a un año [McNeal 1998]) y sólo el 70% de sus espermatozoides tuvieron morfología normal (Penzzanite et al. [s.f]). Un animal no fue incluido en el estudio por preferencias del productor.

### Primera fase. Determinación de la ciclicidad

Se determinó que todas las hembras estaban ciclando. La presencia de estro se caracterizó por una población predominante de células anucleadas (rango de 92%-95%) en algunos animales; o bien, por la predominancia de células superficiales y escamosas en otros. La predominancia de células intermedias se relaciona con proestro o con diestro, lo cual fue aclarado con la medición de P<sub>4</sub> y E<sub>2</sub>, al encontrarse una concentración de P<sub>4</sub> > 3,0 ng/ml como indicador de diestro (rango 3,23 a 4,47), o menor que ella, pero con concentraciones de E<sub>2</sub> entre 38,5-45,3 pg/ml, como indicador de proestro (Chacón 2010; López-Crispín 2010; Clemente *et al.* 2013).



### Determinación de la eficacia farmacológica.

La eficacia farmacológica fue de 100%. Durante la primera fase, se descartaron 2 hembras debido a pérdida del dispositivo. En las hembras restantes, se observó la ausencia de celo durante los 12 días de tratamiento con MAP; mientras que, todas las hembras presentaron celo una vez retirado el dispositivo. El 100% presentó celo a las 48 horas post retiro de la esponja (ninguna presenta celo antes) y se observó hasta las 84 h, tiempo en el cual una hembra rechazó al macho. En la finca A, se observó animales en celo hasta las 120 horas. Mientras que, en la finca B, el celo terminó a las 96 horas. Como las manifestaciones de celo fueron muy fuertes y prolongadas, en la finca A, se disminuyó la dosis de eCG; en la finca B en la segunda fase del estudio.

En la finca A 3/9 (33%) hembras se preñaron; mientras que en la finca B ninguna hembra resultó gestante. Debido a ello, se decidió realizar la segunda fase, sólo con monta natural, con el fin de comparar los grupos.

### Determinación de efectos secundarios

Lo más llamativo fue el aumento en el número de animales positivos a *E. coli* al final del tratamiento. El conteo de neutrófilos en sangre fue variable, observándose una disminución el día 12 en la finca A y un aumento en la finca B. Solo dos hembras mostraron neutrofilia leve el día 12 (> 7.000 segmentados/ $\mu$ l sangre). El día 12 del protocolo, 3/16 animales mostraron valores de fibrinógeno por encima de 600 mg/dl. En el cuadro 5, se muestran los parámetros indicativos de inflamación e infección.

**Cuadro 5.** Parámetros de inflamación e infección

Parámetro	Día 0	Día 12	Valor p
<i>E. coli</i> en hisopado vaginal (número de animales positivos)	2	8	0,027 <sup>a</sup>
Segmentados por $\mu$ l sangre	3524 $\pm$ 1791	3540 $\pm$ 1844	0,491 <sup>b</sup>
Fibrinógeno plasma (número de animales >600 mg/dl)	0	3	0,113 <sup>a</sup>

a: Fischer's Exact test. b: t-Test para muestras pareadas

Los hallazgos de la vaginoscopia fueron variables al inicio del protocolo. En la Finca A, no se observó alteraciones evidentes el día 0; mientras que, en la B, todas las hembras mostraron irritación ese día, lo cual se atribuyó a un problema metabólico en el hato. El día 12, todos los animales mostraron enrojecimiento de la mucosa vaginal; 13 animales presentaron secreción purulenta y 3 secreción sanguinolenta. En ninguna de las hembras se observó úlceras o abrasiones en la mucosa. Además, 3/16 animales mostraron adherencia de la esponja, lo que dificultó su retiro. Ningún animal presentó síntomas el día de la IA, lo cual indicó que las alteraciones observadas obedecían a una reacción local ante la presencia del dispositivo. En relación con lo anterior, se observó un aumento significativo de los polimorfonucleados en la citología vaginal el día 12; estos fueron incontables en 8 muestras (7

de la finca B y una de la finca A), mientras que 3 animales mostraron pocas células y el resto fueron negativos. El día 0, todos fueron negativos a la presencia de dichas células.

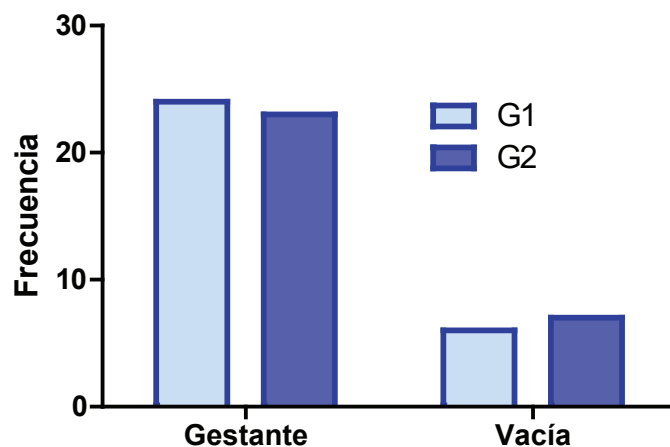
### Segunda Fase.

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  $2,8 \pm 0,3$  unidades CC. Durante los 12 días que se mantuvo la esponja intravaginal ninguna hembra 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 de 48 horas.

La tasa de concepción fue de 80% y 76,7% en G1 y G2, respectivamente. En el Cuadro 6, se detalla la tasa de concepción total por finca, mientras que la Figura 2 resalta la comparación entre grupos.

**Cuadro 6.** Porcentaje de preñez alcanzado en cada finca.

Finca	Número de animales	Porcentaje de sincronización	Porcentaje de Preñez
C	8	100%	87,5%
D	6	100%	66,6%
E	13	100%	92,3%
F	33	100%	72,7%



**Figura 2.** Comparación de los resultados de preñez entre ambos grupos  
( $p=1.000$  Fisher's exact test).

## Discusión

Las fincas utilizadas eran manejadas bajo sistemas extensivos, con monta continua; por lo cual, un alto porcentaje de hembras se encontraba en diversos estados de gestación, en lactancia o con baja condición corporal, reduciéndose el número de ovejas elegibles y dificultando la obtención de un tamaño de muestra mayor. Esta situación refleja que los productores participantes no cuentan con la adecuada orientación para manejar sus hatos de manera más eficiente y así lograr el uso adecuado de padrotes superiores. Según Brand *et al.* (2014), el manejo intensivo, junto con técnicas reproductivas apropiadas, permite obtener hasta 100% de concepción acumulada en los primeros 100 días post parto utilizando monta natural.

Las esponjas vaginales impregnadas con progestágenos sintéticos han sido ampliamente utilizadas para la sincronización e inducción del estro en ovinos (Fukui *et al.* 1987). El efecto farmacológico esperado del progestágeno es una inhibición de la dominancia folicular (Martínez-Tinajero *et al.* 2008), generando una inhibición de la presentación del estro cuando las concentraciones séricas del progestágeno sintético son adecuadas. Al remover la fuente de progestágeno y eliminar eventuales cuerpos lúteos, se permite el desarrollo folicular y la consecuente presentación sincrónica de estros (Martínez-Tinajero *et al.* 2008). De tal manera que, la eficacia del progestágeno puede ser determinada como la ausencia de estro durante el tratamiento y su aparición sincrónica después de retirarlo. Sin embargo, la administración de eCG, la cual presenta un importante efecto FSH (Abecia *et al.* 2012), en dosis racionales aumenta la tasa de ovulación al inducir el reclutamiento folicular (Fernández-Abella *et al.* 2003; Barret *et al.* 2004) y disminuye el intervalo entre la remoción de MAP y la aparición del estro, comparado con el uso de progestágenos solamente (Barret *et al.* 2004; Dogan & Nur 2006). La administración de una dosis luteolítica de PGF<sub>2α</sub> al final o 24-48 horas antes de retirar el dispositivo intravaginal ha resultado en un aumento de la tasa de fertilidad (Martemucci & D'Alessandro 2011). Estos factores son de importante consideración para la implementación del protocolo utilizado, al considerar los beneficios esperados para los productores participantes.

En el presente estudio se obtuvo un 100% de sincronización del estro en ambas fases. Un 100% de sincronización también fue reportado por otros autores usando dispositivos con MAP por 12 días (Fukui *et al.* 1987; Fukui *et al.* 1999; Espinoza *et al.* 2003; Martínez-Tinajero *et al.* 2007; Hernández-Olivos 2010) y 14 días (Naim *et al.* 2009), con una gran variación entre las dosis de eCG y PGF<sub>2α</sub>, incluso usando la eCG 48 horas antes, al retiro ó 48 horas después de la extracción del dispositivo, evidenciando que ese efecto farmacológico obedece principalmente al progestágeno. Wuster-Radcliffe *et al.* (2004) lograron sincronización en 418 de 420 ovejas con un protocolo similar al utilizado en este estudio.

En cuanto al momento de aparición del celo, todas las hembras sincronizadas manifestaron signos de celo a las 48 horas post retiro de la esponja intravaginal, datos que se comparan con los de diferentes estudios. Esto permite que, a partir de las 48 horas, las hembras estén listas para ser sometidas a monta natural o a inseminación artificial (Espinoza *et al.* 2003; Hernández-Olivos 2010; Abecia *et al.* 2012), aunque en otros casos el inicio se ha reportado ligeramente más tardío, desde 2,6 días (Barret *et al.* 2004) hasta 67 horas (Silva *et al.* 2010). Asimismo, se ha reportado un inicio más rápido: 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.

La prolongación del estro, en la finca A, durante la primer fase, es atribuible al efecto de la eCG. Las

dosis recomendadas de esa hormona, en países con estacionalidad reproductiva, alcanzan las 500 UI (Fukui *et al.* 1999; Zarwaki 2001; Barret *et al.* 2004), 400 UI (Wulsfer-Radcliffe *et al.* 2004) ó 300 UI (Olivera-Munzante *et al.* 2011) y se ha descrito el uso de 400 UI en países tropicales (Hernández-Olivos 2010). A pesar de que la dosis utilizada en la Finca A fue menor a la de la mayoría de los trabajos citados, los resultados indican que, dada una baja talla del animal promedio en nuestro hato, se debe considerar la relación dosis-efecto y utilizar dosis menores, lo cual fue confirmado al reducirlas y obtener un acortamiento del intervalo de presentación del estro en las demás fincas del estudio. Por su efecto FSH la eCG estimula la secreción de estrógenos a nivel folicular, provocando las correspondientes manifestaciones externas (Squires 2003; Catalano *et al.* 2007). Es importante considerar futuros ensayos para explorar la viabilidad de usar dosis aún menores.

La tasa de concepción puede ser disminuida por la presencia de un exceso de progestágeno circulante, pues se reduce la viabilidad de los oocitos y provoca atresia de los folículos dominantes (Simonetti *et al.*, 2000; Martemucci & D'Alessandro 2011). Ante la diferencia observada, en las tasas de concepción de la primera y segunda fase, se determina, más que un efecto de la hormona, la baja tasa observada en la primera fase es atribuible a las técnicas usadas para inseminación, pues el ovino es una de las especies con más dificultad para realizar una IA exitosa, además, se obtiene resultados muy variables (Menchaca 2005). En la finca B, el problema metabólico presente en los animales influye en los hallazgos observados en la vaginoscopia del día 0 y en la ausencia de preñez. Por los signos e historia clínica, se sospecha de un caso de acidosis ruminal; sin embargo, no se realizaron estudios posteriores que confirmaran el diagnóstico. Se observó que algunos animales del hato recibían raciones elevadas de concentrado, causando diarrea y mayor contaminación de la vagina (evidenciado con más animales positivos a *E. coli* al día 0 en la finca B).

En la segunda fase, se obtuvo un 80,0% de concepción con la esponja de elaboración casera y un 76,7% con la comercial. No se observaron diferencias significativas entre ambas. El número de animales de la muestra, se vió disminuido por el manejo extensivo y padreo continuo de los hatos, discutido arriba, lo cual, a su vez, afecta el poder estadístico del estudio. En consecuencia, dificulta encontrar diferencias estadísticas significativas al comparar ambos grupos de dispositivo comercial y casero. No obstante, dado que en Costa Rica todo apunta a que los grupos de animales por sincronizar son relativamente pequeños, no se espera que haya mayor influencia del tipo de dispositivo sobre la tasa de concepción en nuestras condiciones de campo. La tasa de concepción obtenida es comparable a la citada por diversos autores utilizando dispositivos con MAP y administrando eCG: 80% en otras razas (Zarwaki 2001; Martínez-Tinajero *et al.* 2007); 77% en ovejas Pelibuey y 85% en Katahdin (Hernández-Olivos 2010). También, se reportan datos similares al usar dosis de 50 mg de MAP y 40 mg de fluorogestona acetato (70% en ambos casos [Espinoza *et al.* 2003]). Aunque la tasa puede ser menor (alrededor de 60%) en países estacionales durante época no reproductiva (Catalano *et al.* 2005; Catalano *et al.* 2007). Lo anterior pone en evidencia la importancia de establecer las expectativas del tratamiento basados en las características específicas de cada raza y del ambiente.

Es importante tomar en cuenta que, al utilizar esponjas impregnadas con progestágenos, las tasas de inducción del estro son altas, pero las tasas de concepción son variables (Silva *et al.* 2010; Manes *et al.* 2014). Diversos factores han sido atribuidos al fallo en la fertilidad de los protocolos al utilizar esponjas intravaginales. Por ejemplo, se menciona como posibles causas la ovulación de oocitos envejecidos en protocolos de 12-14 días (Duggavathi 2004; Silva *et al.* 2010); 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) y la alteración del ambiente vaginal provocado por el dispositivo intravaginal (Manes *et al.* 2010). La infiltración de leucocitos en el epitelio vaginal puede dañar 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 detrimental en la viabilidad y motilidad de los espermatozoides (Manes *et al.* 2014). Sin embargo, al realizar un protocolo de sincronización adecuado, según las condiciones de cada explotación, se puede lograr buenos porcentajes de preñez, como los obtenidos en la segunda fase de nuestro estudio, con lo cual se puede aprovechar mejor los machos superiores genéticamente.

Las reacciones adversas observadas no indican que la mayoría de los animales son afectados de forma sistémica, siendo el efecto inflamatorio predominantemente local y no fue clínicamente observable a las 48 horas posteriores al retiro del dispositivo. Los principales efectos secundarios fueron: enrojecimiento de la mucosa, secreción purulenta, aumento en el crecimiento de coliformes, infiltración de polimorfonucleares y, en menor grado, adherencias del dispositivo, lo que coincide con lo descrito por otros autores (Martins *et al.* 2009; Manes *et al.* 2010; Martins *et al.* 2010; Gatti *et al.* 2011; Manes *et al.* 2014). El 6,5% de las hembras tratadas presentaron adherencias, dato menor al 10% y 14% reportado por Martins *et al.* (2010) y Espinoza *et al.* (2003), respectivamente. Las esponjas comerciales utilizadas presentan menos problemas para su retiro, comparadas con las caseras, pues su diámetro era menor. Es importante valorar la modificación del diámetro de la esponja para disminuir el problema. Los efectos secundarios, por tanto, básicamente obedecen a una reacción a cuerpo extraño (Manes *et al.* 2010), aunque no se descarta el papel inmunosupresor local de las progestinas (Gatti *et al.* 2011), aspecto que debe ser estudiado con mayor profundidad.

En cuanto a la elaboración del producto, diversos autores utilizaron la inyección en la matriz de poliuretano como método de aplicación de la hormona (Robinson *et al.* 1968; Gibbons & Cueto 1995; Simonetti *et al.* 2000). No obstante, en este trabajo se distribuyó el medicamento homogéneamente sobre la superficie de la matriz, coincidiendo con lo descrito por Espinoza *et al.* (2003) y Martins *et al.* (2010). De esta manera, se puede hacer que la hormona esté más próxima a la mucosa para mejorar su absorción. Sin embargo, es necesario determinar si esta aplicación favorece la absorción, para lo cual se requiere un estudio de biodisponibilidad, puesto que en tal caso, se podría utilizar dosis menores de MAP, con lo cual se reduce los costos. Simonetti *et al.* (2000) evaluaron los niveles residuales y estimaron lo absorbido de MAP, relacionándolo con el efecto en la sincronización del estro y la preñez. Observaron que, al utilizar una dosis de 40mg, 50 mg y 60mg, solamente se absorbía 21 mg, 19,7 mg y 24 mg (dosis total), respectivamente. Por tanto, sin importar la dosis inicial, la cantidad de hormona absorbida no mostraba diferencias significativas entre los grupos. Además, se demuestra que la tasa de concepción es similar con las tres dosis utilizadas.

## Conclusiones

Los datos obtenidos confirman la factibilidad de la fabricación de un dispositivo de elaboración casera para la sincronización del estro en ovinos de pelo. Además, se demuestra la posible utilización de un progestágeno, de manera extra etiqueta, que permite al médico veterinario responder a las necesidades



del sector ovino e implementar, de manera eficiente, protocolos necesarios para avanzar en el desarrollo genético del hato, sin recurrir a la importación ilegal de medicamentos. El uso de dispositivos intravaginales permite alcanzar una alta tasa de concepción por medio de la monta controlada y utilizar, de manera eficiente, los machos genéticamente superiores.

Los efectos secundarios observados reflejan una inflamación local con sobrecrecimiento bacteriano durante la permanencia del dispositivo, sin observarse una respuesta sistémica evidente. A pesar de las alteraciones locales, la tasa de concepción alcanzada, en el grupo de 60 animales, indica que estas tienen una influencia menor sobre la fertilidad en el momento de la monta natural. Más investigaciones ameritan su eficacia utilizando técnicas de IA apropiadas para la especie ovina.

### Agradecimientos

Agradecemos a Laura Bouza del Laboratorio Análisis Clínicos, Elías Barquero del Laboratorio de Bacteriología, Jorge Chacón del Laboratorio de Andrología, Laura Castro y Marcela Suárez del Laboratorio de Fertilización in Vitro de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional por su ayuda en materiales, equipo y espacio y su orientación en el procesamiento de las muestras.

Agradecemos a Lilliana Campos del laboratorio de Farmacología por la ayuda y a Daniel Carballo, practicante privado en reproducción de rumiantes, por facilitarnos equipo indispensable para la evaluación de los machos.

Este trabajo fue financiado con recursos aportados por los autores, los responsables de los laboratorios y los productores. Los autores declaran que no ha habido interés de casas comerciales por realizar este estudio.

### Referencias

- Abecia, J.A., Forcada, F. & González-Bulnes, A. 2012. Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Anim. Reprod. Sci.* 130: 173-179. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.01.011>
- 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](http://extension.usu.edu/files/publications/factsheet/AH_Sheep_13.pdf)
- Barrett, D.M.W., Bartlewski, P.M, Batista-Arteaga, M., Syminton, A. & Rawlings, N.C. 2004. Ultrasound and endocrine evaluation of 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. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00215-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00215-2)
- Bidinost, F., Gibbons, A.E. & Cueto, M. 2001. Ecografía para el diagnóstico de la pre-vez en ovinos y caprinos [en línea]. INTA EEA Bariloche. Argentina. [www.biblioteca.org.ar/libros/210336.pdf](http://www.biblioteca.org.ar/libros/210336.pdf)
- 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>



- Brand, T.S., Terblanche, S. & Jordaan, J.W. 2014. Conception rate and fecundity of Dohne Merino ewes in a continuous mating system. *S. Afr. J. Anim. Sci* 44(5): 64-69.
- Catalano, R., González, C., Teruel, M., Cabodevila, J. & Callejas, S. 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., González, C., Teruel, M., Cabodevila, J. & Callejas, S. 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](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S1668-34982007000100001&script=sci_arttext)
- Chacón, G., Abecia, J.A., Palacios, C. & Baselga, R. 2010. Determinación de progesterona mediante quimioluminiscencia en ganado ovino [en línea]. p 168-172 In XXXV Congreso de la SEOC. Set 22-25. Sociedad Espa-ola de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Valladolid, Espa-a. [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](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)
- Clemente, O.N., Orihuela, A., Flores, F.I. & Aguirre, V. 2013. Citología y Análisis morfológico de las células del epitelio vaginal durante el ciclo estral en ovejas de pelo (*Ovis aries*). *Int. J. Morphol.* 31 (3): 888-893. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022013000300017>
- Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA). 2016. Dirección de Medicamentos Veterinarios: centro de consulta de MediVet [en línea]. Dirección de Medicamentos Veterinarios de SENASA. <http://www.senasa.go.cr/medivet/WebForm2.aspx?id=ES-7-26-12-4601>
- Dogan, I. & Nur, Z. 2006. Different estrous induction methods during the non-breeding season in Kivircik ewes. *Veterinárni Medicina* 51: 133-138.
- Duggavathi, R. 2004. Dynamics and regulation of ovarian antral follicular waves in sheep. Ph.D. Thesis, University of Saskatchewan, Canada.
- Espinoza R.R., Fraga, E.E. & Domínguez, M.M. 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](http://ammveb.net/XXVII%20CNB/memorias/Reproduccion/Oral/htm/Trabajo_50_Esponjas_intravaginales_manufacturadas.htm)
- Fernández, A. 2007. Producción ovina quiere engordarse [en línea]. *El Financiero*. C.R. [http://www.elfinancierocr.com/ef\\_archivo/2007/agosto/26/economia1202775.html](http://www.elfinancierocr.com/ef_archivo/2007/agosto/26/economia1202775.html)
- Fernández-Abella, D., Bonilla-Riera, C., Irabuena, O. & Sterla, S. 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/EFEECTO%20DEL%20METODO%20DE%20SINCRONIZACION%20DE%20CELOS%20Y.pdf>
- Fukui, Y., Ishikawa, D., Ishida, N., Okada, M., Itagaki, R. & Ogiso, T. 1999. Comparison of fertility of

- estrous synchronized ewes with four different intravaginal devices during the breeding season. *J. Reprod. Develop.* 45: 337-343. <https://doi.org/10.1262/jrd.45.337>
- Fukui, Y., Tetsuka, M., Akaikf, M., Machiyama, K. & Ono, H. 1987. Effects of types of vaginal sponge impregnated with progestogen on estrous induction and lambing rate in seasonally anestrus ewes. *Anim. Reprod. Sci.* 33: 181-187.
- Gatti, M., Zunino, P. & Ungerfeld, R. 2011. Changes in the aerobic vaginal bacterial mucous load after treatment with intravaginal sponges in anoestrous ewes: Effect of medroxyprogesterone acetate and antibiotic treatment use. *Reprod. Dom. Anim.* 46: 205-208. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01626.x>
- Gibbons, A. & Cueto, M. 1995. Manual de inseminación artificial de la especie ovina [en línea]. INTA EEA Bariloche. Arg. <http://inta.gov.ar/documentos/manual-de-inseminacion-artificial-en-la-especie-ovina/>
- Gibbons, A. & Cueto, M. 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>
- González, S. 2015. Determinación de la eficacia farmacológica y los efectos secundarios de una esponja intravaginal de fabricación casera elaborada con acetato de medroxyprogesterona para la sincronización del estro en ovinos de pelo. Tesis de Licenciatura en Medicina Veterinaria. Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.
- Hernández-Olivos, J.L. 2010. Fertilidad en ovejas de pelo sincronizadas con acetato de medroxyprogesterona y gonadotropina coriónica equina. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. Universidad Veracruzana. Veracruz, Méx.
- INEC. VI Censo Nacional Agropecuario. 2014. 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://inec.cr/agropecuario?title=&shs\\_term\\_node\\_tid\\_depth=All&field\\_periodo\\_tid=All&field\\_anio\\_documento\\_value%5Bvalue%5D%5Bdate%5D=](http://inec.cr/agropecuario?title=&shs_term_node_tid_depth=All&field_periodo_tid=All&field_anio_documento_value%5Bvalue%5D%5Bdate%5D=)
- 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., Hozbor, F., Alberio, R. & Ungerfeld, R. 2014. Intravaginal placebo sponges affect negatively the conception rate in sheep. *Small Rumin. Res.* 120: 108-111. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2014.05.006>
- Manes, J., Fiorentino, M.A., Kaiser, G., Hozbor, F., Alberio, R., Sanchez, E. & Paolicchi, F. 2010. Changes in the aerobic vaginal flora after treatment with different intravaginal devices in ewes. *Small Rumin. Res.* 94: 201-204. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2010.07.021>
- Martemucci, G. & D'Alessandro, A.G. 2011. Synchronization of oestrus and ovulation by short time

- combined FGA, PGF2 $\alpha$ , GnRH, eCG treatments for natural service of AI fixed-time. *Anim. Reprod. Sci.* 123: 32-39. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.11.007>
- Martínez-Tinajero, J.J., Izaguirre-Flores, F., Sánchez-Orozco, L., García-Castillo, C.G., Martínez-Priego, G. & Torres-Hernández, G. 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., Sánchez, M.T., Torres-Hernández, G., Herrera-Haro, J.G., Bucio-Alanís, L., Rojo-Rubio, R. & Hernández-Martínez, J. 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., Figueira, L., Penna, B., Brandão, F., Vargas, R., Vasconcelos, C. & Lilenbaum, W. 2009. Prevalence and antimicrobial susceptibility of vaginal bacteria from ewes treated with progestin-impregnated intravaginal sponges. *Small Rumin. Res.* 81: 182-184. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2008.12.003>
- Martins, L.T., dos Santos-Neto, P.C., Neto, S.G., Pereira-Rauber, L., Bertolini, M., Diniz-Viera, A. & Mezzalana, A. 2010. Microbiological and functional evaluation of an alternative device (OB®) for estrous synchronization in ewes. *Cienc. Rural* 40: 389-395. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782010000200021>
- McNeal, L. 1998. Ram breeding soundness evaluation [en línea]. The Navajo Sheep Project. Utah. <http://navajosheepproject.com/images/pdf/rams/bse.pdf>
- Menchaca, A., Pinzak, A. & Queirolo, D. 2005. Storage of ram semen at 5°C: effects of preservation period and timed artificial insemination on pregnancy rate in ewes. *Anim. Reprod* 3(2): 195-198.
- Naim, P., Cueto, M. & Gibbons, A. 2009. Inseminación artificial a tiempo fijo con semen ovino refrigerado. *Arch. Zootec.* 58: 435-440. <https://doi.org/10.4321/S0004-05922009000300012>
- Noakes, D.E., T.J. Parkinson & G.C.W. England (ed). 2001. *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*. 8th. ed. London, Saunders. 864 p.
- Olivera-Muzante, J., Fierro, S., López, V. & Gil, J. 2011. Comparison of prostaglandin and progesterone-based protocols for time artificial insemination in sheep. *Theriogenology* 75: 1232-1238. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.11.036>
- Penzanite, L., Bridges, A., Neary, M. & Hutchens, T. [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>
- Robinson, T.J., Quinlivan, T.D. & Baxter, C. 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. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0170471>
- Santos, I.W., Binsfeld, L.C., Weiss, R.R. & Kozicki, L.E. 2010. Fertility rates of ewes treated with medroxyprogesterone and injected with equine chorionic gonadotropin plus human chorionic

- gonadotropin in anoestrous season. *Vet. Med. Int.* 2010: 1-4. <https://doi.org/10.4061/2010/978520>
- Scott, P.R. 2007. *Sheep Medicine*. Manson Publishing. London, UK. 336 p.
- Silva, B.D.M., Sartori, R., Silva, T.A. Cardozo, D.M.M., Oliveira, M.A.L. & Neves, J.P. 2010. Estrus synchronization with prostaglandin F<sub>2α</sub> 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., Blanco, M.R. & Gardón, J.C. 2000. Estrus synchronization in ewes treated with sponges impregnated with different doses of medroxyprogesterone acetate. *Small Ruminant Res.* 38: 243-247. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(00\)00160-7](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(00)00160-7)
- Squires, E.J. 2003. *Applied Animal Endocrinology*. CABI Publishing. UK. <https://doi.org/10.1079/9780851995946.0000>
- Thompson, J. & Meyer, H. 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>
- Ungerfeld, R., Suárez, G., Carbajal, B., Silva, L., Laca, M., Forsberg, M. & Rubianes, E. 2003. Medroxyprogesterone priming and response to the ram effect in Corriedale ewes during the nonbreeding season. *Theriogenology* 60: 35-45. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01302-X](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01302-X)
- Wulster-Radcliffe, M.C., Wang, S. & Lewis, G.S. 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. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.12.031>
- 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. <https://doi.org/10.1080/00288233.2001.9513472>