

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



ACTUALIZACIÓN DE TRATAMIENTOS A BASE DE GnRH Y hCG
PARA LA INDUCCIÓN Y SINCRONIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS
REPRODUCTIVOS DE PEQUEÑOS RUMIANTES.

Tesis

Que presenta ZURISADAY SANTOS JIMÉNEZ

como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS EN PRODUCCION AGROPECUARIA

Torreón, Coahuila

Diciembre, 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

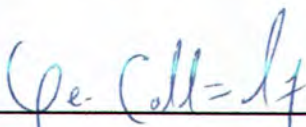
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO




ACTUALIZACIÓN DE TRATAMIENTOS A BASE DE GnRH Y hCG
PARA LA INDUCCIÓN Y SINCRONIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS
REPRODUCTIVOS DE PEQUEÑOS RUMIANTES.

Tesis

Que presenta ZURISADAY SANTOS JIMÉNEZ
como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS EN PRODUCCION AGROPECUARIA


Dra. Guadalupe Calderón Leyva
Director UAAAN


Dr. Antonio González de Bulnes López
Director externo (UCH-CEU)

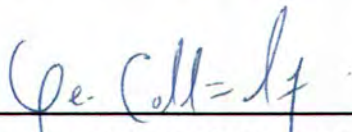
Torreón, Coahuila

Diciembre, 2021

ACTUALIZACIÓN DE TRATAMIENTOS A BASE DE GnRH Y hCG
PARA LA INDUCCIÓN Y SINCRONIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS
REPRODUCTIVOS DE PEQUEÑOS RUMIANTES.

Tesis

Elaborada por ZURISADAY SANTOS JIMÉNEZ como requisito parcial para
obtener el grado de Doctor en Ciencias en Producción Agropecuaria con la
supervisión y aprobación del Comité de Asesoría.



Dra. Guadalupe Calderón Leyva

Asesor Principal



Dra. Paula Martínez Ros

Asesor



Dr. Antonio González de Bulnes López

Asesor



Dra. Leticia Romana Gaytán Alemán

Asesor



Dr. Oscar Ángel García

Asesor



Dr. Fco. Javier Pastor López

Asesor



Dra. Leticia Romana Gaytán Alemán
Jefe del Departamento de Postgrado



Dr. Marcelino Cabrera De la Fuente
Subdirector de Postgrado

Torreón, Coahuila

Diciembre, 2021

Agradecimientos

Agradecida con *Jehová Dios* por todas las bendiciones que me ha dado y que siempre me lleva de su mano.

A mi querida *Alma Terra Mater* por ser mi hogar durante mis años de licenciatura, maestría y doctorado.

A el *Posgrado en Ciencias en Producción Agropecuaria*

A mi comité de asesores:

Dra. Guadalupe Calderón Leyva

Dra. Leticia Romana Gaytán Alemán

Dr. Oscar Ángel García

Dr. Francisco Javier Pastor López

Dra. Paula Martínez Ros por su acompañamiento y haberme permitido realizar mi estancia de investigación bajo su supervisión, por todo su apoyo gracias.

Dr. Antonio González de Bulnes López, por haber creído en mí e incluirme en su grupo de investigación, por compartir sus conocimientos y siempre tener tiempo para resolver mis dudas, por su incondicional apoyo que siempre me ha fomentado a continuar adelante.

Dr. Juan Manuel Guillén Muñoz por ser mi guía en el mundo de la investigación, me siento muy honrada de ser su colaboradora, compañera, amiga, esposa, y poder trabajar juntos.

Al *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)*, por el apoyo económico otorgado para mis estudios de doctorado.

Dedicatoria

A mis hijas *Gianna Minell y Scarlett*, por haber robado un poco de su tiempo, para poder realizarme en lo profesional, sin su inspiración no habría sido posible. Las adoro con todo mi corazón.

A mi esposo *Dr. Juan Manuel Guillén Muñoz*, no tengo palabras para agradecer su gran apoyo incondicional, por ser un excelente ser humano y tener la dicha de ser su compañera de vida.

A mis papás *Mtro. Francisco Santos Castillo y Mtra. Guadalupe Jiménez Jaimes*, por su amor y cariño, aunque a la distancia yo sé que ustedes siempre oran por mí y celebran mis éxitos, los amo y quiero agradecer y bendecir sus vidas.

A mis hermanas *Rubí, Johanis y Karen*, las mejores hermanas que alguien puede tener, gracias por que siempre están conmigo, por ser tan unidas y apoyarnos en todo, siempre seremos “Las 4 mosqueteras”.


A mi amiga *Josefina Lopez Hernandez*, por su gran amistad y hacer amenas mis noches de tareas.

A la *Ing. Yolanda Minerva Muñoz, el MVZ. Juan Manuel Guillén* y a *Pablo Guillén*, por haberme apoyado con mis hijas y ser unas excelentes personas.

Aceptación de artículo

[Animals] Manuscript ID: animals-1428197 - Accepted for Publication



hattie.chen@mdpi.com <hattie.chen@mdpi.com> en nombre de Animals Editorial Office <  >
03/11/2021 10:13 p. m.

Para: Zurisaday Santos-Jimenez Cc: César A. Meza-Herrera; Guadalupe Calderon-Leyva; Paula Martinez-Ros; Juan ... 

Dear Ms. Santos-Jimenez,

Congratulations on the acceptance of your manuscript, and thank you for your interest in submitting your work to Animals:

Manuscript ID: animals-1428197

Type of manuscript: Article

Title: Efficiency of hCG for inducing resumption of ovarian cyclicity and synchronized ovulations during the seasonal anestrous in sheep

Authors: Zurisaday Santos-Jimenez, César A. Meza-Herrera, Guadalupe Calderon-Leyva, Paula Martinez-Ros, Juan M. Guillen-Muñoz *, Antonio Gonzalez-Bulnes *

Received: 3 October 2021

E-mails: mvz_zusan@hotmail.com, cmeza2020@hotmail.com, gcalderon06@hotmail.com, paula.martinez@uchceu.es, jmanuel.guillenm@uaaan.edu.mx, antonio.gonzalezbulnes@uchceu.es

Submitted to section: Animal Reproduction,

https://www.mdpi.com/journal/animals/sections/Animal_Reproduction

Reproductive Management of Sheep and Goats

https://www.mdpi.com/journal/animals/special_issues/Reproductive_Management_of_Sheep_and_Goats

https://susy.mdpi.com/user/manuscripts/review_info/f93739e92cd4bc32220c134af8eef77c

We will now edit and finalize your paper, which will then be returned to you for your approval. Within the next couple of days, an invoice concerning the article processing charge (APC) for publication in this open access journal will be sent by email from the Editorial Office in Basel, Switzerland.

Envió de artículo

USING TWO GNRH ANALOGUES TO IMPROVE REPRODUCTIVE PARAMETERS IN GOATS? --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	USING TWO GNRH ANALOGUES TO IMPROVE REPRODUCTIVE PARAMETERS IN GOATS?
Short Title:	GNRH TO IMPROVE REPRODUCTIVE PARAMETERS IN GOATS
Article Type:	Original Study/Estudio Original
Section/Category:	Sistemas de Producción Animal en Zonas Áridas
Keywords:	Estrus, goats, GnRH, Buserelin, Gonaderelin
Corresponding Author:	Guadalupe Calderon-Leyva, Dra. MEXICO
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Zurisaday Santos-Jimenez
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Zurisaday Santos-Jimenez Santos-Jimenez Zunsaday, Mc Guillen-Muñoz Juan Manuel, Dr. Angel-Garcia Oscar, Dr. Leticia R. Gaytan-Aleman Guadalupe Calderon-Leyva, Dra
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	The objective of this investigation was to evaluate whether the use of synthetic GnRH analogs administered in goats previously treated with intramuscular progesterone, would improve synchronous follicular development and induce ovulation. Forty Alpine goats were used that were synchronized with 20 mg of progesterone (P4) im (hour 0) then at 36 hours they were administered 75 mg of Pgf2 and then divided into two groups, one treated with Gonadorelin Acetate (n = 20) and Buserelin Acetate (n = 20). Each group was subdivided into three subgroups with each analog. The Control group (n = 6) only received the administration of P4 and Pgf2. Groups G54 (n = 7) and G84 (n = 7) received; on the one hand the first group 100µg of Gonaderolin acetate on day 0 and at 54 or 84h, a second application; the second Buserelin group, the females received 5µg of Buserelin Acetate on day 0 and at 54 or 84h according to their experimental group. The use of two GnRH analogues (gonadorelin and buserelin) with two applications in goats treated with 20 mg of progesterone im, induced abnormal growth in medium and large follicles regardless of the analog used, luteinizing the follicle and inhibiting ovulation.
Suggested Reviewers:	Antonio Gonzalez-Bulnes CEU Cardenal Herrera University: CEU Universidad Cardenal Herrera antonio.gonzalezbulnes@uchceu.es Experto en reproducción en pequeños rumiantes Paula Martinez-Ros

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	x
ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS GENERAL	3
Hipótesis específicas	3
OBJETIVO GENERAL	4
Objetivos Específicos	4
2. REVISION DE LITERATURA	5
2.1 Importancia de la producción de pequeños rumiantes en México	5
6	
2.2 Sistemas de producción en la Comarca Lagunera	6
2.3 Generalidades del ciclo estral en ovejas y cabras	7
2.3.1. Fase lútea	9
2.3.2. Fase folicular	11
2.3.3. Esteroidogénesis	13
2.4. Estacionalidad reproductiva	15
2.5 Control hormonal del ciclo estral	19
2.5.1 Progesterona natural y sus análogos sintéticos	19
2.5.2 Tratamientos tradicionales	21
2.5.3 Tratamientos cortos	22
2.5.4 Tratamientos ultracortos	23
2.6 Hormona liberadora de gonadotropina (GnRH)	24
2.6.1 Mecanismo de acción	25
2.6.2 GnRH como tratamiento complementario	27
2.6.3 Tratamientos a base progesterona más GnRH	27
2.6.4 Tratamientos a base prostaglandinas más GnRH	29
2.7 Hormona coriónica humana (hCG)	30

2.7.1 Mecanismo de acción	30
2.7.2. hCG como tratamiento complementario.....	32
2.7.3 Tratamientos a base de progesterona + hCG	32
3. ARTICULOS.....	34
I. Efficiency of hCG for Inducing Resumption of Ovarian Cyclicity and Synchronized Ovulations during the Seasonal Anestrous in Sheep.....	34
II. Using two GnRH analogues to improve reproductive parameters in goats? 44	
4. CONCLUSIÓN.....	65
5. LITERATURA CITADA	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Inventario nacional de ovejas y cabras en México.....	6
Figura 2. Representación del ciclo estral de la oveja.....	8
Figura 3. Cambios que tienen lugar en las células (GC) durante la foliculogénesis.	13
Figura 4. Ilustración de la esteroidogénesis en el folículo y el cuerpo lúteo.....	15
Figura 5. Regulación de luz y oscuridad del reloj biológico.....	17
Figura 6. Representación esquemática de la regulación de las neuronas Kisspeptinas (Kp) y KNDy (Kisspeptina, Neuroquinina B y Dinorfina) en ovejas adultas.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 7. Comparación de un tratamiento tradicional (12-14 días) y un tratamiento a corto plazo (5-7 días).....	22
Figura 8. Representación esquemática del protocolo de progesterona a corto plazo para inducir / sincronizar el estro.....	23
Figura 9. Representación del hipotálamo de la oveja donde se muestra la distribución de neuronas con receptores para estradiol y neuronas productoras de GnRH.....	25
Figura 10. Mecanismo de acción de la GnRH.....	26
Figura 11. Mecanismo de acción de la hCG en primates	31

ABREVIATURAS

Abreviación	Concepto	Abreviación	Concepto
5HT	Serotonina	IGFBP	Proteína de Unión al Factor de Crecimiento Similar a la Insulina
AMPC	Adenosín monofosfato cíclico	Kiss1	Supresor de metástasis KiSS-1
ARC	Núcleo arcuato	KISS1R	Receptor Kp
ASMT	Acetilserotonina O-metiltransferasa	KIT	KIT Proto-Oncogene, Receptor Tirosina Quinasa
Ca ²⁺	Calcio	KITL	Ligando KIT
CIDR	Dispositivo Intravaginal de Dosis Controlada	KNDy	Kisspectina, Neuroquinina B y Dinorfina.
CL	Cuerpo Lúteo	KOR	Recetor Dyn
CX37	Conexina 37	Kp	Kisspectina
CX43	Conexina 43	LH	Hormona Luteinizante
CYP11A	Familia del citocromo P450 11 Subfamilia A Miembro 1	LHCGR	Receptor de LH
CYP17	17 α -hidroxilasa	ME	Eminencia media
CYP19	Aromatasa	mg	Miligramos
DA	Dopamina	MGA	Acetato de Medroxiprogesterona
Dyn	Dinorfina	mm	Milímetro
E2	17 β Estradiol	MT1	Metalotioneína 1A
eCG	Gonadotropina Coriónica Equina	MTORC1	mTOR complex 1
ER α	Receptor de estrógeno α	NA	Noradrenalina
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación	NAT	Alquilamina nacetiltransferasa
FGA	Acetato de Fluorogestona	ng/mL	Nanogramo/ mililitro
FOXL2	Forkhead Box L2	NK3R	Receptor NKB
FSH	Hormona Folículo Estimulante	NKB	Neuroquinina B
GABA	Acido gamma-aminobutírico	NSQ	Núcleo supraquiasmático
GC	Células de la Granulosa	P4	Progesterona
GDF9	Factor de diferenciación del crecimiento 9	PGF2 α	Prostaglandinas F2 α
GDP	Guanosina Difosfato	PMSG	Gonadotropina sérica de Yegua Gestante
GnRH	Hormona Liberadora de Gonadotropinas	POA	Área preóptica
GTP	Guanosina Trifosfato	PPG	Propilenglicol
hCG	Hormona coriónica Humana	PR	Receptor de progesterona
HIOMT	hidroxindol O-metiltransferasa	PVN	Núcleo paraventricular

HSD3B1	hidroxi-delta-5-esteroide deshidrogenasa, 3 beta- y esteroide delta-isomerasa 1	SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
IATF	Inseminación Artificial a Tiempo Fijo	STAR	Proteína Reguladora Aguda Esteroidogénica
IGF	Factor de Crecimiento Similar a la Insulina	UI	Unidades internacionales
IGF1	Factor de Crecimiento Similar a la Insulina, Tipo 1	VRGE	Factor de crecimiento endotelial vascular
IGF2	Factor de Crecimiento Similar a la Insulina, Tipo 2	µg	Microgramos

RESUMEN

ACTUALIZACIÓN DE TRATAMIENTOS A BASE DE GnRH Y hCG PARA LA INDUCCIÓN Y SINCRONIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS REPRODUCTIVOS DE PEQUEÑOS RUMIANTES.

ZURISADAY SANTOS JIMÉNEZ

Doctorado en Ciencias en Producción Agropecuaria
Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro
Unidad Laguna

Dra. Guadalupe Calderón Leyva
Asesor Principal

En busca de nuevas alternativas en los tratamientos de inducción y sincronización en pequeños rumiantes se realizaron los siguientes experimentos.

Experimento 1: evaluar si la 300 UI de hCG administrada al momento del retiro del CIDR, era capaz de reanudar la actividad estral en ovejas durante la época de anestro estacional. Nuestros resultados determinaron que la administración de hCG fue eficaz para inducir el estro, promover crecimiento folicular y una ovulación retrasada pero significativa (> 84%) el día 10 después de la extracción del CIDR; además, también se observó una mayor tasa de implantación embrionaria en comparación con el grupo tratado con solución salina.

Experimento 2: determinar si un tratamiento de progesterona natural administrada con dos aplicaciones de dos análogos de GnRH (Buserelina/Gonadorelina), mejoraría la sincronización de la respuesta estral, desarrollo, folicular y la ovulación en cabras. Respecto a la respuesta encontramos que dos aplicaciones de GnRH más con 20 mg de progesterona im, indujo crecimiento anormal en folículos medianos y grandes independientemente del análogo utilizado, luteinizando el folículo e inhibiendo la ovulación. En conclusión, nuestros resultados siguieron que el uso de hCG puede ser una opción para inducir la actividad estral siempre y cuando se acompañe de efecto macho para mejorar la fertilidad y por otro lado el uso de análogos de GnRH (Gonadorelina/Buserelina)

en cabras no resultó ser una opción al momento de sincronizar el celo y la ovulación, ya que indujo el crecimiento anormal de folículos.

Palabras clave: inducción/estro; sincronización, pequeños rumiantes, gonadotropinas.

ABSTRACT

UPDATE OF TREATMENTS BASED ON GnRH AND hCG FOR THE INDUCTION AND SYNCHRONIZATION OF THE REPRODUCTIVE PARAMETERS OF SMALL RUMINANTS.

ZURISADAY SANTOS JIMÉNEZ

Doctorado en Ciencias en Producción Agropecuaria

Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

Unidad Laguna

Dra. Guadalupe Calderón Leyva

Asesor Principal

In search of new alternatives in induction and synchronization treatments in small ruminants, the following objectives were established for the following experiments. Experiment 1: to evaluate whether the 300 IU of hCG administered at the time of CIDR withdrawal could resume estrus activity in sheep during the seasonal anestrus period. Our results determined that hCG administration was effective in inducing estrus, promoting follicular growth, and delayed but significant ovulation (> 84%) on day 10 after CIDR extraction; in addition, a higher embryo implantation rate was also observed compared to the saline-treated group. Experiment 2: determine if a treatment of natural progesterone administered with two applications of two GnRH analogues (Buserelin / Gonadorelin), would improve the synchronization of the estrus response, development, follicular and ovulation in goats. Regarding the response, we found that two more GnRH applications with 20 mg of im progesterone induced abnormal growth in medium and large follicles regardless of the analog used, luteinizing the follicle and inhibiting ovulation. In conclusion, our results suggest that the use of hCG can be an option to induce estrous activity as long as it is accompanied by a male effect to improve fertility and, on the other hand, the use of GnRH analogues (Gonadorelin / Buserelin) in non-goats. it turned out to be an option when synchronizing estrus and ovulation, since it induced abnormal follicle growth.

Keywords: induction/estrus; synchronization; small ruminants; gonadotropins.

I. INTRODUCCIÓN

El crecimiento de la población y la demanda de alimentos han llevado a buscar alternativas viables para la obtención de alimentos de origen animal, en proyección a futuro se cree, que para el año 2050 la población mundial será de 10 mil millones de personas, aumentando el consumo per cápita de proteína animal, por tal motivo se debe eficientizar las estrategias reproductivas para cubrir dicha demanda (Menchaca, 2021). Las ovejas y cabras son producidas regularmente en entornos marginales donde existe escases de pasto y en climas desfavorables. Se les conoce coloquialmente como “las vacas de los pobres” por su bajo costo de inversión y producción requeridos, además, son de particular interés para la aplicación práctica del concepto de sostenibilidad el sistema de producción deba de ser técnicamente factible y viable económica y ambientalmente (Carias, 2013; FAO, 2021). La leche de cabra u oveja ha sido considerada un alimento ideal para combatir la desnutrición en personas que habitan zonas y países pobres, debido a su alto valor proteico (Haenlein, 2001). En los últimos años el uso de hormonas exógenas para la inducción y sincronización de la actividad estral en pequeños rumiantes se ha intensificado, y se han establecido tratamientos de uso cotidiano con resultados alentadores (Abecia *et al.*, 2012). Pero en la actualidad, existe una gran presión social sobre la manera de extraer ciertas hormonas como es el caso de la Gonadotropina Coriónica Equina (eCG) misma que se ha utilizado desde hace 70 años y que se produce de manera endógena en las copas endometriales de yeguas gestantes de entre los 40 a 120 días de gestación, haciendo uso indiscriminado de las hembras para dicho fin (Manteca-Vilanova *et al.*, 2019; González-Bulnes *et al.*, 2020).

Por lo tanto, en busca de suplir el uso de la eCG en los tratamientos de sincronización y/o inducción en pequeños rumiantes, el trabajo del investigador es buscar opciones que mejoren o igualen la respuesta reproductiva en las hembras tratadas. Las líneas de investigación apuntan a evaluar los efectos de análogos de gonadotropinas tal como son la Hormona Liberadora de

Gonadotropinas (GnRH) y/o Hormona Coriónica humana (hCG). El uso de GnRH se ha visto como una opción viable para sincronizar la ovulación en ovejas, cuando se administró 54 h después del retiro de un dispositivo intravaginal impregnado con progesterona natural (CIDR; Martínez-Ros y González-Bulnes, 2019), pero su uso no fue viable en la época de anestro (Santos-Jiménez et al., 2020a) además de que existe poca información cuando se utiliza en cabras. Por otro lado, en cabras tratadas con una inyección de 100 UI de hCG 24 horas después de la aplicación de 25 mg de progesterona im, se encontró que el 100% de las hembras mostraron signos de celo y ovulación (Alvarado-Espino *et al.*, 2016) el problema que es actualmente su uso en ovejas no está bien estudiado. Por lo que hipotetizamos que el uso de análogos de gonadotropinas, pudieran mejorar los parámetros reproductivos en cabras y ovejas expuestas a las mismas, al inicio o al finalizar el tratamiento con progesterona (progestágeno y/o inyectable), igualando o mejorando la repuesta de un tratamiento tradicional a base de progesterona más eCG, durante el anestro estacional y la época de transición/reproducción.

HIPÓTESIS GENERAL

El uso de análogos de gonadotropinas, más progesterona (en dispositivo intravaginal y/o inyectable) en cabras y ovejas mejoran los parámetros reproductivos que se obtienen de un tratamiento tradicional a base de progesterona más eCG, durante el anestro estacional y la época reproductiva.

Hipótesis específicas

- ✓ La administración de una descarga aguda de hCG reanuda la actividad estral y la sincronización de la ovulación en ovejas durante el anestro estacional.

- ✓ La utilización de análogos sintéticos de GnRH administrados en dos dosis aunado a un tratamiento con progesterona intramuscular, durante la época reproductiva en cabras estimula el desarrollo folicular, sincroniza el estro y la ovulación.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la efectividad de la administración de análogos de gonadotropinas para inducir y sincronizar la actividad reproductiva en ovejas y cabras bajo un tratamiento previo de progesterona en diferentes tiempos de administración y épocas del año.

Objetivos Específicos

- ✓ Evaluar si 300 IU de hCG administrada al momento del retiro del dispositivo intravaginal con progesterona (CIDR) es capaz de reanudar la actividad estral en ovejas durante la época de anestro estacional.

- ✓ Determinar la eficacia de un tratamiento de progesterona natural administrada con dos aplicaciones de análogos de GnRH en diferentes tiempos durante la época reproductiva, sobre la sincronización de la respuesta estral, desarrollo folicular y ovulación en cabras Alpinas.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Importancia de la producción de pequeños rumiantes en México

En México el inventario nacional de cabras para el año 2020 es de 8,830,720 de los cuales la región laguna que comprende parte de Coahuila y Durango cuenta con 392,407 teniendo una gran disminución si lo comparamos a el año 2011 donde contaba 430,381 y una producción lechera de 78,074.79 misma que aportaba el 48 % de la producción nacional (SIAP, 2020).

En lo que respecta a la producción de leche de cabras en el año 2020 se registró un total de 163,590 miles de litros de leche de los cuales los estados con mayor aportación fueron Coahuila con 44,888, seguido de Guanajuato con 42,792 y en tercer lugar el estado de Durango 24, 822.24 mil de litros de leche. La Comarca Lagunera aporta a la producción nacional 57,622 miles de litros de leche lo que corresponde al 35% de la producción nacional (SIAP, 2020). Esto nos muestra que la mayor producción de leche se establece en el norte de México, y habla de lo bien que la cabra se desempeña en terrenos semiáridos.

Por otro lado, para el año 2020 se cuenta con un inventario nacional de 8,725.882 millones de cabezas de ganado ovino con un cierre productivo de 64,758 ton de carne siendo Edo. de México e Hidalgo, los estados con mayor número de ovejas con 1,355,113 y 1,128,198, respectivamente. Para la Comarca Lagunera la producción de carne y leche de oveja no es una actividad prioritaria por lo que solo representan el .13 % del inventario nacional (11,812) (Figura 1). El consumo de leche en México puede ser de forma líquida o transformada a quesos o dulces principalmente cajeta, chiclosos y jamoncillos (Meza-Herrera, 1987).



Figura 1. Inventario nacional de ovejas y cabras en México (SIAP,2020)

2.2 Sistemas de producción en la Comarca Lagunera

El sistema de producción de leche caprina y carne ovina es el más predominante en el norte de México. Pero presenta ciertas limitantes como son los problemas de estacionalidad reproductiva asociadas principalmente al fotoperiodo y la nula precipitación pluvial que va de la mano con el desarrollo de los pastos y matorrales (Salinas-González *et al.*, 2013). La producción de leche de cabra representa una de las actividades más importantes en la mano de obra familiar ofreciendo estabilidad laboral en la mayoría de los productores que la realizan. (Escareño-Sánchez *et al.*, 2011).

La mayoría de los productores pastan sus cabras en áreas de cultivo, de rastrojo y residuos de cultivo (Escareño-Sánchez *et al.*, 2011). Los sistemas de producción en la comarca lagunera son intensivo, extensivo y mixto (Vazquez-Garcia, 2005).

En un trabajo realizado por Jaquez *et al.* (2016) se evaluó cuál era el sistema predominante en productores del sur de Coahuila, en esta investigación se pudo constatar que el principal sistema de producción en la Comarca Lagunera es el

sistema extensivo, ya que el 94.4% de las unidades de producción encuestadas corresponden a este tipo, mientras que el sistema mixto e intensivo tiene una participación mínima de tan sólo 2.7% de los encuestados. Sin embargo, existen diferencias a la hora de nombrar el sistema en que los caprinocultores producen a sus cabras; por ejemplo se ha obtenido evidencia que el pastoreo ocurre en áreas de rastrojo y residuos de cultivo, en un promedio de 3.5 hasta 12 horas al día para después regresar a sus corrales para ofrecer algún tipo de suplementación (Escareño-Sánchez *et al.*, 2011; Farrera-Vázquez *et al.*, 2020). Por lo que el sistema no es extensivo como tal sino más bien semi-intensivo.

2.3 Generalidades del ciclo estral en ovejas y cabras

La reproducción en ovejas y cabras se describe como estacional; el inicio y la duración de la temporada de reproducción depende de varios factores como la latitud, el clima, la raza, el estado fisiológico, la presencia del macho, el sistema de reproducción y específicamente el fotoperíodo (Simões, 2015; Soto *et al.*, 2020). En las regiones templadas, la reproducción se describe como estacional con un período de comportamiento estral y ovulaciones espontaneas de manera cíclica, en otoño e invierno e importantes diferencias en la estacionalidad entre razas y ubicaciones (Fatet *et al.*, 2012; Simões, 2015; Redden y Thorne, 2020). En general, en México la época reproductiva de las cabras ocurre de septiembre a febrero, y en los machos de mayo a diciembre (González-Maldonado *et al.*, 2021).

La oveja presenta un ciclo estral de un promedio de entre 17 días (con un rango de 15-19 días), y se divide en una fase lútea desde el día 2 hasta el día 14-15, (tomando como referencia día 0 al inicio del estro) y una fase folicular desde el día 14 hasta el día 1. Los signos de estro pueden duran entre 18 a 72 horas. La ovulación se da antes de finalizar la actividad estral alrededor de 25 a 30 h después del inicio (Goodman, 1994; Gootwine, 2011; Bartlewski *et al.*, 2011; De castro *et al.*, 2014).

En la cabra la duración de ciclo es de un promedio de entre 21 días (con un rango de 19-23 días), y se divide en una fase lutea desde el día 2 hasta el día 16

(tomando como referencia día 0 al inicio del estro) y una fase folicular desde el día 17 hasta el día 1. El estro tiene una duración promedio de 36 horas entre un rango de 24 a 48 horas y la ovulación al igual que en ovejas ocurre antes de finalizar el estro; (figura 2) (Fatet *et al.*, 2012; De castro *et al.*, 2014).

En ambas especies el inicio de la actividad estral se puede dividir en dos fases: fase de proceptividad que consiste en la búsqueda y la estimulación de la pareja masculina, mientras que la fase de receptividad consiste en la expresión del reflejo de inmovilización en respuesta a empujones masculinos, la aceptación de monta y la cópula (Fabre-Nys y Gelez, 2007).

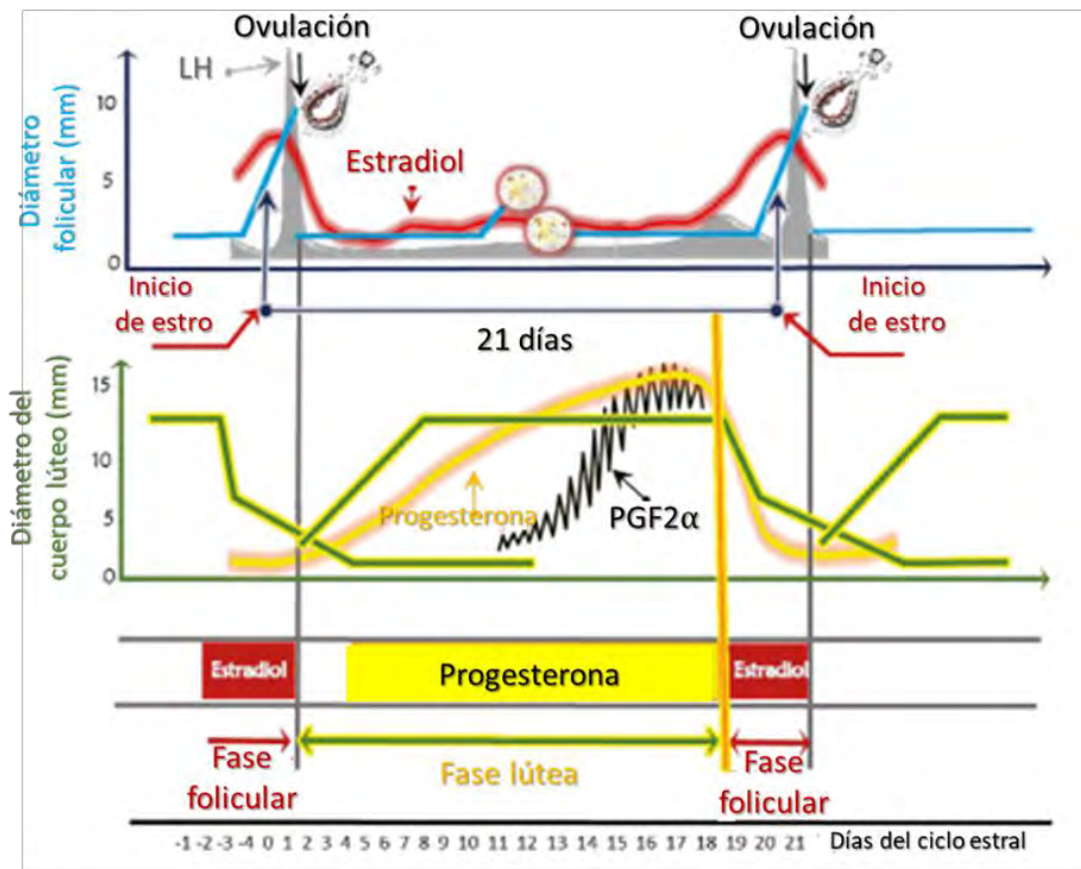


Figura 2. Representación del ciclo estral de la oveja. Las líneas roja, amarilla, verde y azul y negra indican las variaciones en las concentraciones sanguíneas de estradiol y progesterona, el diámetro del cuerpo lúteo y el fólculo, y el patrón de secreción de prostaglandina (PGF2α) a lo largo del ciclo estral, respectivamente. El gráfico gris representa el patrón de secreción de LH (Adaptado de González-Maldonado *et al.*, 2021).

Una característica del reinicio de la actividad cíclica luego del anestro estacional en ovejas así como el anestro postparto o la pubertad-, es que generalmente la primera ovulación no es acompañada de comportamiento estral y es seguida por una fase lútea de corta duración (< 8 días) debido a la presencia de un cuerpo lúteo que secreta progesterona por un corto período (cuerpo luego de vida corta) (Hunter, 1990), aunque estudios ultrasonográficos más recientes han demostrado que muchas veces ocurre una falla en la ovulación con la consecuente formación de estructuras quísticas luteinizadas que liberan progesterona por cortos períodos (Rubianes *et al.*, 1997). La ocurrencia de estos ciclos cortos puede estar relacionada ya sea a la necesidad de exposición previa a la progesterona para preparar a los folículos para que se vuelvan cuerpos lúteos completamente funcionantes, y/o para regular el momento de la liberación de PGF2 α endógena (Inskoop, 1994). Algunos autores señalan que en cabras a diferencia de las ovejas, no se requiere un período prolongado de exposición con progesterona antes del estradiol para exhibir celo (Chemineau, 1983). Sin embargo, se ha observado que tanto las cabras púberes como las adultas al comienzo de la temporada de reproducción presentan un ciclo corto de unos 8 días. Esto se debe a una breve fase lútea que dura sólo 5-6 días, seguida de un segundo ciclo que suele ser de duración normal (Pineda, 1983).

2.3.1. Fase lútea

Los niveles de progesterona suelen ser indetectable al inicio del ciclo estral para después incrementar gradualmente entre 2 a 8 días hasta que alcanza una concentración máxima de 1.5 a 3 ng/mL a medida que completa la luteogénesis (Ramos y Silva, 2018). Durante el inicio de la fase lútea el aumento de las concentraciones periféricas de progesterona producidas por el cuerpo lúteo, disminuyen la frecuencia de los pulsos de GnRH y LH (revisado por Caraty y Skinner, 1999).

La formación del cuerpo lúteo ocurre después del pico de LH, ya que la membrana basal entre la teca interna y las células de la granulosa comienzan a descomponerse, ocurre una extravasación de glóbulos rojos hacia la cavidad

antral y esta se llena de sangre. Los vasos sanguíneos de la teca invaden la capa de células de la granulosa luteinizante y bajo la influencia de factores angiogénicos, se desarrollan estructuras vasculares más extensas (Duncan, 2019). Las células de la teca-luteína forman pequeños grupos en la periferia de las células de la granulosa-luteína (Devoto *et al.*, 2009). Finalmente, cada célula de la granulosa-luteína colinda con una célula endotelial vascular y hay tantas células endoteliales como células esteroidogénicas. Las células de la granulosa-luteína continúan expresando CYP19 y las células de la teca-luteínica continúan expresando CYP17, por lo que el cuerpo lúteo produce tanto andrógenos como estrógenos así como otras hormonas peptídicas como inhibina A, relaxina y oxitocina. La función del cuerpo lúteo depende de LH, al expresar en las células granulosa-luteína y teca-luteína receptores a LH y no a FSH. Aunque la LH es necesaria para la función lútea los niveles circulantes de LH son bajos durante la fase lútea y no son paralelos a la producción de progesterona (Duncan, 2019). Por lo que se ha sugerido que la acción de la LH sobre las células lúteas esteroidogénicas también este modulada por factores reguladores paracrinos locales de la esteroidogénesis en el cuerpo lúteo. Se ha informado que las inhibinas y activinas, citocinas, factores de crecimiento, eicosanoides, esteroides y otras moléculas como posibles reguladores locales de la función lútea (Duncan *et al.*, 2009).

La producción de la progesterona se deriva principalmente de colesterol y la evidencia sugiere que el colesterol lúteo se deriva directamente del plasma y de la movilización de las reservas intracelulares. El colesterol se transporta en el plasma como complejos de lipoproteínas y se utiliza inmediatamente para la esteroidogénesis o se esterifica y se almacena en gotitas de lípidos dentro de la célula responsable del color y textura característicos del cuerpo lúteo. El primer paso para la síntesis de la progesterona es la de movilizar el colesterol desde el citoplasma hasta la membrana citoplasmática interna de la mitocondria. La proteína STAR cuando es estimulada por la LH, es la que se encarga de transportar al colesterol, posteriormente la escisión de la cadena lateral del

colecsterol (CYP11A), convierte el colecsterol en pregnolona, que se convierte en progesterona por la acción de la HSB3B1 (Figura 4) (Duncan, 2019).

2.3.2. Fase folicular

Desarrollo y crecimiento

El crecimiento folicular se da en forma de ondas foliculares presentándose 3-4 ondas en ovejas (Bartlewski *et al.*, 2011) y 4-5 en cabras (Ginther y Kot, 1994), con un intervalo de crecimiento de entre 4 a 7 días en ambas especies, a este crecimiento le precede un aumento de las concentraciones séricas de FSH secretada por la glándula pituitaria la cual estimula el crecimiento folicular (Ramos y Silva, 2018). Una onda folicular se define como un grupo de pequeños folículos que dan origen a uno o más folículos ≥ 5 mm de diámetro (García-Pintos y Menchaca, 2016). Por otra parte, Bartlewski *et al.*, (1999) definió una onda folicular como un grupo de folículos que crece sincrónicamente de 2 a 3 mm a 5 mm de diámetro antes de la regresión u ovulación, de los cuales uno o más folículos continúan creciendo (folículos dominantes), mientras que otros folículos retroceden (folículos subordinados; Ramos y Silva, 2018).

Las células pregranulosas y los ovocitos de los folículos primordiales corticales permanecen latentes durante varios meses en roedores y humanos. Durante la transición de folículos primordiales a primarios, la capa única de células aplanadas de la granulosa cambia de morfología para convertirse en células de la granulosa cuboideas. Esta conversión es independiente, al estímulo de las gonadotropinas liberadas por la hipófisis, si no que está regulado por factores producidos dentro del ovario y requiere la interacción entre las células pregranulosas y el ovocito. Uno de los principales factores a nivel ovárico en animales adultos es el FOXL2, en estudios en ratones con ausencia de este factor se ha determinado que las células permanecen aplanadas, lo que da como resultado una ausencia de crecimiento folicular. De manera similar la inhibición de MTORC1 en las células de la granulosa bloquean la activación del folículo latente, mientras que su sobre activación acelera este proceso. Otro sistema de ligandos especial para este crecimiento es el KIT y KIT. El ovocito expresa el

ligando KIT, un receptor de la tiroxina quinasa, en su superficie, mientras que las células de la aplanadas de la granulosa expresan KITL, que es capaz de unirse a KIT para promover la activación del folículo. A medida que el crecimiento del folículo sigue su paso de la etapa primaria a preantral la capa de las células cuboideas prolifera para formar múltiples capas. Se sabe que uno de los factores que contribuyen a la diferenciación del crecimiento es el factor 9 (GDF9). Asimismo las conexinas 43 y 37 (CX43 Y CX37) son componentes entre las uniones gap entre el ovocito y las células de la granulosa circundantes, detiene la foliculogénesis en la etapa primaria y se altera la diferenciación de las células de granulosa (Baumgarten y Stocco, 2018). La formación del antro folicular (cavidad llena de líquido) se da durante la progresión de folículo preantral hasta la fase preovulatoria. El crecimiento folicular final está impulsado principalmente por la expansión del líquido dentro del antro. La formación del antro es dependiente de las gonadotropinas, hacia el final de las primeras etapas de la foliculogénesis, los folículos ováricos (2-3 mm) se vuelven sensibles a las hormonas gonadotrópicas, lo cual es un requisito previo para el crecimiento y maduración folicular antral (Driancourt *et al.*, 1985; Campbell *et al.*, 1999; Bartlewski *et al.*, 2011), el papel que desempeña el antro es el de estimular la producción y secreción de polisacáridos y proteínas secretadas por las células de la granulosa. Estas células producen hialuronano y versicano un proteoglicano de condroitin sulfato que viaja hacia el espacio extracelular. La acumulación y los enlaces cruzados de estas moléculas general un gradiente osmotico, que a su vez extrae liquido de la vasculatura tecal (figura 3). El antro separa las células de la granulosa en dos poblaciones de células con funciones distintas: del cúmulo y murales. Las células del cumulo de la granulosa rodean al ovocito y participan activamente en la maduración del ovocito. Mientras que las células murales están cerca de la pared del folículo y son el sitio principal de síntesis de hormonas esteroides sexuales como el estradiol que se produce cuando ocurre la maduración folicular o fase preovulatoria (Baumgarten y Stocco, 2018).

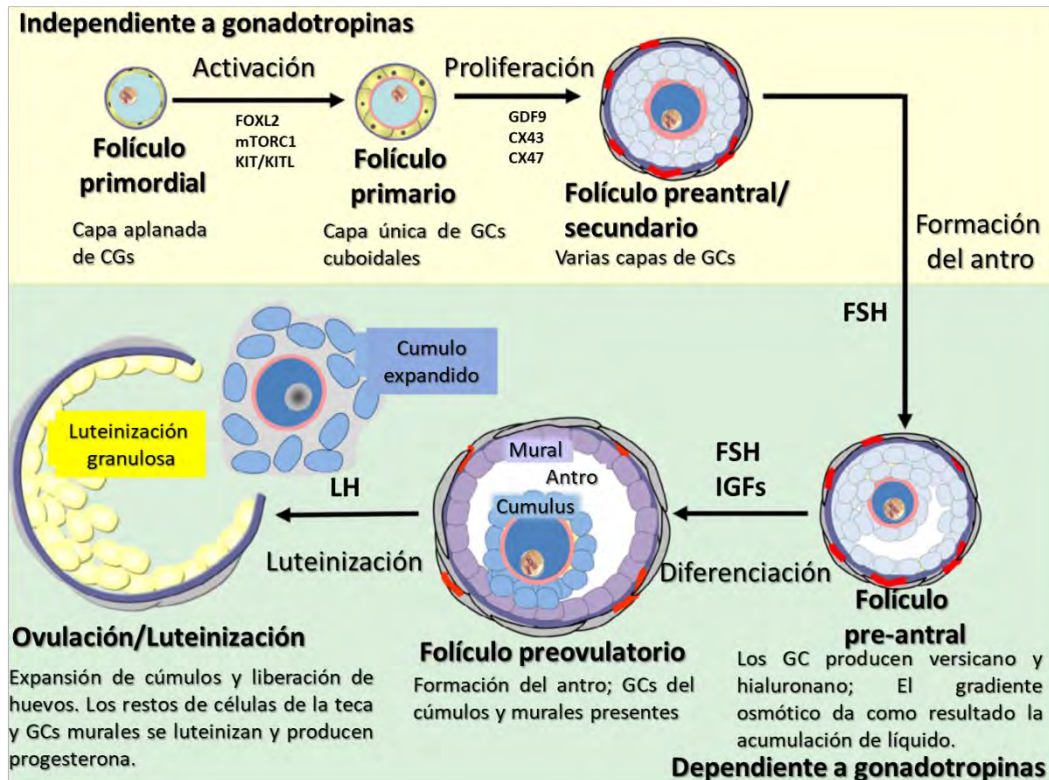


Figura 3. Cambios que tienen lugar en las células (GC) durante la foliculogénesis. La progresión de los folículos desde el estadio primordial al pre-antral depende de factores intra ováricos y no requiere gonadotropinas. Los procesos de formación del antro y diferenciación de las células de la granulosa hasta la etapa de folículo preovulatorio están regulados por la FSH. La LH controla la ovulación y la luteinización (Adaptado y modificado de Baumgarten y Stocco, 2018).

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

2.3.3. Esteroidogénesis

Existe dos tipos de células que componen al folículo las células de la granulosa y las células de la teca, mismas que son de naturaleza esteroidogénica. Se ha

evaluado que las células de la granulosa aisladas eran capaces de producir estrógenos cuando estaban expuestas a hormonas precursoras. Por otro lado, las células de la teca aisladas producen progesterona y andrógenos. Se han determinado la localización de enzimas esteroideogénicas dentro del folículo y se encontró que las células de la teca expresan 17 α -hidroxilasa (CYP17), enzima responsable de la síntesis de andrógenos, estas no expresan aromatasa (CYP19), enzima responsable de la aromatización de andrógenos a estrógenos. Por el contrario, las células de la granulosa expresan CYP19 pero no tienen actividad CYP17. Las células de la granulosa y la teca realizan un trabajo en conjunto para la biosíntesis folicular de estrógenos. Así mismo otra de las funciones de la LH es la de estimular la formación de andrógenos en las células de la teca y la FSH estimula la conversión de andrógenos en estrógenos en las células de la granulosa (figura 4). (Duncan, 2019). En estudios donde se ha evaluado los patrones de secreción de FSH en las ondas foliculares en ovejas, se demostró que la FSH controla principalmente la etapa inicial del crecimiento del folículo antral, pero posteriormente el crecimiento y ovulación son independientes de las fluctuaciones de FSH (Bartlewski *et al.*, 1999, 2000; Duggavathi *et al.*, 2003; Bartlewski *et al.*, 2011). También en este proceso participan los factores locales como el sistema del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), en la selección del crecimiento de los folículos y en el desarrollo lúteo (Mazerbourg *et al.*, 2003). El sistema comprende de dos ligandos, IGF1 e IGF2; y a su vez receptores de IGF de tipo 1 y tipo 2, además de seis proteínas de unión a IGF principales IGFBP (proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina). El factor IGF-1 se encuentra mayormente en hígado mientras que el IGF-2 se encuentra en el folículo y CL, se relacionan positivamente con el aumento de peso corporal y el aumento diario promedio (Lucy, 2008; Kumar y Laxmi, 2015).

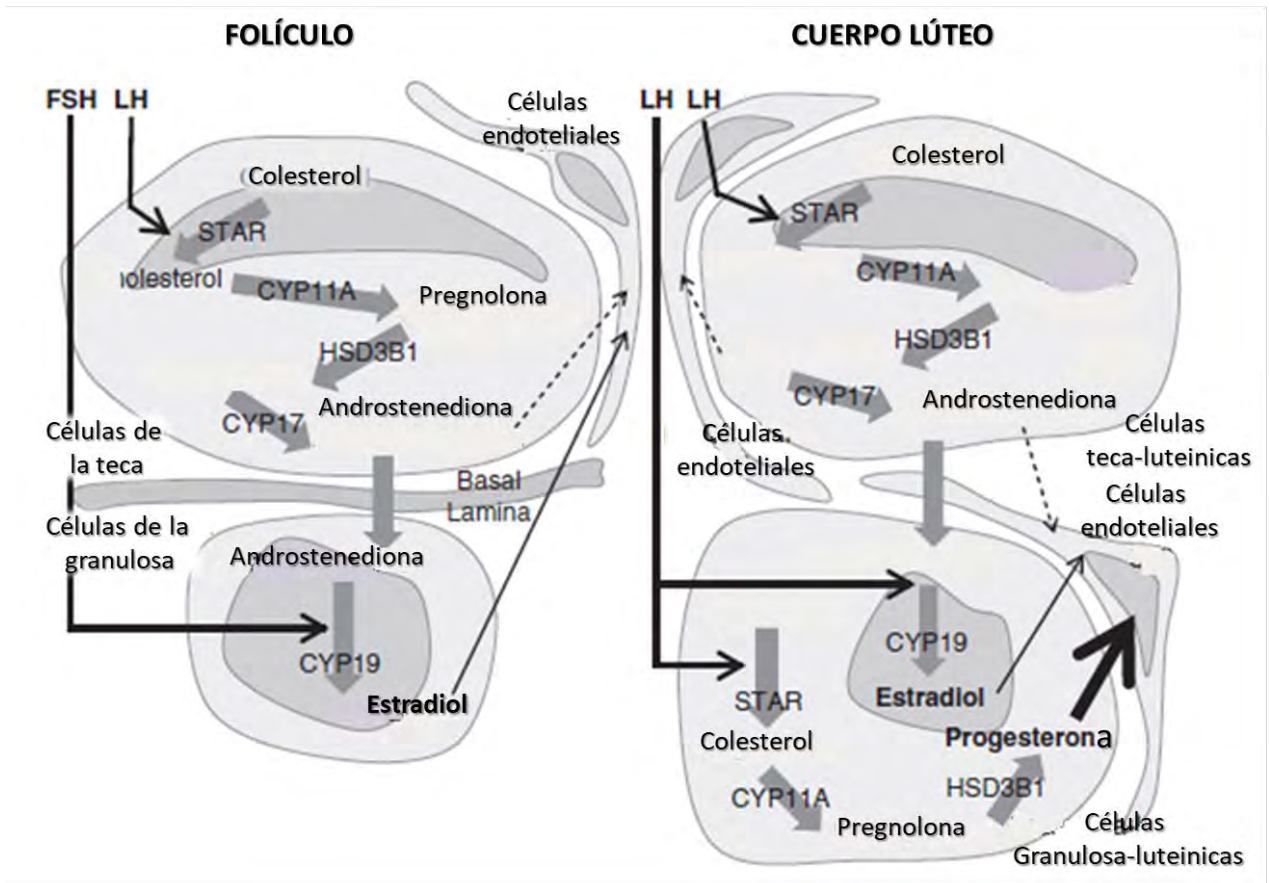


Figura 4. Ilustración de la esteroidogénesis en el folículo y el cuerpo lúteo. En el folículo, la síntesis de estradiol requirió tanto LH como FSH y células de la teca y células de la granulosa. En el cuerpo lúteo, tanto las células de teca-luteína como las de granulosa-luteína pueden secretar progesterona. Las células de teca-luteína continúan secretando andrógenos y las células de la granulosa-luteína continúan secretando estrógeno, pero solo se requiere LH para la esteroidogénesis lútea (Adaptado de Duncan, 2019).

2.4. Estacionalidad reproductiva

Las ovejas y cabras comparten una particularidad en cuanto a su forma de reproducirse. Misma que se ve interrumpida durante las primavera y parte del verano por lo cual se les conoce como paléstricos estacionales de días cortos. Esta interrupción está regulada por los efectos del fotoperiodo (Arroyo, 2011). A diferencia de la vacas y cerdas, los pequeños rumiantes no lograron romper el patrón estacional reproductivo mismo que tiene como fin que las hembras tengan

sus partos cuando las condiciones ambientales y de alimentación son las óptimas para el mantenimiento y preservación de sus crías (Malpaux *et al.*, 1996). El mecanismo por el cual se regula el ciclo reproductivo de los pequeños rumiantes tiene que ver con la producción de melatonina. Cuando los días son más cortos la retina del ojo capta una señal lumínica que posteriormente se convierte en una señal eléctrica que viaja hacia el hipotálamo a través del tracto retino-hipotalámico hasta el núcleo supraquiasmático (NSQ), para llegar al núcleo paraventricular (PVN), esta señal en el ganglio cervical superior se convierte en una señal química (Legan y Karsch, 1979), donde se libera noradrenalina la cual es captada por los receptores α y β de los pinealocitos donde se sintetiza la enzima N-acetil-transferasa que es indispensable para la producción de melatonina a través del triptófano de los pinealocitos de la glándula pineal, (figura 5) (Malpaux *et al.*, 1997; Arendt, 1998; Reiter *et al.*, 2009; Arroyo, 2011). La melatonina actúa indirectamente, a través de sus receptores (MT1) presentes en el pars tuberalis del hipotálamo como un potente control estacional de la liberación de la kisspectina para la secreción de GnRH y la inhibición de la liberación de neuronas de dinorfinas para iniciar la actividad reproductiva (Li *et al.*, 2012). Cuando las horas luz van en amento la secreción de melatonina es menor por lo cual durante el anestro estacional esta disminución provoca que se aumente la sensibilidad a los pulsos de GnRH y por ende los de LH (Chemineau, 1993). Este efecto negativo del E2 a nivel hipotalámico está regulado por neuronas dopaminérgicas a nivel de eminencia media (núcleo donde llegan las proyecciones de GnRH desde el área preóptica; POA), para inhibir la secreción de GnRH (Karsch *et al.*, 1984; Malpaux *et al.*, 1999).

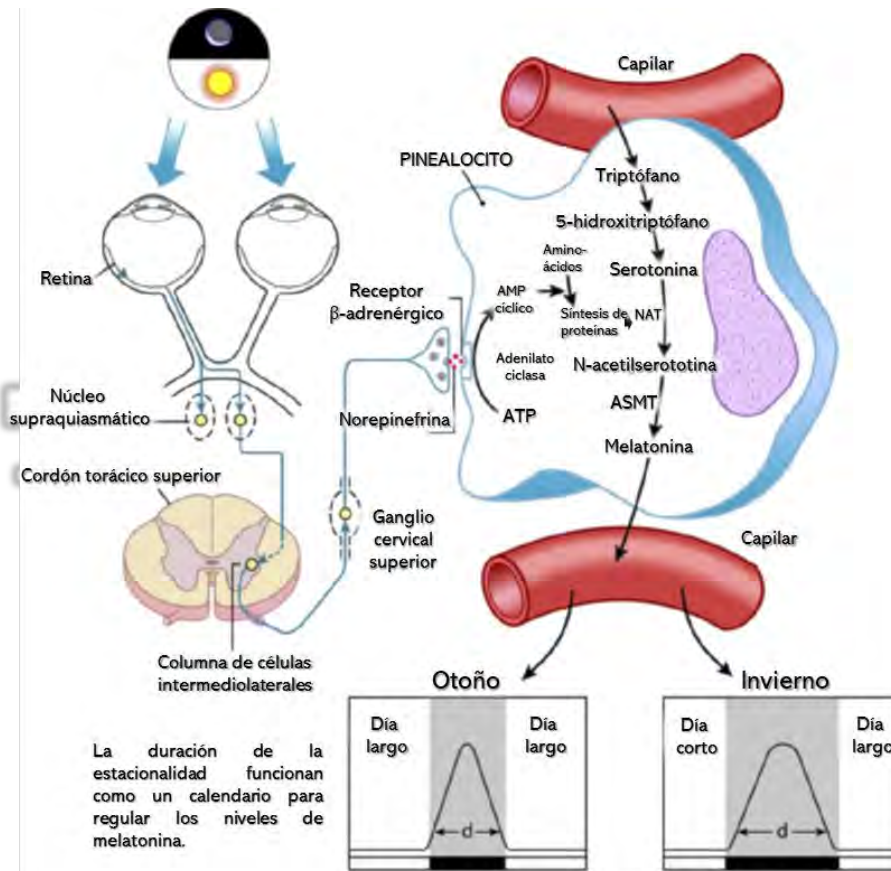


Figura 5. Regulación de luz y oscuridad del reloj biológico (núcleo supraquiasmático), regula la producción de melatonina secretada por la glándula pineal y la estacionalidad reproductiva en mamíferos fotoperiódicos.

Las células fotorreceptoras especializadas de las retinas (células ganglionares que contienen melanopsina) median los efectos de la luz (450–490 nm) sobre el reloj biológico y la producción de melatonina. Se muestran las conexiones neuronales entre los ojos y la glándula pineal (pinealocito). Por la noche, las neuronas simpáticas posganglionares que terminan en la glándula pineal, liberan noradrenalina, que activa principalmente los receptores β -adrenérgicos para estimular una cascada de eventos moleculares que culminan en la producción y liberación de melatonina. Los cambios fotoperiódicos alteran la duración de la producción nocturna elevada de melatonina, una señal que proporciona a los mamíferos la época del año para reproducirse. Acetilserotonin O-Methyltransferase (ASMT); hidroxindol O-metiltransferasa (HIOMT); alkylamine Nacetyltransferase (NAT); tomado y modificado de Reiter *et al.*, 2009).

Se ha sugerido que la señal básica para estimular un pulso de GnRH es iniciada por una red activa de neuronas (KNDy) en el núcleo arqueado del hipotálamo (ARC) que contiene kisspeptina (Kp), neuroquinina B (NKB) y un opioide endógeno, la dinorfina (Dyn; Lehman *et al.*, 2010). En ovejas las neuronas de NKB actúan en las terminales secretoras de la eminencia media de GnRH estimulando la liberación de Kp. Se ha observado que las neuronas de dinorfina que expresan receptores opioides kappa, activan la interrupción de la liberación de Kp de la neurona KNDy para detener los pulsos de GnRH (Goodman *et al.*, 2013; Nestor *et al.*, 2018; Naitana y Ledda, 2020). Se ha descubierto que en ovejas la expresión de ARNm de un gen supresor de la metástasis (Kiss1) en ARC difiere entre los periodos de reproducción siendo mayor durante la época reproductiva que en el anestro (Wagner *et al.*, 2018), además el número de neuronas Kp sigue una tendencia similar (Smith *et al.*, 2007), lo que sugiere que la secreción de melatonina influye en la expresión de Kiss1 siendo probable que este efecto sea indirecto ya que la evidencia señala que las neuronas Kp no expresan receptores a melatonina (Li *et al.*, 2011). Existe evidencia que la NKB actúa de manera autocrina/paracrina influyendo indirectamente en la secreción de GnRH (Figura 6) (Revisado por Decourt y Beltramo, 2018).

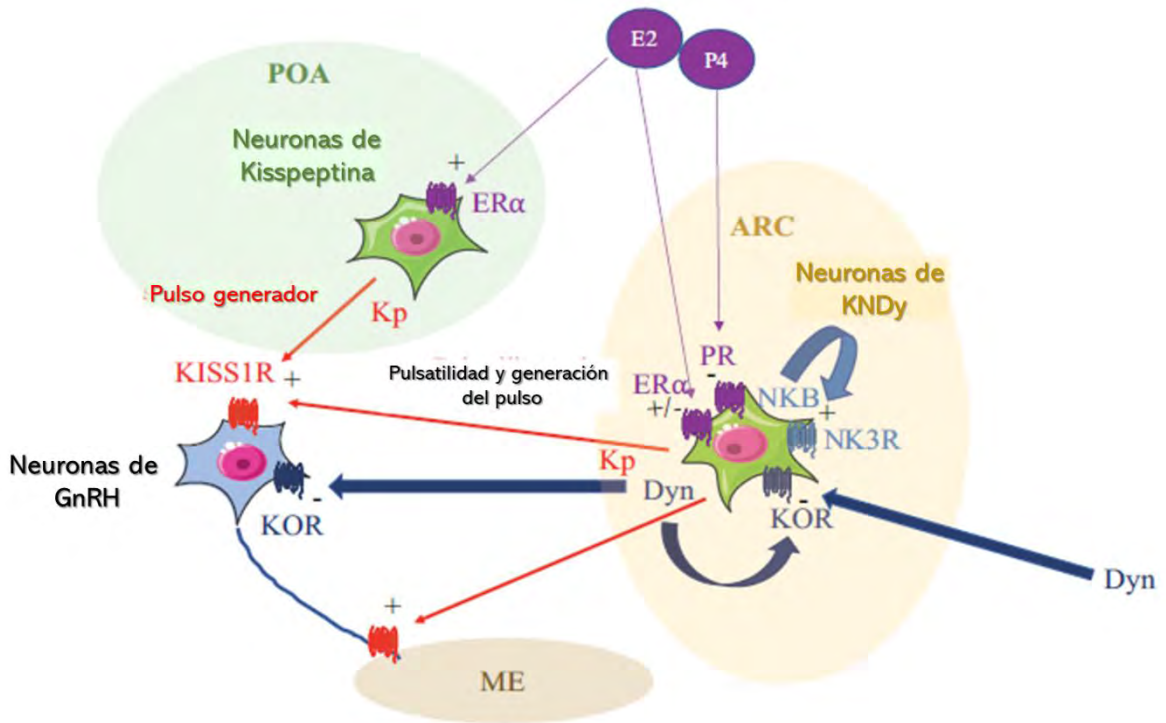


Figura 6. Representación esquemática de la regulación de las neuronas Kp (Kisspeptin) y KNDy (Kisspeptin, Neurokinin B, Dynorphin) en ovejas adultas. El Area preóptica (POA), núcleo arqueado (ARC), eminencia media (ME), Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), neuroquinina B (NKB), Dinorfina (Dyn), 17 β estradiol (E2), P4 (Progesterona), Receptor Kp (KISS1R), Receptor NKB (NK3R), Recetor Dyn (KOR), Receptor de estrógeno α (ER α) y Receptor de progesterona (PR). (Adaptado de Decourt y Beltramo, 2018).

El efecto inhibitorio de E2 sobre la expresión de Kiss1 en ARC es mayor durante la temporada no reproductiva en comparación con la de reproducción. Estos hallazgos hacen suponer que existe un cambio estacional en la sensibilidad a los estrógenos a nivel de las neuronas Kp en el ARC, lo que se traduce en un cambio de ciclicidad a inhibición de la ovulación (anestro estacional; Smith *et al.*, 2008).

2.5 Control hormonal del ciclo estral

Las ventajas del conocimiento de la duración de las fases que compone el ciclo estral en pequeños rumiantes han facilitado la manipulación de este pudiendo acortar los días del ciclo, sincronizar los partos para que estos se den en las épocas más favorables, así como también aumentando la productividad del rebaño mejorando la prolificidad de las hembras que son sometidas a los tratamientos hormonales. Por lo que los empadres pueden controlarse mediante el uso de hormonas exógenas con actividad biológica similar a las producidas de manera natural por las hembras. Esto ha favorecido a la inclusión de nuevas tecnologías con el fin de mejorar génicamente los parámetros productivos y reproductivos como por ejemplo el uso de la inseminación artificial a celo visto o a tiempo fijo, superovulación y transferencia de embriones.

2.5.1 Progesterona natural y sus análogos sintéticos

El uso de progesterona en la reproducción es de gran importancia en los tratamientos de inducción y sincronización en pequeños rumiantes. La explicación fisiológica para su uso es que se trata de simular la acción negativa que ejerce la P4, durante la fase lútea, a nivel hipotalámico, para inhibir los pulsos de GnRH/LH, estimulando la liberación de dinorfina de las neuronas KNDy, mientras que el E2 inhibe la amplitud del pulso de GnRH al inhibir la secreción

de Kp en las neuronas de GnRH (Goodman *et al.*, 2002). Por otro lado, la disminución de las concentraciones de P4 estimula y permite que se incremente la frecuencia de los pulsos de GnRH/LH y por ende aumente la concentración de E2 (Arroyo-Ledezma *et al.*, 2006). Efecto que se consigue cuando se elimina la fuente exógena de progesterona.

Desde los años 50's el uso de progesterona ha sido indispensable en los tratamientos de inducción y sincronización durante el anestro estacional y/o la época reproductiva, ya sea para monta natural o en un programa de inseminación artificial a celo visto y/o tiempo fijo (Abecia *et al.*, 2012; Gonzales-Bulnes *et al.*, 2020). Las primeras evidencias científicas sobre el uso de progesterona más eCG fue documentada en ovejas Suffolk en anestro estacional, documentado por Robinson, (1952), donde se evaluó el efecto de la administración de progesterona y eCG, para inducir el comportamiento estral y la ovulación, observándose que la mayoría de las hembras tratadas mostraban signos de celo y ovulación. A partir de ese momento se comenzó a estudiar en diferentes razas y latitudes, así como también las dosis, de estas hormonas.

Con la creación de las esponjas vaginales se facilitó la absorción de la progesterona que dejó de ser inyectada. Se encontraron resultados favorables con el uso de este tratamiento, pero a lo largo de los años por la duración del tratamiento que se utilizaba 12-14 días en hembras multíparas y hasta 17 en nulíparas, se observó que al retirar la esponja esta presentaba adherencias e infecciones vaginales, lo cual repercutió negativamente en la fertilidad (Scudamore, 1988).

En los años 80's en Nueva Zelanda se crea el CIDR (Dispositivo intravaginal de dosis controlada), para suplir a las esponjas vaginales y disminuir las adherencias que se presentaban ya que el dispositivo al estar hecho de silicón blando era más amigable con la mucosa vaginal (Knight y Hall 1988; Wheaton *et al.*, 1993). Por lo que se realizaron estudios donde se comparaban esponjas contra CIDR y se encontraron buenos resultados hacia el CIDR.

2.5.2 Tratamientos tradicionales

Si bien los resultados con los tratamientos tradicionales (tratamientos largos) eran favorables mostraron una gran cantidad de hembras en estro algunos autores cuestionaron las tasas de concepción obtenidas cuando se compara con un celo natural (Robinson *et al.*, 1970; Larson *et al.*, 1992). Esto se debe a que cuando se inserta un dispositivo con progesterona se induce un rápido incremento en la concentración plasmática, misma que se mantiene durante los 3 o 4 días seguidos, siendo similar a la fase lútea media-tardía, para después comenzar a descender por lo que a los 6 días de tratamiento las concentraciones se acercan a valores subluteales (~ 1 ng/mL), permaneciendo bajos hasta el retiro a los 12-14 días (Rubianes *et al.*, 1998). Este efecto no coincide con los niveles de progesterona observados previo a la lisis del cuerpo lúteo. Por lo tanto, esto puede repercutir en la calidad del folículo y por ende del ovocito (Menchaca y Rubianes, 2014). Viñoles *et al.* (1999), demostraron que los niveles subluteales de progesterona promovían el crecimiento excesivo y persistencia de folículo de mayor diámetro. Por lo que los folículos ovulados en estos tratamientos largos estarían “envejecidos” (Flynn *et al.*, 2000; Viñoles *et al.*, 2001). Por el contrario, las concentraciones altas de progesterona (supraluteales) inhiben la dominancia del folículo de mayor diámetro y provocando la regresión temprana estimulando una onda emergente de folículos, asegurando el crecimiento de un folículo “joven y saludable” al momento de la ovulación (Figura 7) (Menchaca y Rubianes, 2014).

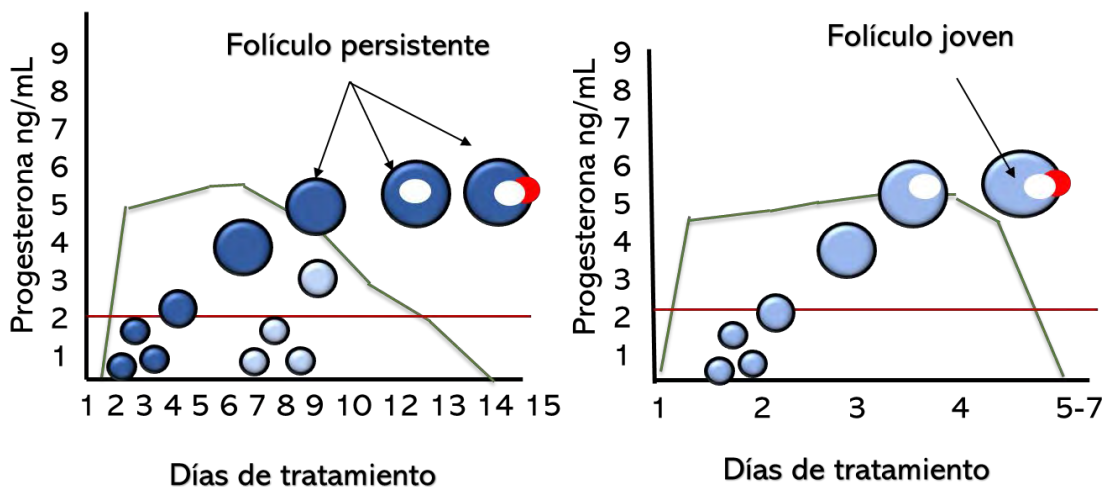


Figura 6. Comparación de un tratamiento tradicional (12-14 días) y un tratamiento a corto plazo (5-7 días). Bajas concentraciones de progesterona al final del tratamiento están asociadas a una menor fertilidad. Por otro lado, tratamientos cortos favorecen el recambio y calidad del folículo Adaptado de (Menchaca y Rubianes, 2014).

2.5.3 Tratamientos cortos

Por lo que se comenzó a estudiar el uso de tratamientos cortos con el fin de utilizar la primera onda de crecimiento folicular, para mejorar las tasas de fertilidad en las hembras tratadas. Y se determinó que los tratamientos cortos eran eficaces para implementarlos en los hatos caprinos y ovinos. En la (Figura 8). se muestra que al momento de colocar un dispositivo de progesterona las hembras pueden presentar un folículo grande que puede estar en fase de regresión o en crecimiento, por lo que el efecto de los altos niveles de progesterona inducirá la atresia para que se dé la emergencia de una nueva onda y crezca un nuevo folículo. Por consiguiente, al retirar el dispositivo este folículo tendrá al menos 5 días de su emergencia, el estro se presenta de manera sincronizada aproximadamente a las 30 h, el pico de LH ocurre a las 36 h, y la ovulación a las 60 del retiro del dispositivo, pudiendo así llevar este tratamiento a IATF (Rubianes y Menchaca, 2003).

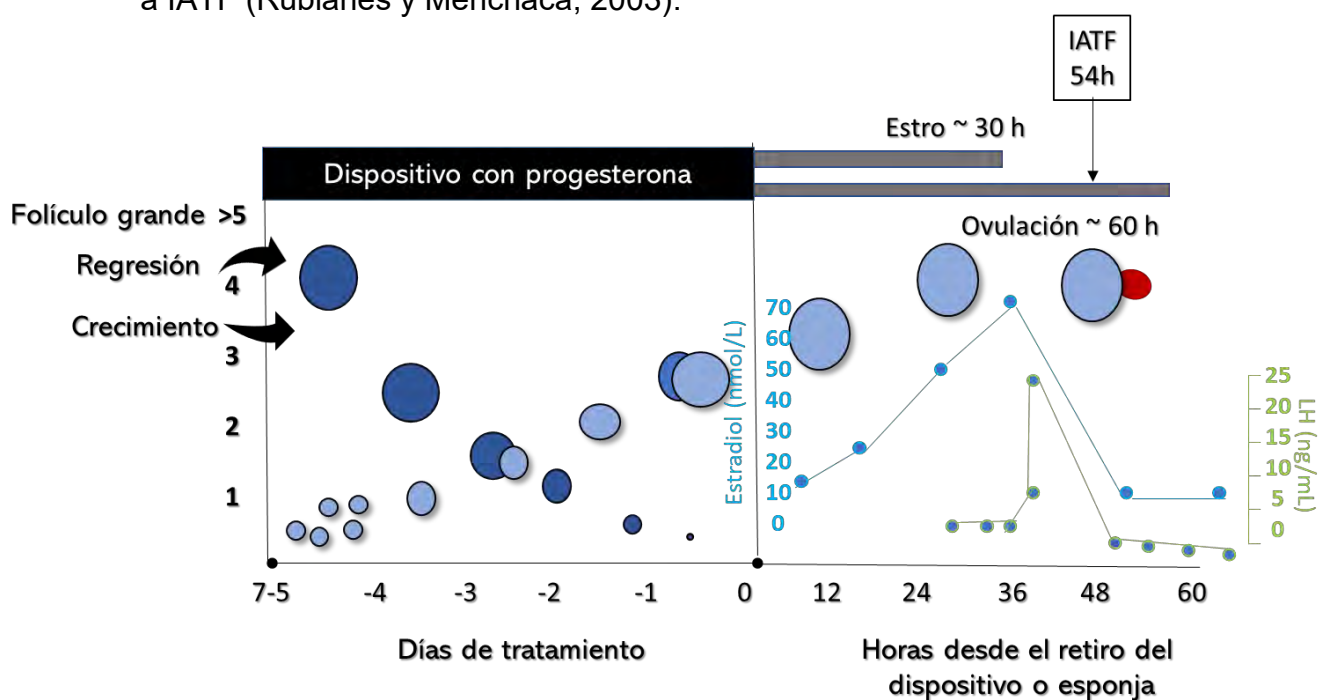


Figura 7. Representación esquemática del protocolo de progesterona a corto plazo para inducir / sincronizar el estro. (Adaptado y modificado de Rubianes y Menchaca, 2003; 2014).

2.5.4 Tratamientos ultracortos

Si bien el uso de dispositivos intravaginales da buenos resultados, es sabido que estos tratamientos suelen ser costosos y muchas veces no están al alcance de los productores que producen sus cabras y ovejas en territorios marginados. Por lo cual siempre debe haber opciones accesibles y de fácil aplicación. Con el fin de encontrar alternativas viables se han realizado numerosas investigaciones en cabras utilizando una sola inyección de 25 mg de progesterona intramuscular a las -24 horas de una aplicación de 250 UI de eCG (día 0 del tratamiento), para inducir la actividad estral, en el cual se encontraron resultados similares a los obtenidos con el uso de esponjas en un tratamiento corto a 7 días donde se observó que el 100% de las hembras tratadas en ambos grupos mostraron actividad estral y ovulación (Contreras-Villareal *et al.*, 2016).

En los últimos años la presión social y la necesidad de tratamientos “clean, green and ethical”, ha hecho necesario el reducir las dosis de las hormonas exógenas utilizadas en la reproducción de pequeños rumiantes sin afectar los parámetros reproductivos. Tomando en cuenta esto, se siguió investigación la respuesta de un tratamiento ultracorto utilizando solo 10 vs 20 mg de progesterona im, más una administración de 100 UI de eCG, por lo que los resultados en los grupos tratados con 10 mg difirieron estadísticamente, siendo 20 mg la dosis ideal para inducir la actividad estral (Veliz-Deras *et al.*, 2020).

Para sostener que la eficacia, de las dosis bajas de 100 UI de eCG, resultan efectivas sin modificar la repuesta reproductiva. Zuñiga-Garcia *et al.* (2020), comparo el uso de 25 mg de progesterona más 50, 100, 100 (en dos aplicaciones) y 200 UI de eCG, los resultados, fueron similares entre grupos, excepto por el grupo de 50 UI en el que la respuesta estral y ovulatoria fue menor. Por lo que se

concluyó que 100 UI son efectivas para inducir la actividad estral en cabras durante el anestro estacional en un sistema de producción extensivo.

2.6 Hormona liberadora de gonadotropina (GnRH)

En el año 1971, se logró aislar la estructura química de la GnRH un decapeptido de 10 aminoácidos y con un peso molecular de 1183 dáltones (Hafez, 2000), esta hormona fue aislada del tejido hipotalámico del cerdo (Schally *et al.*, 1971). Gracias a este aislamiento se logró modificar los aminoácidos para formar el análogo químico denominado “Buserelina”. Se sabe que este análogo tiene una mayor resistencia a la degradación enzimática de las peptidasas (enzimas proteolíticas que catalizan la hidrólisis de péptidos a aminoácidos para facilitar su absorción), lo cual provoca una liberación prolongada de gonadotropinas con una dosis activa mucho menor que la de la GnRH natural (Möller-Holtkamp, 1980).

Actualmente se han identificado 23 diferentes isoformas de GnRH en varias especies de vertebrados. Todas ellas consisten en 10 aminoácidos y tienen una estructura similar, con una similitud del 50 % en su secuencia (Morgan *et al.*, 2006). Las neuronas de GnRH, representan la vía de salida final de la red neuronal que controla la reproducción en todas las especies de mamíferos (Figura 9) (Di Giorgio *et al.*, 2019).

La GnRH es ampliamente utilizada en el manejo reproductivo en vacas (Peters, 2005); ovejas (Martínez-Ros y González-Bulnes, 2019); cabras (Cosentino *et al.*, 2020); y llamas (Bianchi *et al.*, 2018) debido a su bajo costo y ausencia de inmunidad (Drost y Thatcher, 1992). Algunos autores han informado que en el ganado induce ya sea la ovulación o la atresia de grandes folículos seguida de una nueva onda folicular (Peters *et al.*, 1999). La GnRH exógena estimula la liberación de FSH y LH, lo que estimula el crecimiento folicular y esto induce la ovulación del folículo dominante (Lone *et al.*, 2016). La administración de GnRH puede estimular la ovulación en anestro ovejas, pero puede ocurrir una regresión lútea prematura en estos animales (Leyva *et al.*, 1998).

Además, se ha estudiado ampliamente el uso de la GnRH para mejorar el momento de la implantación en cabras y ovejas. Fernández *et al.* (2017),

estudiaron el efecto de la administración de GnRH al día 4 pos-inseminación a tiempo fijo donde encontraron que tiene un efecto positivo en la implantación, a pesar de que de la literatura muestra que el proceso de implantación ocurre a partir del día 12 del servicio de las hembras (Beck *et al.*, 1996).

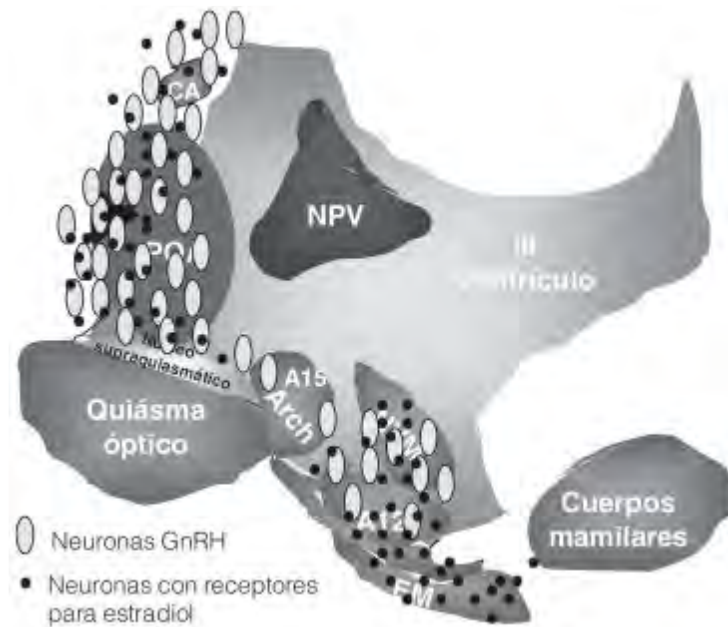


Figura 8. Representación del hipotálamo de la oveja donde se muestra la distribución de neuronas con receptores para estradiol y neuronas productoras de GnRH (Tomado de Arroyo-Ledezma *et al.*, 2006).

2.6.1 Mecanismo de acción

La presencia y acción de la GnRH en la glándula pituitaria anterior, el principal sitio de expresión de los receptores de GnRH, sugiere que el efecto local regulador de los neuro péptidos pueden complementar el mecanismo de control hipotalámico primario para el control de secreción episódica gonadotrópica (Krsmanovic *et al.*, 2000).

Es liberada de una manera pulsátil hacia la pituitaria anterior. En la superficie de los gonadotropos, la GnRH se une los receptores acoplados a proteína G. Con esta unión, la GnRH promueve la transición de GTP a GDP a través de la proteína G, la proteína G provee la energía necesaria para activar un numero de

transmisiones que afectan la respuesta celular, y la conclusión de esta cascada es la biosíntesis y secreción de LH y FSH (Figura 10) (Limonta *et al.*, 2003). El pulso generador a nivel hipotalámico de GnRH, esta influenciado por varios factores como son: el tono opioide endógeno, y de esta forma la B-endorfina inhibe la liberación de GnRH a nivel de hipotálamo medio basal en humanos, el Acido gamma-aminobutírico (GABA), también produce inhibición de GnRH, por el contrario, esta hormona es estimulada por la dopamina (DA), noradrenalina (NA) y serotonina (5HT). Existen también otros factores no esteroideos de las gónadas que regulan la liberación de FSH y LH como son las hormonas inhibina y la activina (Prieto-Gómez y Velázquez-Paniagua, 2002).

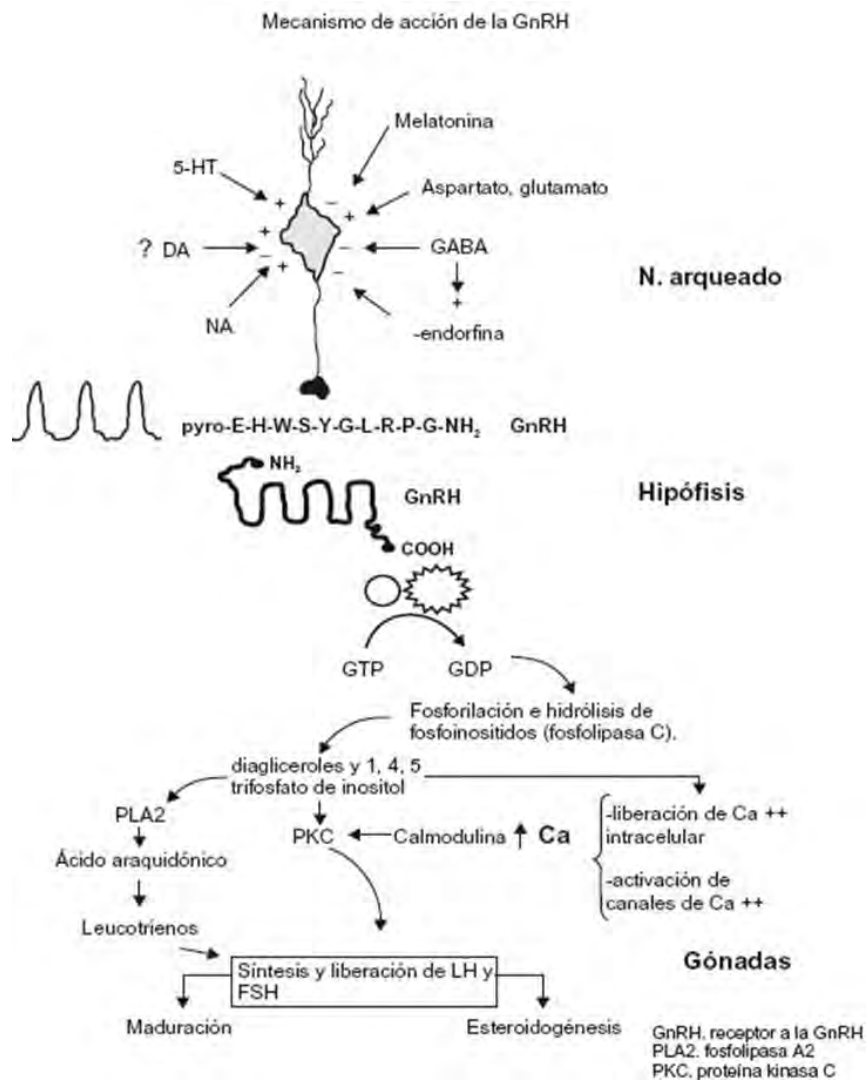


Figura 10. Mecanismo de acción de la GnRH (Tomado de Prieto-Gómez y Velázquez-Paniagua, 2002).

La GnRH regula la síntesis, almacenamiento y movilización de gonadotrofinas, así como su liberación inmediata. El mecanismo de acción de la GnRH involucra la unión de la hormona a los receptores transmembrana, que provocan un incremento en el AMPc y la subsecuente elevación de Ca²⁺ o activación de la proteína cinasa C. La GnRH que tiene una vida media de 2-4 minutos (Kumar, 2014), alcanza la pituitaria muy rápidamente e induce la liberación de LH y FSH. Normalmente, la GnRH es liberada de una manera pulsátil en intervalos regulares de 1 hora para inducir la liberación de LH y FSH de una manera pulsátil también (Wildeus, 2000).

2.6.2 GnRH como tratamiento complementario

En los últimos años se han utilizado tratamientos a base de GnRH, con el fin de obtener resultados similares y/o mejores a los obtenidos en los tratamientos donde se utilizan dosis de eCG, por su efecto de estimular la etapa final del folículo, así como mejorar los parámetros reproductivos incrementando el número de partos gemelares. Mismos que han sido utilizados en ovejas y cabras, durante la estación reproductiva y/o anestro estacional, en solución salina y de liberación lenta como el propilenglicol.

2.6.3 Tratamientos a base progesterona más GnRH

El uso de dispositivos intravaginales impregnados de análogos de progesterona (Acetato de fluorogestona FGA; Acetato de medroxiprogesterona MGA), así como progesterona natural, se han utilizado desde los años 70's como tratamientos de sincronización con resultados favorables cuando se administra a una aplicación de 200 a 600 UI de eCG (González-Bulnes *et al.*, 2020). Los inicios de estos tratamientos consistieron en el uso de esponjas insertadas en cavidad vaginal durante 12 a 14 días simulando la duración de la fase lútea (Abecia *et al.*, 2012), posteriormente se redujo el tiempo a 5 o 7 días (Rubianes y Menchaca, 2003). En los últimos años se han estudiado nuevas alternativas a los

tratamientos tradicionales, derivado de las polémicas en cuanto a la manera de obtener la hormona coriónica equina (Manteca-Vilanova *et al.*, 2019).

Martínez-Ros y González-Bulnes. (2019) realizaron un estudio en el que se evaluó el uso de GnRH al inicio del tratamiento con CIDR y/o a las 56 horas después de retiro. En el cual encontraron resultados similares cuando compararon estos protocolos con los tratamientos tradicionales CIDR-eCG, en los cuales el 85% de las hembras tratadas mostraron respuesta estral y ovulación del 100% independientemente del tratamiento administrado, por lo que se concluyó que el uso de 50 μ g de Gonadorelina (GnRH), es igual de efectivo para sincronizar la actividad estral en ovejas.

Por otro lado, Santos-Jiménez *et al.* (2020) evaluaron el efecto del uso de los tratamientos a base de GnRH en dos épocas en año (anestro estacional y época reproductiva), en el que se encontró que las hembras tratadas en anestro solo el 40% en los grupos donde se administraron dos dosis de GnRH (al momento de la inserción del CIDR y/o a las 56 horas pues del retiro), mostraron actividad estral, pero al momento de realizar el escaneo ovárico para determinar cuerpos lúteos se observó que la mayoría de las hembras ovularon, por lo que siguiendo la misma línea de investigación se replanteó la manera en el que se administra esta hormona, siendo evidenciado que durante el anestro estacional induce la atresia y/o ovulación del folículo mayor de 5 mm que se encuentre en crecimiento al momento de la administración (Leyva *et al.*, 1998). Por lo que Santos-Jiménez *et al.* (2020b), estudiaron la posibilidad de que al administrar la GnRH en un vehículo de liberación lenta como por ejemplo el propilenglicol, resultaría en una mejor sincronización de la actividad estral para así llevarlo a cabo en ovejas en anestro. En este estudio se utilizaron ovejas de raza Segureña en las que se sincronizó a las hembras insertando un CIDR durante 7 días; al momento del retiro el grupo control recibió una dosis de 400 UI (tratamiento tradicional) en los siguientes grupos se administró GnRH más propilenglicol (PPG) a las 24 y 36 horas después del retiro, así también a un cuarto grupo que se le administró una dosis de GnRH en solución salina. Los resultados fueron similares entre grupo a

diferencia del grupo 24 h en el que solo el 12% de las hembras mostraron actividad estral, pero al comparar los grupos tratados con GnRH en PPG y/o solución salina la respuesta fue similar a los tratados con eCG, por lo que se concluyó que la administración de GnRH en un vehículo de liberación lenta pudiera ser efectivo para inducir la actividad estral en ovejas en anestro (Santos-Jiménez *et al.*, 2020).

2.6.4 Tratamientos a base prostaglandinas más GnRH

Las prostaglandinas F2 α (PGF2 α) se utilizan en la actualidad para sincronizar la actividad estral en dos aplicaciones con intervalos desde 12-13 días y en la actualidad en tratamientos con intervalos de 7 días (Synchrovine®; Menchaca y Rubianes, 2004). Su eficacia depende de la presencia de un cuerpo lúteo funcional y se recomienda aplicar en el 3° y 13° día del ciclo estral (Ramos y Silva, 2018). El momento de su administración y la presencia de la actividad estral puede variar y presentarse de 2 a 5 días después de la segunda aplicación (Houghton *et al.*, 1995), por lo que dificulta su eficacia para tratamientos de IATF. Por lo cual, se ha evaluado el uso de estimuladores de la ovulación como la GnRH, en un intento de aumentar la tasa ovulatoria (Ramos y Silva, 2018).

En estudios previos donde se utilizó una administración de 100 μ g de GnRH 5 días previos a una administración de PGF2 α indujo la ovulación/ luteinización del folículo dominante, favoreciendo el recambio folicular (Titi *et al.*, 2010).

En otra investigación se evaluó el uso de GnRH administrada 24 y 36 h después de un tratamiento de prostaglandinas administradas en un intervalo de 7 días, con el objetivo de mejorar las tasas de gestación, cuando las hembras fueron inseminadas a tiempo fijo por vía cervical a las 44 y 47 h después de la segunda aplicación de PGF2 α . en los resultados obtenidos se observó que en las hembras que se trataron a las 24 h con GnRH la tasa de fertilidad fue en promedio del 10%, esto debido a que la administración indujo la ovulación antes que las hembras mostraran su actividad estral esto es por la rápida acción que tiene la GnRH, aumentando la concentración de LH de 2 a 4 horas después de su administración (Olivera-Muzante *et al.*, 2013). Tomando en cuenta estos

resultados, Santos-Jiménez et al., 2020, evaluaron el uso de GnRH en un disolvente de liberación lenta como lo es el propilenglicol (PPG), para de esta manera alargar la pulsatilidad de LH y permitir la maduración final del folículo y el inicio de comportamiento de estro, se aplicó a las 24 y 36 h después de la segunda aplicación de PGF2 α en una relación 1:4 de PPG. por lo que los resultados en el grupo tratado con GnRH en PPG a las 24 h fue similar a los obtenido anteriormente, a pesar se el vehículo de liberación lenta las hembras tratadas no mostraron celo, aunque si ovulo el 100%. Por lo que se comprueba lo anteriormente mencionado por Olivera-Muzante *et al.* (2013), que la respuesta de un tratamiento con GnRH depende siempre de el momento en el que se administre.

2.7 Hormona coriónica humana (hCG)

La Hormona coriónica humana es una glicoproteína que consta de dos subunidades α y β con un peso molecular de 40.000 daltons. La subunidad α cuenta con 92 aminoácidos y dos cadenas de carbohidratos. La subunidad β es similar en la LH humana, porcina, ovina y bovina. Su acción es principalmente luteinizante y luteotrópica con muy poca actividad de FSH. Su síntesis se lleva a cabo en las células sincitiotrofoblasticas en la placenta de los humanos y primates, por lo que se puede encontrar en sangre y orina al principio del embarazo siendo una prueba directa para determinar la gestación a partir del día 8 después de la concepción en humanos (Hafez *et al.*, 2000).

2.7.1 Mecanismo de acción

Debido a su acción prolongada similar a la LH, su principal función es en el reconocimiento temprano de la gestación en primates y humanos actúa enviando una señal trófica al cuerpo lúteo a través del receptor de LH uniéndose directamente con el receptor a LH (LHCGR) para rescatar al cuerpo lúteo de la luteolisis, manteniendo así su integridad estructural y funcional (Figura 11) (Duncan *et al.*, 2009; Hughes y Pate, 2019).

La vida media plasmática de la hCG es sustancialmente más larga 36 h en humanos y 39 h en cabras; en comparación con la de la LH que se produce de

manera endógena (aproximadamente 20 minutos) (Saleh *et al.*, 2012; Duncan *et al.*, 2019).

Está implicada principalmente en estimular el factor de crecimiento endotelial vascular (VRGE) ya que para que se presente este factor se requiere de altos niveles de LH, por lo tanto, la hCG al tener acción biológica similar promueve la síntesis adicional de este factor promoviendo así una segunda ola de angiogénesis. Por lo que la administración de hCG exógena podría estimular la secreción de progesterona por el cuerpo lúteo temprano y tardío (Duncan *et al.*, 2019).

Por esta acción biológica es que en los últimos años se ha utilizado como tratamiento para la formación de cuerpos lúteos accesorios en ovejas (Fernández *et al.*, 2017) y cabras (Bustamante-Andrade *et al.*, 2021).

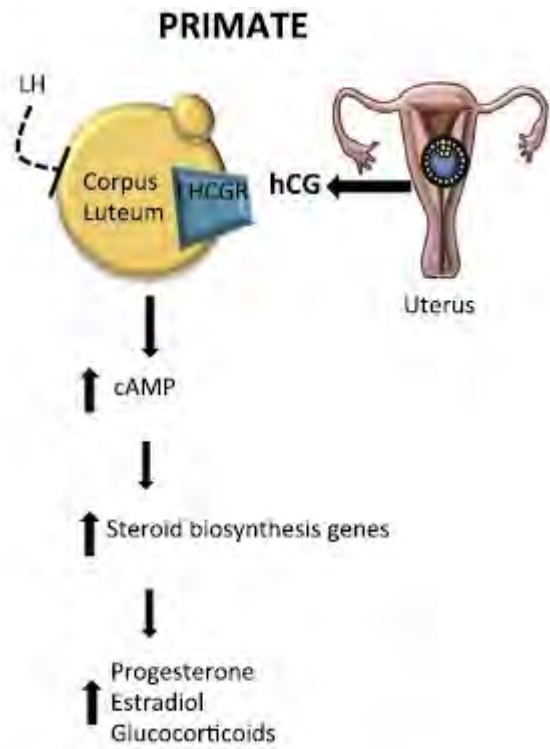


Figura 10. Mecanismo de acción de la hCG en primates (Tomado de Duncan *et al.*, 2019).

A medida que el CL se vuelve más resistente a las acciones de la LH (línea discontinua), el corion de la placenta produce altas concentraciones de hCG, que se unen al receptor de LH (LHCGR), aumentan el cAMP intracelular y conducen a un aumento de genes de biosíntesis de esteroides y esteroidogénesis (Adaptado de Hughes y Pate, 2019).

2.7.2. hCG como tratamiento complementario

La hCG ha sido utilizada para inducir a ovulación en varias especies ya que se une al receptor LHCGR y tiene una marcada actividad luteotrópica, por lo que cuando se tratan a las hembras con dosis exógenas de hCG, se estimula una mayor producción de P4 (Gómez-Brunet *et al.*, 2007), se sabe que la hCG pueden aumentar directamente la producción de progesterona de las células y tejido lúteo aislado (Duncan, 2019).

2.7.3 Tratamientos a base de progesterona + hCG

El uso de la hCG como inductor de la actividad estral ha sido utilizada con resultados favorables en cabras en sistemas extensivos. Se realizó una investigación en la cual se indujeron cabras Alpina-francesa, con un tratamiento ultracorto de 20 mg de progesterona im, y después se les administro diferentes dosis de hCG (50,100 o 300 UI), se determinó que las hembras de los grupos tratados con 300 y 100 UI, mostraron actividad estral y ovulación en un 90 y 100%, respectivamente. Así como en la tasa de gestación las hembras del grupo 100 UI el 100% quedo gestante cuando fueron llevadas a monta natural. Estos datos nos muestran que el uso de 20 mg de P4 im y 100 UI son una alternativa viable para la inducción de la actividad estral en hembras durante el periodo de anestro-estro (Alvarado-Espino *et al.*, 2016). Se evaluo también el uso de este tratamiento en cabras nulíparas vs multíparas bajo diferentes sistemas de producción extensivo e intensivo durante el anestro estacional; aunado a IATF. Los resultados en cuanto a actividad estral y ovulación fueron similares entre cabras nulíparas y multíparas, pero los efectos de la inseminación vario de acuerdo con el sistema de producción siendo mejor en las cabras que se encontraban en sistema intensivo (Alvarado- Espino *et al.*, 2018).

Mientras que los resultados en cabras son favorecedores en ovejas se ha visto una variabilidad al momento de sincronizar la respuesta. Se realizó una investigación en dos tiempos (enero/octubre), cuyo objetivo era evaluar los parámetros reproductivos en un tratamiento con hCG vs un tratamiento tradicional con eCG, se insertó previamente a todas las hembras un CIDR por 7 días, el día del retiro al grupo control positivo se les administró 300 UI de eCG, posteriormente, 24 h del retiro al grupo hCG se les administró 500 UI de esta hormona. Los resultados eran los esperados en el grupo tratado con el tratamiento tradicional 100% de las hembras mostraron actividad estral y ovularon en los dos momentos de la investigación mientras que en las hembras de los grupos hCG, la respuesta fue estadísticamente significativa ($p < .05$) en promedio el 50% de las hembras en celo observándose estructuras luteinizadas (Bruno-Galarra *et al.*, 2021).

3. ARTICULOS

I. Efficiency of hCG for Inducing Resumption of Ovarian Cyclicity and Synchronized Ovulations during the Seasonal Anestrous in Sheep



animals



Article

Efficiency of hCG for Inducing Resumption of Ovarian Cyclicity and Synchronized Ovulations during the Seasonal Anestrous in Sheep

Zurisaday Santos-Jimenez ^{1,2}, César A. Meza-Herrera ³, Guadalupe Calderon-Leyva ¹, Paula Martinez-Ros ⁴, Juan M. Guillen-Muñoz ^{1,*} and Antonio Gonzalez-Bulnes ^{2,4,*}

¹ Unidad Laguna, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Torreón 25315, Coahuila, Mexico; mvz_zusan@hotmail.com (Z.S.-J.); gcalderon06@hotmail.com (G.C.-L.)

² Departamento de Farmacología y Toxicología, Facultad de Veterinaria, UCM, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, Spain

³ Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas, Universidad Autónoma Chapingo, Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas, Bermejillo 35230, Durango, Mexico; cmeza2020@hotmail.com

⁴ Departamento de Producción y Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Cardenal Herrera-CEU, CEU Universities, C/Tirant lo Blanc 7, Alfara del Patriarca, 46115 Valencia, Spain; paula.martinez@uchceu.es

* Correspondence: jmanuel.guillen@uaaan.edu.mx (J.M.G.-M.); antonio.gonzalezbulnes@uchceu.es (A.G.-B.)



Citation: Santos-Jimenez, Z.; Meza-Herrera, C.A.; Calderon-Leyva, G.; Martinez-Ros, P.; Guillen-Muñoz, J.M.; Gonzalez-Bulnes, A. Efficiency of hCG for Inducing Resumption of Ovarian Cyclicity and Synchronized Ovulations during the Seasonal Anestrous in Sheep. *Animals* **2021**, *11*, 3159. <https://doi.org/10.3390/ani11113159>

Academic Editor: Jim McFarlane

Received: 3 October 2021

Accepted: 4 November 2021

Published: 5 November 2021

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



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: The use of equine chorionic gonadotrophin (eCG) in protocols for estrus synchronization in sheep is currently challenged, so it is necessary to implement alternatives (i.e., human chorionic gonadotrophin; hCG), mainly during the anestrous season. Therefore, we compared the reproductive outcomes, including estrus induction, ovulatory follicle dynamics, and pregnancy outputs in anestrous Dorper sheep treated with insertion of one intravaginal progesterone-loaded CIDR + either saline, eCG, or hCG. The administration of hCG at the time of CIDR removal was effective at inducing estrus, resume ovulations, and ovarian cyclicity, yet, in a narrow window of time, it is a scenario that may limit the implementation of an artificial insemination protocol.

Abstract: This research aimed to evaluate whether the administration of hCG at the time of removal of a progesterone device may be effective at inducing estrus and ovulations in sheep during the natural seasonal anestrous, by comparing reproductive outputs (induction and duration of estrus, follicle development, ovulation, ovulation rate, and pregnancy rates) in ewes treated with eCG or only saline solution at the time of CIDR removal. Whereas results demonstrated no response in the control non-treated group, the largest rate of narrowly synchronized estrus signs and ovulations occurred in the eCG-group. The administration of hCG was effective at inducing estrus, promote follicular growth and a delayed yet significant ovulation (>84%) on day 10 after CIDR removal; moreover, an increased embryonic implantation rate was also observed. Moreover, if the hCG ewes remain exposed to active males for some days, said strategy could be adopted, aiming to induce pregnancies by natural mating in a short period of time.

Keywords: anestrous sheep; induction estrus; hCG; induction ovulation

1. Introduction

The reproductive management of sheep, during both the reproductive and non-reproductive seasons, mainly relies on the use of progesterone-based protocols combined with the administration of a single dose of equine chorionic gonadotrophin (eCG) at the end of the progesterone treatment [1], which induces the ovulation and allows its synchronization. Accordingly, it is essential when implementing artificial insemination, but it is also of high interest for increasing the number of twin births [2]. However, the use of eCG is currently challenged by a strong animal rights movement against obtaining eCG from pregnant mares, which makes the banning of this hormone foreseeable [3,4]. Currently,

diverse laboratories around the world are developing a synthetic eCG by recombinant deoxyribonucleic acid (DNA) technology, which may function in a similar way as follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) [5–9]. However, these efforts are still preliminary, and results are far away of being translated to practice.

Unavailability of eCG is a critical problem for the management of reproduction in farm animals since the different attempts of using other hormones, such as FSH, LH, gonadotrophin-releasing hormone (GnRH), or hCG have not found similar outcomes as eCG [4]. There are promising results applying GnRH in saline at 56 h of progesterone withdrawal [9] or applying the hormone at 36 h if using a slow-release vehicle [10], but the yields seem to be weakened during the non-reproductive season [11]. The characteristics of hCG, mainly its high similarity to LH and affinity for the same receptors [12,13], favored its use for inducing ovulations when applying protocols for estrus synchronization in sheep [14,15]. Yet, recent studies have evidenced a decrease in fertility due to deleterious effects on the development of ovulatory follicles [16,17]. However, these studies were performed during reproductive season and the differences in the follicle dynamics occurring during the seasonal anestrous [18], due to the different patterns of release of LH [19], are currently well known.

We hypothesized that administration of an acute discharge of a hormone with LH-like activity, such as hCG, may induce the resumption of the ovulatory activity and the synchronization of ovulations in sheep during seasonal anestrous. Therefore, we compared the reproductive behavior, ovulatory follicle dynamics, and pregnancy outputs of Dorper sheep treated with progesterone-impregnated CIDR, plus either saline, eCG, or hCG during the seasonal anestrous.

2. Materials and Methods

2.1. Ethics Statement

The present study was carried out, under conditions of natural photoperiod during the non-breeding season (April), in a single commercial farm in the north of Mexico (Ejido Granada, Matamoros, Coahuila de Zaragoza, Mexico, latitude of 25.3 N, altitude of 1115 m.a.s.l.). The research was performed according to the international [20] and national [21] guidelines for the ethical care and protection of animals used for research. All of the methods and management procedures in this study were evaluated and approved by the Institutional Committee of Ethics in Animal Research of the Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (approval reference number UAAAN/UL/1330-8241-2868).

2.2. Animals and Experimental Procedure

The trial involved multiparous Dorper ewes ($n = 36$) in adequate health status, with an average mean live weight (LW, 43.7 ± 1.4 kg) and body condition score (BCS, 2.5; scale of 0–5, being 0 = very thin and 5 = very fat). Seasonal anestrous was confirmed by an ovarian ultrasonography for determining absence/presence of corpora lutea with a 7.5 MHz transrectal ultrasound (Aloka SSD 500, Aloka Co. Ltd., Tokyo, Japan). All of the animals were treated with one intravaginal CIDR device (CIDR[®] Ovis, Zoetis, Cd. de Mexico, Mexico) for seven days plus one intramuscular dose of 5 mg of prostaglandin F_{2α} (Lutalyse, Zoetis, Cd. de Mexico, Mexico) at CIDR withdrawal. The group of females remained together, but for experimental purposes, they were divided into three experimental subgroups based on the gonadotrophin treatment at CIDR removal. The first group (Group eCG, $n = 11$) received one intramuscular injection of 300 IU of equine chorionic gonadotrophin (GonActive[®] eCG, Virbac, Zapopan, Mexico), the second group (Group hCG, $n = 13$) received one intramuscular injection of 300 IU of human chorionic gonadotrophin (Chorulon[®], MSD, Cd. de Mexico, Mexico), while the third group received one intramuscular injection of saline solution and acted as the control group (Group CON, $n = 12$). The response variables evaluated were the occurrence and timing of estrus behavior, ovarian follicle dynamics, occurrence, and timing of ovulation/luteinization of preovulatory follicles, and the presence and number of corpora lutea in response to the treatment and pregnancy rate.

2.3. Onset and Duration of Estrus Behavior

Occurrence of estrus behavior was determined with trained rams every 12 h from CIDR withdrawal. Each sheep was exposed to males until ewes showed no more signs of estrus (refused the contact with the male) or until 72 h after CIDR removal, in case they did not exhibit estrus behavior. Mating was allowed for determining fertility and pregnancy rates.

2.4. Ovarian Follicle Dynamics, Occurrence of Ovulation, and Pregnancy Diagnosis

Ultrasonographic assessment of follicle dynamics was performed in all of the ewes showing estrus signs, every 24 h after CIDR removal. All follicles with ≥ 4 mm in size were assessed by means of 7.5 MHz transrectal ultrasound (Aloka SSD 500). Ovulation was determined by evaluating the disappearance of the ovulatory follicles recorded in a previous ultrasound scanning, as formerly described [22]. Ultrasonography was subsequently performed to determine the presence and number of corpora lutea and/or anovulatory follicles (i.e., day 10), as well as pregnancy rate, considering both the presence and number of embryos (i.e., day 32) after CIDR removal.

2.5. Statistical Analyses

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

3. Results

The assessment of the reproductive response in all of the sheep showed that the CIDR treatment during seasonal anestrus in absence of any hormone for inducing or mimicking LH secretion (Group CON) was unable to trigger estrus induction and, therefore, neither ovulations nor pregnancies were observed during the experimental period (Table 1). Interestingly, however, control ewes were able to display a subsequent resumption of ovarian cyclic activity and ovulations in around half of the ewes, as indicated when evaluating presence or absence of corpora lutea on day 10 after CIDR removal.

Table 1. Reproductive outcomes of Dorper ewes treated with CIDR during the seasonal anestrus and, at the time of CIDR removal, receiving either 300 IU of eCG or hCG (groups eCG and hCG) or no hormones (group CON).

Response Variables	eCG	hCG	CON
Estrus induction (%)	100; (11/11) ^a	69.3; (9/13) ^b	0; (0/12) ^c
Time CIDR removal to estrus (h)	41.45 \pm 3.38 ^b	52 \pm 2.88 ^a	-
Ovulations at day 3 (%)	100; (11/11) ^a	38.5; (5/13) ^b	0; (0/12) ^c
Timing to ovulation (h)	70.91 \pm 3.01 ^a	74.40 \pm 1.48 ^a	-
Ovulations at day 10 (%)	100; (11/11) ^a	84.6; (11/13) ^a	50; (6/12) ^b
Ovulation rate	1.91 \pm 0.25 ^a	2.0 \pm 0.14 ^a	1.16 \pm 0.011 ^b
Embryo implantation rate	1.63 \pm 0.16 ^b	2.0 \pm 0.11 ^a	0 ^c
Pregnancy rate (%)	72.7; (8/11) ^a	30.7; (4/13) ^b	0; (0/12) ^c

^{a,b} Different subscripts within response variable denote differences among groups ($p < 0.05$).

Contrariwise, the administration of eCG or hCG after CIDR removal induced the appearance of estrus and fertile ovulations, with the eCG ewes displaying not only a higher estrus induction, but also an earlier onset of estrus with respect to the hCG ewes ($p < 0.05$; for both variables). However, the percentage of ewes ovulating and with corpus luteum on day 10 after CIDR removal was not different between the eCG ewes and the hCG ewes

($p < 0.05$). Besides, while the hCG ewes denoted an increased embryonic implantation rate, the eCG ewes displayed the largest pregnancy rate on day 32 after CIDR removal ($p < 0.05$).

Regarding to the time to estrus onset (Figure 1), the eCG ewes showed the earliest average time for estrus manifestation after CIDR removal. Certainly, at 48 h after CIDR removal, around 90% of the females treated with eCG already presented estrus signs whilst only 49% of the females in the Group hCG showed such behavior. Finally, no differences in the remaining percentage of ewes showing estrus between the eCG and hCG ewes occurred from 48 to 72 h ($p > 0.05$) after CIDR removal.

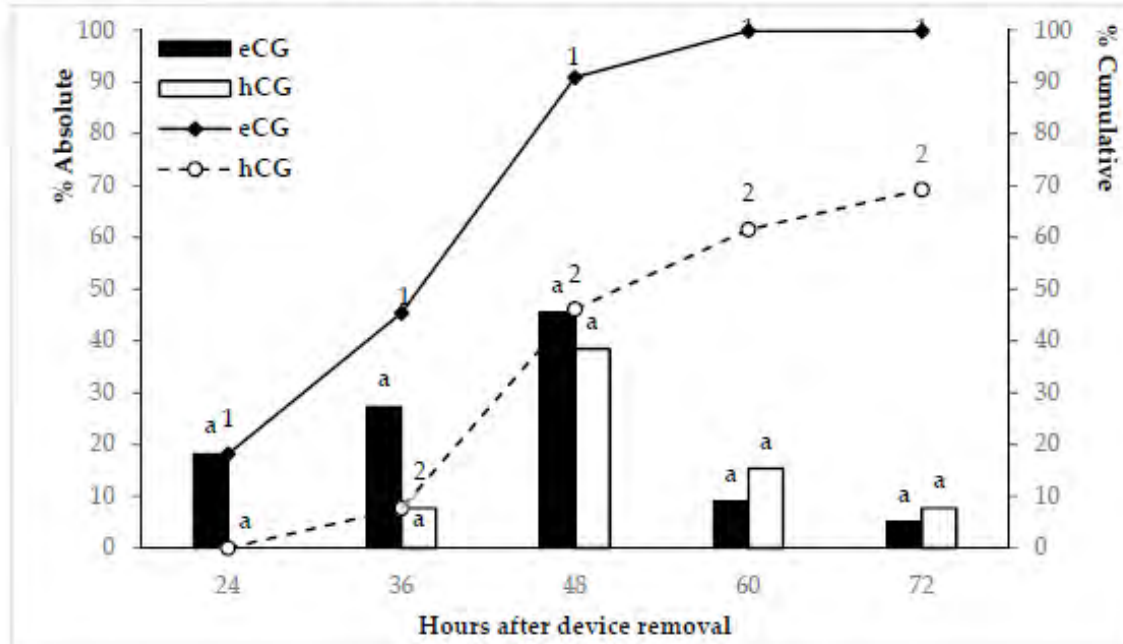


Figure 1. Absolute (bars) and cumulative (lines) percentages of Dorper sheep showing estrus signs over time after CIDR removal and administration of 300 IU of eCG or hCG (Groups eCG and hCG). a Different superscripts indicate significant differences in bars ($p < 0.05$); 1, 2 Different numbers indicate significant differences in lines ($p < 0.05$).

These patterns of appearance of estrus induction were closely related to the patterns of follicle development observed during the preovulatory period (Figure 2). A higher number of ≥ 4 mm follicles was detected during the first 48 h after CIDR removal in the eCG ewes regarding the hCG ewes ($p < 0.05$); at time 36 h the eCG ewes showed a larger follicle diameter ($p < 0.05$). Conversely, the hCG ewes showed not only larger follicular diameters at 72 and 84 h but also a higher number of large follicles at 84 h after CIDR removal; this response was related to the presence of anovulatory follicular cysts. Concomitantly, the assessment of ovulatory events denoted no differences regarding the time to estrus onset after CIDR removal between the eCG and the hCG-treated ewes. On the other hand, while 100% ovulations on day 3 after CIDR removal occurred in the eCG ewes, only 33.5% of the hCG ewes ovulated on said day. However, by day 10 after CIDR removal, said ovulation differences vanished between eCG and hCG-treated ewes.

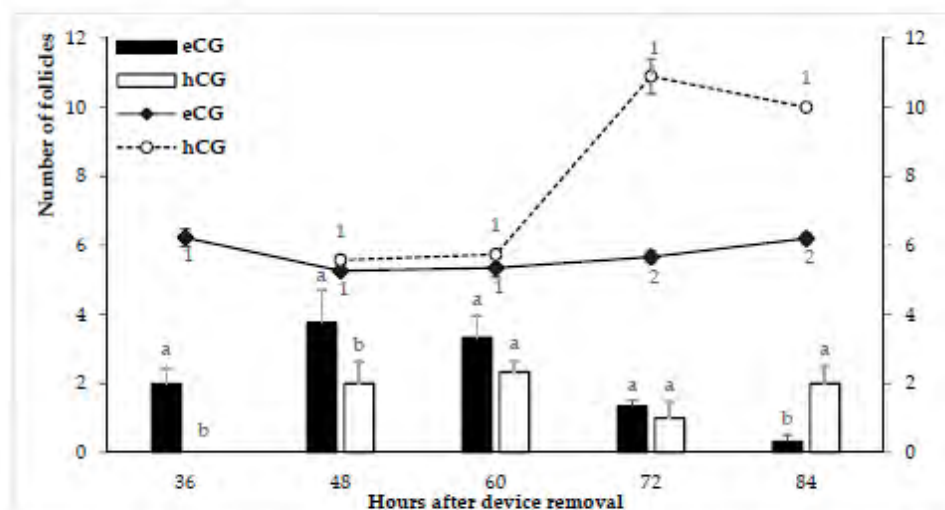


Figure 2. Mean diameter of the largest follicle (lines) and number of follicles ≥ 4 mm (bars) observed by transtectal ultrasonography after CIDR removal in Dorper sheep treated with 300 IU of eCG or hCG during seasonal anestrus. a, b Different superscripts indicate significant differences in bars ($p < 0.05$); 1, 2 Different numbers indicate significant differences in lines ($p < 0.05$).

4. Discussion

The obtained results in the control ewes confirm that the Dorper multiparous females were in deep seasonal anestrus. The administration of hCG at the time of CIDR removal in sheep at seasonal anestrus was able to induce the resumption of the ovulatory activity in a narrow window of time. With respect to the eCG ewes, our results are in agreement with diverse studies (revised by Abecia et al. [1] and Gonzalez-Bulnes et al. [4]), which confirm that the eCG-treated ewes showed highly-synchronized estrus signs and fertile ovulations. Our results are in line with Ungerfeld and Rubianes, [23] and support all of the previous evidence on the benefits of applying eCG during seasonal anestrus for a synchronized resumption of ovulatory activity.

The results obtained in the control group showing no signs of estrus after being treated with exogenous progesterone, but without gonadotrophin stimulation, which should be related to the deficiencies in the final growth of ovulatory follicles during anestrus season previously reported [18]. There was, however, the presence of ovulation in around half of the control ewes on day 10 after CIDR removal. Such a scenario suggests that exposure to progesterone and active males was able to trigger the resumption of ovulatory response, although only in some of the animals (and in an extended period of time). Moreover, the results observed in the hCG ewes showed a lower synchronized activity when inducing estrus, ovulations and pregnancies as compared to the eCG ewes, the last in agreement with previous studies [17,24]. Hence, in view of these performances, the hCG treatment would not be as useful as the eCG administration when implementing artificial insemination protocols.

The assessment of the ovarian dynamics indicates that more than a half of the animals showing estrus signs in the hCG ewes evidenced failures in the ovulatory process on day 3 due to the presence of anovulatory follicular cysts. One possible explanation is that the low LH pulsatility during anestrus is not enough to trigger the final maturation of the preovulatory follicle and, therefore, the estradiol secretion from such ovarian follicle is not the required to modulate changes in FSH secretion from the pituitary [25] because the growing follicles need FSH to continue their development [26]. Such needs may have been fulfilled in those ewes treated with eCG, due to its biological action similar to FSH, while hCG only has similarity to LH [27], which precludes any effect on previous FSH-related follicle development. Moreover, the half-life of hCG is longer than 36 h in humans and 39 h

in goats [28,29], so a single injection of hCG mimics the LH surge but remains in the blood beyond the normal duration of the LH surge, which may be the cause of the anovulatory luteinized follicles [30].

In spite of the lack of synchronized ovulations during the first 72 h after CIDR removal, around 85% of the hCG ewes denoted presence of ovulations on day 10 after progesterone removal, which may indicate the usefulness of hCG for inducing the resumption of the ovulatory activity of anestrus sheep, although in a narrow window of time. Our proposed treatment, based on the administration of hCG at the timing of progesterone removal, simplifies the management of the animals more than previous treatments including the administration of hCG at 24 h after CIDR removal and, therefore, one more handling day [17]. Therefore, if males remain with females for some days, it can be adopted by practitioners aiming to induce pregnancies in a short period of time. Interestingly, during the follow-up of the follicular growth waves, cyst structures were observed in the hCG ewes, suggesting that, irrespectively that these females depicted a delayed ovulation, a longer time is required to better follow-up the follicular wave. This issue deserves to be elucidated in future studies.

5. Conclusions

As expected, while the control ewes confirmed that the Dorper multiparous females were in deep seasonal anestrus, the eCG ewes showed a highly synchronized estrus manifestation and fertile ovulations. Regarding the administration of hCG at the time of CIDR removal in sheep during the anestrus season, it showed to be effective to induce estrus, promote follicular growth and a delayed yet significant ovulation (>84%) on day 10 after CIDR removal; furthermore, an increased embryonic implantation rate was also observed. Moreover, if the hCG ewes remain exposed to active males for some days, said strategy could be adopted, aiming to induce pregnancies by natural mating in a short period of time.

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

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: All of the methods and management procedures in this study were performed in agreement with the guidelines of the institutional Committee of Ethics in Animal Research (approval reference number UAAAN/UL/1330-8241-2868).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are contained within the article.

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

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders and the companies cited in the article had no role in the design of the study, the collection, analyses, and interpretation of data, the writing of the manuscript, and the decision to publish the results.

References

1. Abecia, J.A.; Forcada, F.; Gonzalez-Bulnes, A. Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Anim. Reprod. Sci.* **2012**, *130*, 173–179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Murphy, B.D. Equine chorionic gonadotropin: An enigmatic but essential tool. *Anim. Reprod.* **2018**, *9*, 223–230.
3. Manteca-Vilanova, X.; De Briyne, N.; Beaver, B.; Turner, P.V. Horse welfare during equine Chorionic Gonadotropin (eCG) production. *Animals* **2019**, *9*, 1053. [[CrossRef](#)]

4. Gonzalez-Bulnes, A.; Menchaca, A.; Martin, G.B.; Martinez-Ros, P. Seventy years progestagen treatments for management of the sheep oestrous cycle: Where we are and where we should go. *Reprod. Fertil. Dev.* **2020**, *32*, 441–452. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Lee, S.Y.; Byambaragchaa, M.; Kim, J.; Seong, H.; Kang, M.; Min, K.S. Biochemical Characterization of Recombinant Equine Chorionic Gonadotropin (rec-eCG), using CHO Cells and PathHunter Parental Cells Expressing Equine Luteinizing Hormone/Chorionic Gonadotropin Receptors (eLH/CGR). *J. Life Sci.* **2017**, *27*, 864–872. [[CrossRef](#)]
6. Byambaragchaa, M.; Lee, S.Y.; Kim, D.J.; Kang, M.H.; Min, K.S. Signal Transduction of Eel Luteinizing Hormone Receptor (eelLHR) and Follicle Stimulating Hormone Receptor (eelFSHR) by Recombinant Equine Chorionic Gonadotropin (rec-eCG) and Native eCG. *Dev. Reprod.* **2018**, *22*, 55–64. [[CrossRef](#)]
7. Min, K.S.; Park, J.J.; Byambaragchaa, M.; Kang, M.H. Characterization of tethered equine chorionic gonadotropin and its deglycosylated mutants by ovulation stimulation in mice. *BMC Biotechnol.* **2019**, *19*, 60. [[CrossRef](#)]
8. Crispo, M.; Meikle, M.N.; Schlapp, G.; Menchaca, A. Ovarian superstimulatory response and embryo development using a new recombinant glycoprotein with eCG-like activity in mice. *Theriogenology* **2021**, *164*, 31–35. [[CrossRef](#)]
9. Martinez-Ros, P.; Gonzalez-Bulnes, A. Efficiency of CIDR-based protocols including GnRH instead of eCG for estrus synchronization in sheep. *Animals* **2019**, *9*, 146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Santos-Jimenez, Z.; Guillen-Gargallo, S.; Encinas, T.; Berlinguer, E.; Veliz-Deras, F.G.; Martinez-Ros, P.; Gonzalez-Bulnes, A. Use of propylene-glycol as a cosolvent for GnRH in synchronization of estrus and ovulation in sheep. *Animals* **2020**, *10*, 897. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Santos-Jimenez, Z.; Martinez-Herrero, C.; Encinas, T.; Martinez-Ros, P.; Gonzalez-Bulnes, A. Comparative efficiency of oestrus synchronization in sheep with progesterone/eCG and progesterone/GnRH during breeding and non-breeding season. *Reprod. Domest. Anim.* **2020**, *55*, 882–884. [[CrossRef](#)]
12. Hafez, E.S.E.; Jainudeen, M.R.; Rosnina, Y. *Reproduction in Farm Animals*, 7th ed.; Hafez, B., Hafez, E.S.E., Eds.; John Wiley & Sons: Kiawah Island, SC, USA, 2000; pp. 31–54. [[CrossRef](#)]
13. Laphorn, A.J.; Harris, D.C.; Littlejohn, A.; Lustbader, J.W.; Canfield, R.E.; Machin, K.J.; Morgan, F.J.; Isaacs, N.W. Crystal structure of human chorionic gonadotropin. *Nature* **1994**, *369*, 455–461. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Kinser, A.R.; Gibson, M.F.; Vincent, D.L.; Scheffrahn, N.S.; Kesler, D.J. Ovarian responses of seasonally anoestrus ewes administered progesterone, PMS, hCG and(or) GnRH. *Theriogenology* **1983**, *19*, 449–464. [[CrossRef](#)]
15. Zamiri, M.J.; Hosseini, M. Effects of human chorionic gonadotropin (hCG) and phenobarbital on the reproductive performance of fat-tailed Ghezel ewes. *Small Rumin. Res.* **1998**, *30*, 157–161. [[CrossRef](#)]
16. Dias, L.M.K.; Sales, J.N.S.; Viau, P.; Barros, M.B.P.; Nicolau, S.S.; Simões, L.M.S.; Alves, N.G.; Alonso, M.A.; Valentim, R.; Oliveira, C.A. Although it induces synchronized ovulation, hCG reduces the fertility of Santa Ines ewes submitted to TAI. *Arq. Bras. Med. Veterinária Zootec.* **2018**, *70*, 122–130. [[CrossRef](#)]
17. Bruno-Galarraga, M.; Cano-Moreno, V.; Lago-Cruz, B.; Encinas, T.; Gonzalez-Bulnes, A.; Martinez-Ros, P. The Use of hCG for Inducing Ovulation in Sheep Estrus Synchronization Impairs Ovulatory Follicle Growth and Fertility. *Animals* **2021**, *11*, 984. [[CrossRef](#)]
18. Bartlewski, P.M.; Beard, A.P.; Cook, S.J.; Rawlings, N.C. Ovarian follicular dynamics during anoestrus in ewes. *Reproduction* **1998**, *113*, 275–285. [[CrossRef](#)]
19. Rosa, H.J.D.; Bryant, M.J. Seasonality of reproduction in sheep. *Small Rumin. Res.* **2003**, *48*, 155–171. [[CrossRef](#)]
20. FASS. *Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching*, 3rd ed.; Federation Animal Science Society: Champaign, IL, USA, 2010; p. 177.
21. NAM-National Academy of Medicine. Co-Produced by the National Academy of Medicine–Mexico and the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International. In *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, 1st ed.; Harlan: Mexico City, Mexico, 2010.
22. Veiga-Lopez, A.; Encinas, T.; McNeilly, A.S.; Gonzalez-Bulnes, A. Timing of preovulatory LH surge and ovulation in superovulated sheep are affected by follicular status at start of the FSH treatment. *Reprod. Domest. Anim.* **2008**, *43*, 92–98. [[CrossRef](#)]
23. Ungerfeld, R.; Rubianes, E. Short term primings with different progestogen intravaginal devices (MAP, FGA and CIDR) for eCG-estrous induction in anoestrus ewes. *Small Rumin. Res.* **2002**, *46*, 63–66. [[CrossRef](#)]
24. Dias, J.H.; Miranda, V.O.; Oliveira, F.C.; Junior, S.V.; Haas, C.S.; Costa, V.G.G.; Lucia, T., Jr.; Vieira, A.D.; Corcini, C.D.; Gasperin, B.G. Treatment with eCG and hCG to induce onset of estrous cycles in ewes during the non-breeding season: Effects on follicular development and fertility. *Anim. Reprod. Sci.* **2020**, *212*, 106232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Souza, C.J.H.; Campbell, B.K.; Baird, D.T. Follicular dynamics and ovarian steroid secretion in sheep during anoestrus. *Reproduction* **1996**, *108*, 101–106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Bartlewski, P.M.; Beard, A.P.; Rawlings, N.C. Ovarian function in ewes at the onset of the breeding season. *Anim. Reprod. Sci.* **1999**, *57*, 67–88. [[CrossRef](#)]
27. Ziecik, A.J.; Kaczmarek, M.M.; Blitek, A.; Kowalczyk, A.E.; Li, X.; Rahman, N.A. Novel biological and possible applicable roles of LH/hCG receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2007**, *269*, 51–60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Duncan, W.C. Physiology of Ovulation. In *How to Prepare the Egg and Embryo to Maximize IVF Success*; Kovacs, G., Rutherford, A., Gardne, D.K., Eds.; Springer: Cambridge, UK, 2019; pp. 1–21. [[CrossRef](#)]

29. Saleh, M.; Shahin, M.; Wuttke, W.; Gaulty, M.; Holtz, W. Pharmacokinetics of human chorionic gonadotropin after im administration in goats (*Capra hircus*). *Reproduction* **2012**, *144*, 77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Parmar, S.C. Anovulation, delayed ovulation and luteal insufficiency. *Trends Biosci.* **2015**, *8*, 1203–1206.

Revista Chapingo Serie Zonas Áridas

USING TWO GNRH ANALOGUES TO IMPROVE REPRODUCTIVE PARAMETERS IN GOATS? --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	USING TWO GNRH ANALOGUES TO IMPROVE REPRODUCTIVE PARAMETERS IN GOATS?
Short Title:	GNRH TO IMPROVE REPRODUCTIVE PARAMETERS IN GOATS
Article Type:	Original Study/Estudio Original
Section/Category:	Sistemas de Producción Animal en Zonas Áridas
Keywords:	Estrus, goats, GnRH, Buserelin, Gonadorelin
Corresponding Author:	Guadalupe Calderon-Leyva, Dra. MEXICO
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Zuribaday Santos-Jimenez
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Zuribaday Santos-Jimenez Santos-Jimenez Zuribaday, M. Gullén-Muñoz Juan Manuel, Dr. Angel-García Oscar, Dr. Leticia R. Gaytan-Alman Guadalupe Calderon-Leyva, Dra.
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	The objective of this investigation was to evaluate whether the use of synthetic GnRH analogs administered in goats previously treated with intramuscular progesterone, would improve synchronous follicular development and induce ovulation. Forty Alpine goats were used that were synchronized with 20 mg of progesterone (P4) im (hour 0) then at 36 hours they were administered 75 mg of PgE2 and then divided into two groups, one treated with Gonadorelin Acetate (n = 20) and Buserelin Acetate (n = 20). Each group was subdivided into three subgroups with each analog. The Control group (n = 6) only received the administration of P4 and PgE2. Groups G54 (n = 7) and G84 (n = 7) received; on the one hand the first group 100µg of Gonadorelin acetate on day 0 and at 54- or 84h, a second application; the second Buserelin group, the females received 5µg of Buserelin Acetate on day 0 and at 54- or 84h according to their experimental group. The use of two GnRH analogues (gonadorelin and buserelin) with two applications in goats treated with 20 mg of progesterone im, induced abnormal growth in medium and large follicles regardless of the analog used, utilizing the follicle and inhibiting ovulation.
Suggested Reviewers:	Antonio Gonzalez-Buñes CEU Cardenal Herrera University: CEU Universidad Cardenal Herrera antonio.gonzalezbuñes@uchou.es Experto en reproducción en pequeños rumiantes Paula Martínez-Ros

Received by Editorial Board on 02/02/2016; accepted by Editorial Board on 02/02/2016. Review Article Copyright © Chapingo



NOTA: Esta carta debe ser presentada en un papel con membrete institucional de los autores

Atentamente,

Guadalupe Calderón Leyva 

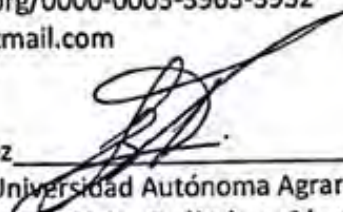
Afiliación institucional: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Dirección y código Postal: Periférico Raúl López Sánchez y Carretera a Santa Fe, Torreón,
Coahuila, México. C.P. 27054

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3963-3932>

Email: gcalderon06@hotmail.com

Teléfono: 8711626800

Zurisaday Santos Jiménez 

Afiliación institucional: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Dirección y código Postal: Periférico Raúl López Sánchez y Carretera a Santa Fe, Torreón,
Coahuila, México. C.P. 27054

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3589-1870>

Email: mvz_zusan@hotmail.com

Teléfono: 8713961668

Juan Manuel Guillen Muñoz 

Afiliación institucional: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Dirección y código Postal: Periférico Raúl López Sánchez y Carretera a Santa Fe, Torreón,
Coahuila, México. C.P. 27054

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9273-8931>

Email: mvz_guillen@hotmail.com

Teléfono: 8712360524

Oscar Ángel García 

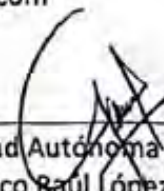
Afiliación institucional: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Dirección y código Postal: Periférico Raúl López Sánchez y Carretera a Santa Fe, Torreón,
Coahuila, México. C.P. 27054

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2239-7398>

Email: mvz.oscar_2207@hotmail.com

Teléfono: 8711440167

Leticia Romana Gaytan Aleman 

Afiliación institucional: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Dirección y código Postal: Periférico Raúl López Sánchez y Carretera a Santa Fe, Torreón,
Coahuila, México. C.P. 27054

II. Using two gnrh analogues to improve reproductive parameters in goats?

Zurisaday Santos-Jiménez¹, Juan M. Guillén-Muñoz¹, Oscar Ángel-García¹, Leticia R. Gaytán-Alemán¹, Guadalupe Calderon-Leyva^{1*}.

¹Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Periférico Raúl López Sánchez y Carretera a Santa Fe, Torreón, Coahuila, México. C.P. 27054.

Correo-e: * gcalderon06@hotmail.com

ABSTRACT

The use of GnRH to induce ovulation and improve follicular wave synchronization has been evaluated. The objective of this investigation was to evaluate whether the use of synthetic GnRH analogs administered in goats previously treated with intramuscular progesterone, would improve synchronous follicular development and induce ovulation. Forty Alpine goats were used that were synchronized with 20 mg of progesterone (P4) im (hour 0) then at 36 hours they were administered 75 mg of Pgf2 and then divided into two groups, one treated with Gonadorelin Acetate (n = 20) and Buserelin Acetate (n = 20). Each group was subdivided into three subgroups with each analog. The Control group (n = 6) only received the administration of P4 and Pgf2. Groups G54 (n = 7) and G84 (n = 7) received; on the one hand the first group 100µg of Gonaderolin acetate on day 0 and at 54 or 84h, a second application; the second Buserelin group, the females received 5µg of Buserelin Acetate on day 0 and at 54 or 84h according to their experimental group. The use of two GnRH analogues (gonadorelin and buserelin) with two applications in goats treated with 20 mg of progesterone im, induced abnormal

growth in medium and large follicles regardless of the analog used, luteinizing the follicle and inhibiting ovulation.

Keywords. Estrus, goats, GnRH, Buserelin, Gonaderelin

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar si el uso de análogos sintéticos de GnRH administrados en cabras previamente tratadas con progesterona intramuscular, mejoraría el desarrollo folicular sincrónico e inducir la ovulación. Se utilizaron cuarenta cabras Alpinas que se sincronizaron con 20 mg de progesterona (P4) im (hora 0) luego a las 36 horas se les administraron 75 mg de Pgf2 y después se dividieron en dos grupos, uno tratado con Acetato de Gonadorelina (n=20) y acetato de Buserelina (n=20). Cada grupo se subdividió en tres subgrupos con cada análogo. El grupo control (n=6) solo recibió la administración de P4 y Pgf2. Recibieron los grupos G54 (n=7) y G84 (n=7); por un lado el primer grupo 100 µg de acetate de gonaderolina el día 0 y a las 54 u 84 h, una segunda aplicación; En el Segundo grupo de Buserelina, las hembras recibieron 5 µg de Acetato de Buserelina el día 0 y a las 54 u 84 h según su grupo experimental. El uso de dos análogos de GnRH (gonadorelina y buserelina) con dos aplicaciones en cabras tratadas con 20 mg de progesterona im, indujo un crecimiento anormal en folículos medianos y grandes independientemente del análogo utilizado, luteinizando el folículo e inhibiendo la ovulación.

Palabras clave. Estro, Cabras, GnRH, Buserelina, Gonadorelina

INTRODUCTION

The use of treatments based on exogenous hormones have been used in recent years to induce and synchronize heat and ovulation in small ruminants, with favorable results since they improve reproductive parameters and result in making the production system more efficient, improving fertility and the prolificacy rates (Abecia *et al.*, 2012). Some hormones used for 70 years have been questioned because of the way in which they are extracted. It is important to look for viable alternatives without affecting the results; such is the case of the eCG (Equine Chorionic Gonadotropin) hormone that is used to improve follicular growth due to its action of FSH (Follicle Stimulating Hormone) administered 24 hours before or on the day of removal of the progesterone-impregnated intravaginal device (CIDR; de Andrade *et al.*, 2021; Gonzalez-Bulnes and Martinez-Ros, 2019). The initial function of administering an exogenous source of progesterone is to mimic the luteal phase of an estrous cycle and prepare estradiol receptors to initiate the same estrous activity that will result in the LH (Luteinizing Hormone) surge and ovulation (Goodman *et al.*, 2002).

However, these treatments are sometimes expensive and inaccessible for producers who keep their goats or sheep in marginal areas, and they require trained personnel to apply them. Therefore, accessible and easy-to-administer hormone-based treatments have been designed. Such is the case of the use of intramuscular injections of 10 to 20 mg of progesterone with favorable results in the reproductive season and in the seasonal anestrus; as long as it is accompanied by a gonadotropin (hCG and/or eCG); 24 hours after its application.

(Contreras-Villareal *et al.*, 2015; Alvarado-Espino *et al.*, 2016; Veliz-Deras *et al.*, 2020; Zuñiga-Garcia *et al.*, 2020). To search for new alternatives, there is evidence that treatments based on the administration of GnRH (gonadotropin-releasing hormone) analogues, at the beginning of treatment with progestogens increase the renewal of the follicle with the recruitment of a new dominant follicle (Thatcher *et al.*, 1989). The use of GnRH induces the regression of large follicles and the appearance of new preovulatory follicles, which implies that most of the preovulatory follicles that grow after its injection emerge from the group of follicles that respond to gonadotropins (Año-Perello *et al.*, 2020); Since it stimulates the release of both FSH and LH (within 30 min after their administration), the former stimulates follicular growth and the latter induces ovulation of the dominant follicle (Peters, 2005; Lone *et al.*, 2016).

On the other hand, with the implementation of ultrasound in animal reproduction it was possible to determine the growth and development of the follicles, which is why it has been determined that follicular development in response to gonadotropin treatments can be of great practical interest, as it is already in cattle, to evaluate the ovarian response during the application of different superovulation protocols and the expected ovulation rate (Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2002). The objective of this investigation was to evaluate whether the use of synthetic GnRH analogs administered in goats previously treated with intramuscular progesterone, would improve synchronous follicular development and induce ovulation.

MATERIALS AND METHODS

2.1. Animals and Experimental Design

The study was carried out in northern Mexico (26°23 N; 104°47 O) under natural conditions of photoperiod and ambient temperature, where day length is 13 hours, 41 minutes at the summer solstice and 10 hours, 9 minutes at the winter solstice. All animals had free access to water and alfalfa, (17% raw protein; PC, and 1.95 Mcal of metabolizable energy; ME), each animal received 200 g of commercial concentrate (14% PC and 1.7 Mcal ME). The management of experimental animals used in this study was in accordance with approved guidelines for ethical use, animal welfare in research at the international (FASS, 2010) and national (NAM, 2002).

Forty Alpine goats were used of an average age of 2-4 years old, with a body condition of $2.6 \pm .6$ (0-extremely thin, 5-obese) and an average weight of 53 kg. Females underwent two different treatments: First group ($n=20$): all females were treated with 25 mg of natural progesterone per via i.m. (Progesvit, Brovel, Mexico,) at the beginning of the experiment (hour 0); 36 hours later were injected with 75 mg of Pgf2 (Prostagelol-D, Internacional Prode, Argentina); then they were divided into 3 groups (Control $n=6$); (G54 $n=7$); (G84 $n=7$); groups 54 and 84 received two applications of 100 μ g Gonadorelin Acetate, a GnRH analogue (GnRH, Sanfer, México); the first at hour 0 and the second at 54 and 84 h, respectively, as depicted in **Figure 1**. Second group ($n=20$) was similar. All females were treated with 25 mg of natural progesterone per via i.m. (Progesvit, Brovel, Mexico,) at the beginning of the experiment (hour 0); 36 hours later were

injected with 75 mg of Pgf2 (Prostagenol-D, International Prode, Argentina; then they were divided into 3 groups (Control $n=6$); (G54 $n=7$); (G84 $n=7$); groups 54 and 84 received two applications of 5 μg of de Buserelin Acetate, a GnRH analogue (LiberActive, Virbac, Mexico) the first at 0 h and the second at 54 and 84 h, respectively, as depicted in **Figure 1**.

2.1. Response and latency estrus

In both experiments, the estrus response was determined twice a day during a 15-minute period from progesterone injection (hour 0 until -84 hours). They were used two bucks proven fertility, with apron, female stopped to mating, was considered in estrus, thereafter goats in estrus they were taken to direct mating.

2.2. Follicular development, ovulations, and pregnancy rate

Ovarian follicular dynamics were monitored by transrectal ultrasonography using a 7.5 MHz transducer (Chison ECO 5 VET). After introducing an hydrosoluble contact gel into the rectum to enhance the ultrasound transmission, the probe was placed in the rectum with the transducer orientated perpendicularly to the ventral abdominal wall. Ovarian ultrasonography was performed by the same operator daily, every 24 hours from the (hour 0, before administration progesterone until the 120 hours), the same procedure was performed for all females of the two experiments. Follicles were classified using the same criteria as described By Gonzales-Bulnes *et al.*, (1999) as small (2 to 3 mm), medium (4-5) or large (≥ 6 mm). The ovulations were determined by the presence of corpora lutea, on day 10 of the induced estrus cycle. Pregnancy rate was determined 45 days post mating.

2.3 Statistical Analysis

The diameter and number follicles were compared between groups by paired One-way ANOVA. The effects of treatment on the estrus and latency estrus behavior and ovulation and pregnancy were assessed by analyses of variance (ANOVA) and chi-squared test by using SPSS 22.0 (IBM Corporation, New York, NY, USA). All results were expressed as mean \pm SEM and the statistical significance was accepted from $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Trial 1: Follicular wave synchronization using gonadorelin acetate.

At Ultrasonography before treatment showed differences at the follicular diameter (small, medium, and large) in the three groups ($p < 0.05$). Large follicles G84 group the at 48h showed growth 9.5 mm different about Control and G54 groups, although there were no statistical differences There is no effect over time after the application of gonadorelin acetate on the size of follicles after treatment (G54 vs G84; $p > 0.05$); figure 3. Regarding the number of follicles, the differences they were showed only in follicles large between the groups: G84 vs control and G54, ($p < 0.002$) at the 72 and ($p < 0.010$) at 120 h. figure 4. The first application of gonadorelin decreased the growth of small follicles but increased their number, as well as the large ones. In effect, one dose of GnRH is given at the onset of oestrus and the induced LH (Rubianes and Menchaca, 2003). Immediately after the application of prostaglandin at 36h, an increase in large follicles was observed. This is because, during the luteal phase, the LH pulsatility frequency remains low due to the inhibitory effect of progesterone and the pre-ovulatory follicles have no opportunity to establish their dominance (González-Bulnes *et al.*, 2002). The

second application of gonadorelin at 54h stimulated the growth of the medium follicles and decreasing the large ones. In this sense, the addition of gonadoreline in short treatments induced an 8h early ovulation time (53.0 h) (Martemucci and D'Alessandro, 2011). The LH surge induced by exogenous gonadorelin administered at the time of estrus might have contributed to ovulatory follicle development and/or ovulation induction, resulting in a higher ovulation rate (Hashem and Sallam, 2020). However, in our study a decrease in ovulations was observed. During the follicular phase, the main role of GnRH, endogenously secreted or exogenously administrated, is inducing LH surge to ovulate the LH-responsive follicles (ovulatory follicles). The expected role of GnRH injected around the time of estrus is induction of ovulation for the ovulatory follicles without stimulating the growth or the development of the subordinate follicles to be ovulatory (Hashem et al., 2015). The use of GnRH at the time of insertion of the CIDR stimulated the regression of the large follicles to ≥ 4 mm, to later emerge a synchronous growth wave (Año-Perello *et al.*, 2020), which in our investigation did not occur due to because the exposure time to progesterone was very short.

3.2. Trial 2: Follicular wave synchronization using buserelin acetate.

The follicular growth of the females treated with two injections of buserelin acetate during season reproductive, showed no significant differences in the first 48 hours of treatment, but at 72h in the G84 group ($p < 0.05$), a considerable growth of 10 mm can be observed, to then decrease which could have been due to the effect of the second application of GnRH itself that was injected at 84 h. figure 5.

Figure 6. shows the changes in the mean number of small, medium and large follicles, with respect to the number follicles small the groups G84 and control, they showed a difference ($p < 0.004$) about the group G54 the at 48 h.

On the other hand, follicles large in the three group the at 48 h are diminished, possibly by follicular turnover late due to the effect of treatment with progesterone (independently the application of GnRH), thereafter an increase is observed at 72 in the follicles with differences between the treated groups vs. the control group. The second application of bucerelin at 54h increased the number of small follicles. While at 84h it showed no effect on the growth of follicles or their number. In effect, the injection of 5 mg buserelin, the mean concentrations of FSH increased until reached a peak 2.5-3 h after injection (Martin *et al.*, 1986). Using a combination of buserelin and PGF and compared the synchronization and fertility obtained using this method with that of an 11-day double dose PGF regime (Beck *et al.*, 1996) . In cows, no major differences in terms of LH release between gonadorelin and buserelin products (Armengol-Gelonch *et al.*, 2017).

3.3. Estrus response

The response reproductive in females treated with a to protocol short progesterone, more two application of analogues different of GnRH (gonadoreline and/or busereline), showed in the table 1. However, the groups treated with a second dose of both gonadorelin and bucerelin at 54 h showed 14% heat and ovulation, while at 84 h no female showed heat or ovum. This is because the formation of follicular cysts appreciated 120h after the start of treatment was promoted. In other investigations carried out in goats, under a previous treatment of im progesterone plus estradiol and GnRH, the response was different, showing

oestrous activity in 100% of the treated females, it is worth mentioning that the administration of GnRH was 48 hours later (Carillo *et al.*, 2017), and not at the time of the administration of P4. The use of GnRH administration at the time of P4 administration in our research could not be beneficial for the follicle since it did not allow the maturation of the follicles so that they could develop ideal levels of estradiol that would allow estrous activity, since this depends to a large extent on the stage of the cycle in which the administration of GnRH occurs (Reviewed by Titi *et al.*, 2008).

Table 1. Goats latency and estrus, ovulated and pregnancy in treatment whit two analogues GnRH.

CONCLUSIONS

The use of two GnRH analogues (gonadorelin and buserelin) with two applications in goats treated with 20 mg of progesterone im, induced abnormal growth in medium and large follicles regardless of the analog used, luteinizing the follicle and inhibiting ovulation, thus there was no manifestation of estrus.

REFERENCES

- Abecia, J. A., Forcada, F., & González-Bulnes, A. (2012). Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Animal reproduction science*, 130(3-4), 173-179.
- Alvarado-Espino, A. S., Meza-Herrera, C. A., Carrillo, E., González-Álvarez, V. H., Guillen-Muñoz, J. M., Ángel-García, O., ... & Véliz-Deras, F. G. (2016). Reproductive outcomes of Alpine goats primed with progesterone and

treated with human chorionic gonadotropin during the anestrus-to-estrus transition season. *Animal reproduction science*, 167, 133-138.

Año-Perello, A., Santos-Jimenez, Z., Encinas, T., Martinez-Ros, P., & Gonzalez-Bulnes, A. (2020). Use of gnrh for synchronization of the follicular wave in assisted reproductive technologies in sheep: A preliminary study. *Animals*, 10(7), 1208.

Armengol-Gelonch, R., Mallo, J. M., Ponté, D., Jimenez, A., Valenza, A., & Souza, A. H. (2017). Impact of phase of the estrous cycle and season on LH surge profile and fertility in dairy cows treated with different GnRH analogs (gonadorelin vs. buserelin). *Theriogenology*, 91, 121–126. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2017.01.001

Beck, N. F. G., Jones, M., Davies, B., Peters, A. R., & Williams, S. P. (1996). Oestrus synchronization in ewes: the effect of combining a prostaglandin analogue with a GnRH agonist (buserelin). *Animal Science*, 62(1), 85-87.

Carrillo, E., Meza-Herrera, C. A., Luna-Orozco, J. R., Delgado-Gonzales, R. A., Aleman, L. R. G., Ángel-Garcia, O., ... & Contreras-Villarreal, V. (2019). Evaluation of out-of-season estrus induction protocols in progesterone-primed mix-breed dairy goats using eCG, GnRH and E2. *Indian Journal of Animal Research*, 53(6), 711-715.

Contreras-Villarreal, V., Meza-Herrera, C. A., Rivas-Muñoz, R., Angel-Garcia, O., Luna-Orozco, J. R., Carrillo, E., ... & Véliz-Deras, F. G. (2016). Reproductive performance of seasonally anovular mixed-bred dairy goats

induced to ovulate with a combination of progesterone and eCG or estradiol. *Animal Science Journal*, 87(6), 750-755.

de Andrade, A. B. P., Morais, M. C. C., Rangel, P. S. C., Oliveira, M. E. F., Souza-Fabjan, J. M. G., & Fonseca, J. F. (2021). Effect of eCG in a short-term synchronization treatment on ovarian status, estrus synchrony, and ovulation in dairy goats managed under tropical conditions. *Tropical Animal Health and Production*, 53(2), 1-6.

de Bulnes, A. G., Moreno, J. S., Gomez-Brunet, A., Inskoop, E. K., Townsend, E. C., & Lopez-Sebastian, A. (1999). Follicular dynamics during the oestrous cycle in dairy goats. *Animal Science*, 68(3), 547-554.

FASS, (2010). Guide for the care and use of agricultural animals in agricultural research and teaching. (3rd Ed.), Federation Animal Science Society, Savoy, IL, USA.

González-Bulnes, A., Santiago-Moreno, J., García-García, R. M., Cocero, M. J., & López-Sebastián, A. (2002). Patrones y mecanismos de control del desarrollo folicular durante la administración de protocolos superovulatorios en pequeños rumiantes (Revisión). *Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim*, 17(1-2), 37-48.

Goodman, R. L., Gibson, M., Skinner, D. C., & Lehman, M. N. (2002). Neuroendocrine control of pulsatile GnRH secretion during the ovarian cycle: evidence from the ewe. *Reproduction (Cambridge, England) Supplement*, 59, 41-56.

- Hashem, N. M., & Sallam, S. M. (2020). Reproductive performance of goats treated with free gonadorelin or nanoconjugated gonadorelin at estrus. *Domestic Animal Endocrinology*, 71(September), 106390. DOI: 10.1016/j.domaniend.2019.106390
- Hashem, N. M., El-Azrak, K. M., Nour El-Din, A. N. M., Taha, T. A., & Salem, M. H. (2015). Effect of GnRH treatment on ovarian activity and reproductive performance of low-prolific Rahmani ewes. *Theriogenology*, 83(2), 192–198. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2014.09.016
- Lone, F. A., Malik, A. A., Khatun, A., Shabir, M., & Islam, R. (2016). Returning of cyclicity in infertile Corriedale sheep with natural progesterone and GnRH based strategies. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 5(1), 67-70.
- Martemucci, G., & D'Alessandro, A. G. (2011). Induction/synchronization of oestrus and ovulation in dairy goats with different short term treatments and fixed time intrauterine or exocervical insemination system. *Animal reproduction science*, 126(3-4), 187-194.
- Martin, G. B., Oldham, C. M., Cognié, Y., & Pearce, D. T. (1986). The physiological responses of anovulatory ewes to the introduction of rams—a review. *Livestock production science*, 15(3), 219-247.
- Martinez-Ros, P., & Gonzalez-Bulnes, A. (2019). Efficiency of CIDR-based protocols including GnRH instead of eCG for estrus synchronization in sheep. *Animals*, 9(4), 146.

- NAM, (2002). Guide for the care and use of laboratory animals. Co-produced by the National Academy of Medicine-Mexico and the Association for assessment and accreditation of laboratory animal care international. (1st. Ed.). Mexico, DF, Mexico.
- Peters, A. R. (2005). Veterinary clinical application of GnRH—questions of efficacy. *Animal reproduction science*, 88(1), 155-167
- Rubianes, E., & Menchaca, A. (2003). The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats. *Animal Reproduction Science*, 78(3-4), 271-287.
- Thatcher, W. W., Macmillan, K. L., Hansen, P. J., & Drost, M. (1989). Concepts for regulation of corpus luteum function by the conceptus and ovarian follicles to improve fertility. *Theriogenology*, 31(1), 149-164.
- Titi, H. H., Kridli, R. T., & Alnimer, M. A. (2010). Estrus synchronization in sheep and goats using combinations of GnRH, progestagen and prostaglandin F_{2α}. *Reproduction in domestic animals*, 45(4), 594-599.
- Véliz-Deras, F. G., Meza-Herrera, C. A., Mellado, M., Contreras-Villarreal, V., Gaytán-Alemán, L. R., & Guillén-Muñoz, J. M. (2020). The Effect of P4+ eCG Estrus Induction Protocol during the Deep and the Transition Anestrous Period on the Reproductive Performance of Crossbred Dairy Goats. *Biology*, 9(10), 311.
- Zúñiga-García, S., Calderón-Leyva, G., & Otal-Salaverri, J. Evaluation of Different eCG Doses+ Progesterone to Induce Reproductive Activity During the

Transitional Reproductive Season in Anestrous Creole Goats. Indian
Journal of Animal Research, 1, 5.

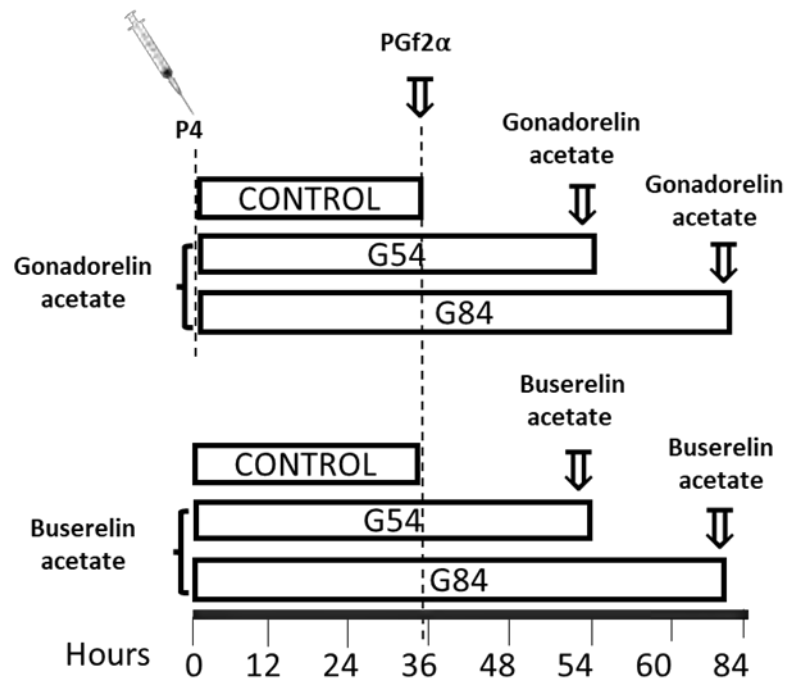


Figure 1. Schematic representation of the protocols used at both times of the year to synchronize the follicular wave in goats. Females were treated with 25 mg of natural progesterone via i.m. at the beginning of the experiment; 75 mg of Pgf2 α were administered the 36 h (groups 54 and 84) in both groups, received two applications of two analogs from GnRH ((n=20) / 100 μ g gonadorelin acetate; (n=20) / 5 μ g buserelin acetate) administered at 54 and 84 hours, respectively.

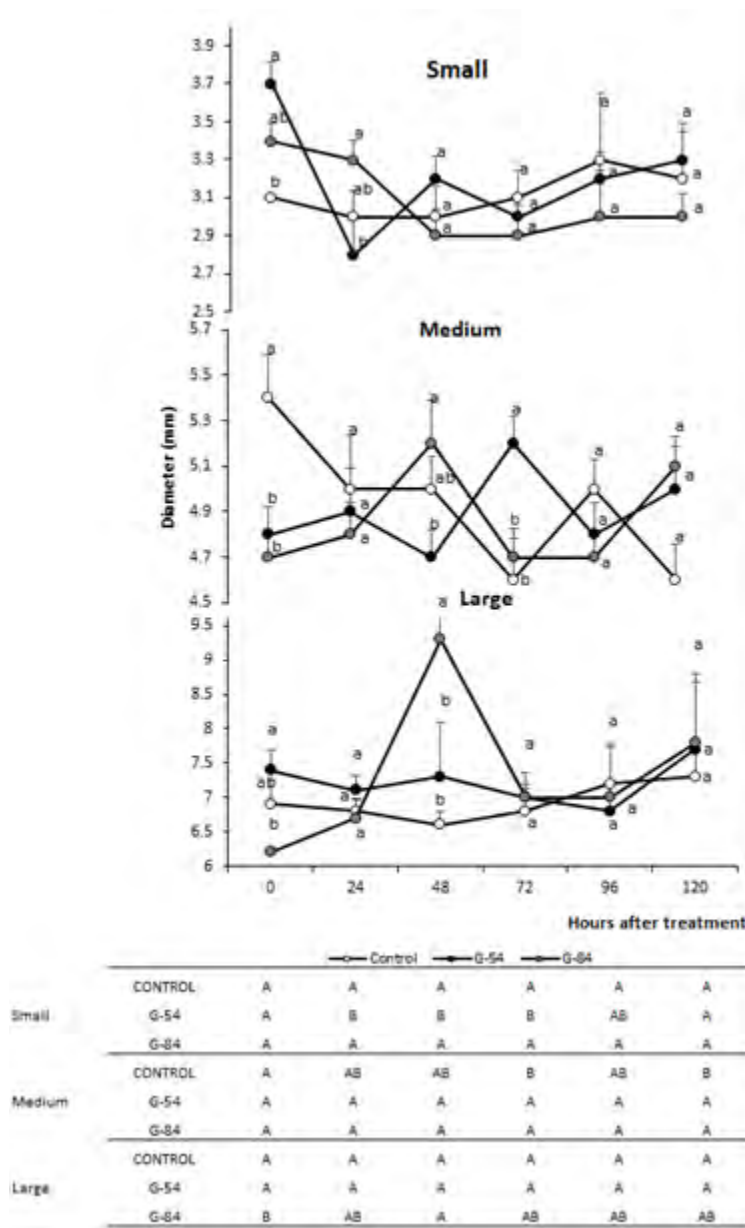


Figure 2. Mean diameter (\pm SEM) follicular in goats, from 24 until 120 hours after treatment with progesterone i.m. and GnRH analogue (gonadorelin acetate) administered at 54 and 84 hours, respectively. Statistical differences are represented vertical (small-white circles, medium-blank circles, and large-gray diamonds) group vs group. ($p < 0.05$). a,b,c Difference between groups by treatment. A, B, C Show the difference over time.

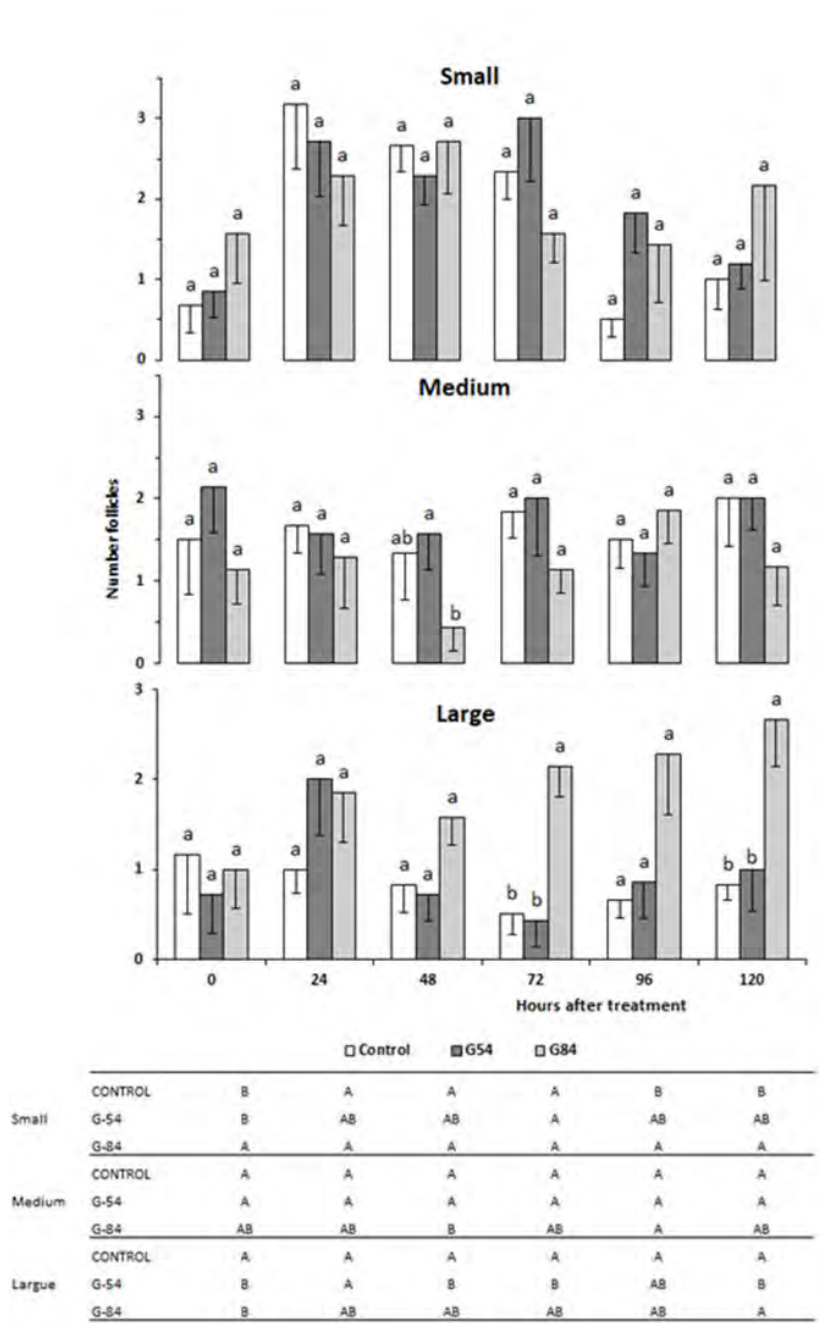


Figure 3. Mean number (\pm S.E.M.) of small (2 to 3 mm), medium (4-5) or large (≥ 6 mm), from 24 until 120 hours after treatment with progesterone i.m and GnRH analogue (gonadorelin acetate) administered at 54 and 84 hours, respectively. a,b,c Difference between groups by treatment. A, B, C Show the difference over time.

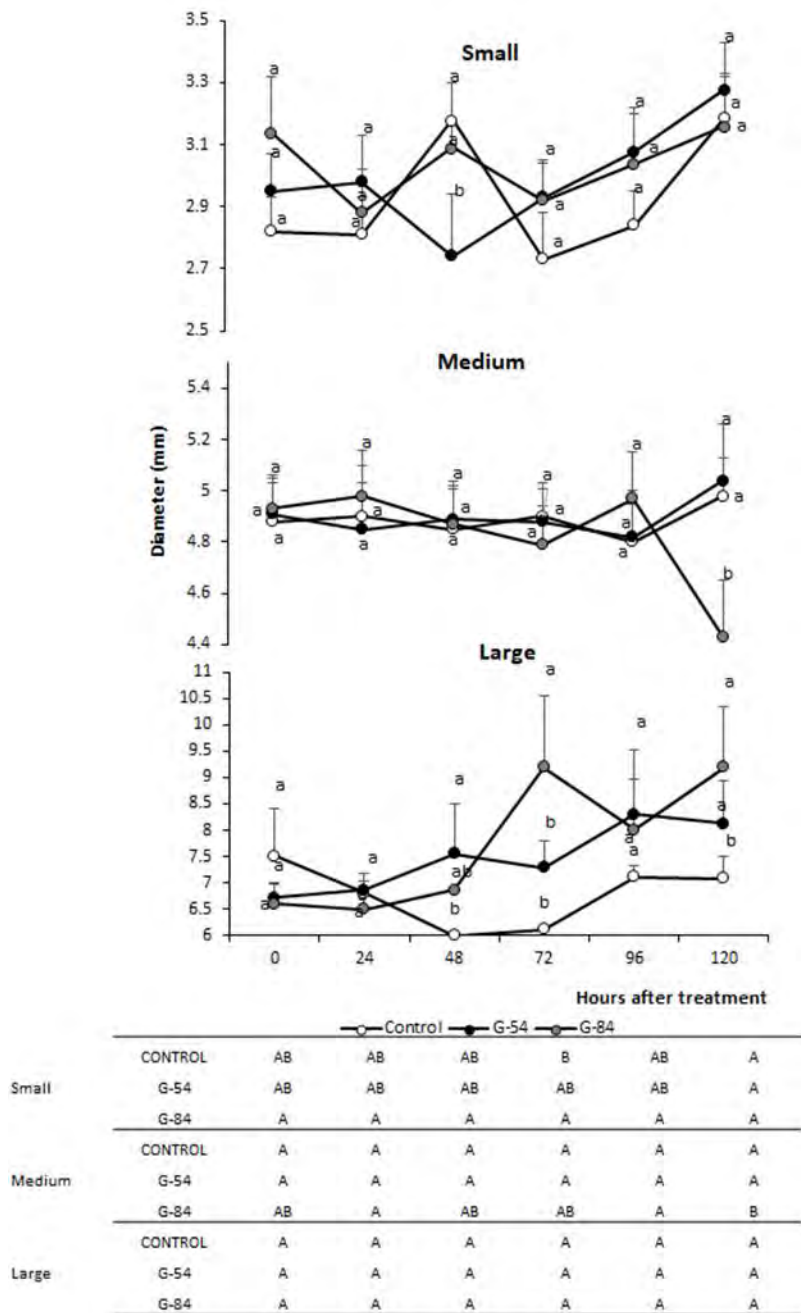
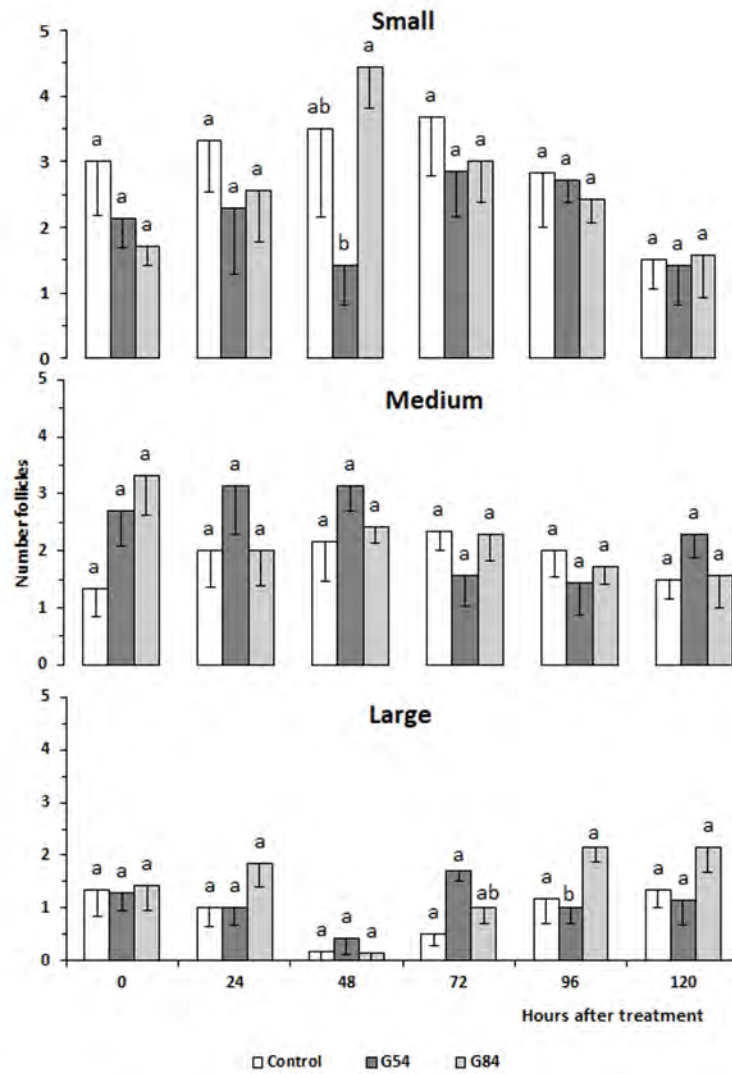


Figure 4. Mean diameter (\pm SEM) follicular in goats, from 24 until 120 hours after treatment with progesterone i.m. and GnRH analogue (buserelin acetate) administered at 54 and 84 hours, respectively. Statistical differences are represented vertical (small-white circles, medium-blank circles, and large-gray diamonds) group vs group. ($p < 0.05$). a,b,c Difference between groups by treatment. A, B, C Show the difference over time.



		0	24	48	72	96	120
Small	CONTROL	A	A	A	A	A	A
	G-54	A	A	A	A	A	A
	G-84	B	B	A	AB	B	B
Medium	CONTROL	A	A	A	A	A	A
	G-54	A	A	A	A	A	A
	G-84	A	A	A	A	A	A
Large	CONTROL	A	AB	B	AB	AB	A
	G-54	AB	AB	B	A	AB	AB
	G-84	A	A	B	AB	A	A

Figure 5. Mean number (\pm S.E.M.) of small (2 to 3 mm), medium (4-5) or large (≥ 6 mm), from 24 until 120 hours after treatment with progesterone i.m. and GnRH analogue (buserelin acetate) administered at 54 and 84 hours, respectively. a,b,c Difference between groups by treatment. A, B, C Show the difference over time

Table 1. Goats latency and estrus, ovulated and pregnancy in treatment with two analogues GnRH.

Groups	Control	G54	G84	Control	G54	G84
	<i>gonadoreline</i>			<i>busereline</i>		
Estrus	50% (3/6) ^a	14% (1/7) ^b	0 (0/7) ^b	83% (5/6) ^a	14% (1/7) ^b	0 (0/7) ^b
Latency estrus	36h	24h	0h ^b	36h	48h	0h
Goats ovulated	50% (3/6) ^a	14% (1/7) ^b	0 (0/7) ^b	83% (5/6) ^a	14% (1/7) ^b	0 (0/7) ^b
Pregnancy	50% (3/6) ^a	14% (1/7) ^b	0 (0/7) ^b	83% (5/6) ^a	14% (1/7) ^b	0 (0/7) ^b

4. CONCLUSIÓN

De acuerdo a nuestros resultados podemos concluir que el uso de análogos de gonadotropinas con acción biológica similar, puede ser una opción para inducir el estro y la ovulación en ovejas durante el anestro estacional tal es el caso del uso de la hCG, administrándola al momento del retiro siempre y cuando se modifica este protocolo con la introducción del macho para mejorar los parámetros reproductivos, por otro lado el uso de análogos de GnRH puede no ser una opción viable al utilizarlo con progesterona im ya que indujo la formación de estructuras luteinizadas lo que dio paso a un crecimiento anormal del folículo. Por lo que es necesaria más investigación para evaluar su uso con tratamientos con progesterona cortos.

5. LITERATURA CITADA

- Abecia, J. A., Forcada, F., & González-Bulnes, A. (2012). Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Animal reproduction science*, 130(3-4), 173-179.
- Aguilar-Martínez, C. U., Berruecos-Villalobos, J. M., Espinoza-Gutiérrez, B., Segura-Correa, J. C., Valencia-Méndez, J., & Roldán-Roldán, A. (2017). Origen, historia y situación actual de la oveja pelibuey en México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 20(3), 429-439.
- Alvarado-Espino, A. S., Menchaca, A., Meza-Herrera, C. A., Mellado, M., Arellano, F., & Véliz, F. (2019). Use of injectable progesterone and hCG for fixed-time artificial insemination during the non-breeding season in goats. *Theriogenology*, 127, 21-25.
- Alvarado-Espino, A. S., Meza-Herrera, C. A., Carrillo, E., González-Álvarez, V. H., Guillen-Muñoz, J. M., Ángel-García, O., ... & Véliz-Deras, F. G. (2016). Reproductive outcomes of Alpine goats primed with progesterone and treated with human chorionic gonadotropin during the anestrus-to-estrus transition season. *Animal reproduction science*, 167, 133-138.
- Arendt, J. (1998). Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. *Reviews of reproduction*, 3, 13-22.
- Arroyo Ledezma, J., Gallegos-Sánchez, J., Villa Godoy, A., & Valencia Méndez, J. (2006). Sistemas neurales de retroalimentación durante el ciclo reproductivo anual de la oveja: una revisión. *Interciencia*, 31(1), 8-15.
- Arroyo, J. (2011). Estacionalidad reproductiva de la oveja en México. *Tropical and subtropical agroecosystems*, 14(3), 829-845.
- Bartlewski, P. M., Baby, T. E., & Giffin, J. L. (2011). Reproductive cycles in sheep. *Animal reproduction science*, 124(3-4), 259-268.
- Bartlewski, P. M., Beard, A. P., Cook, S. J., Chandolia, R. K., Honaramooz, A., & Rawlings, N. C. (1999). Ovarian antral follicular dynamics and their relationships

with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. *Reproduction*, 115(1), 111-124.

Bartlewski, P. M., Vanderpol, J., Beard, A. P., Cook, S. J., & Rawlings, N. C. (2000). Ovarian antral follicular dynamics and their associations with peripheral concentrations of gonadotropins and ovarian steroids in anoestrous Finnish Landrace ewes. *Animal Reproduction Science*, 58(3-4), 273-291.

Baumgarten, S. C., & Stocco, C. (2018). Granulosa cells. *Encyclopedia of Reproduction*, Second Edition, 2018, 8–13

Beck, N. F. G., Jones, M., Davies, B., Peters, A. R., & Williams, S. P. (1996). Oestrus synchronization in ewes: the effect of combining a prostaglandin analogue with a GnRH agonist (buserelin). *Animal Science*, 62(1), 85-87.

Bianchi, C. P., Benavente, M. A., Simonetti, M., & Aba, M. A. (2018). Synchronization of time of ovarian follicular development in llamas (*Lama glama*) using a protocol based on GnRH and PGF2 α . *Animal reproduction science*, 192, 200-205.

Bruno-Galarraga, M., Cano-Moreno, V., Lago-Cruz, B., Encinas, T., Gonzalez-Bulnes, A., & Martinez-Ros, P. (2021). The Use of hCG for Inducing Ovulation in Sheep Estrus Synchronization Impairs Ovulatory Follicle Growth and Fertility. *Animals*, 11(4), 984.

Bustamante-Andrade, J. A., Meza-Herrera, C. A., Rodríguez-Martínez, R., Santos-Jimenez, Z., Ángel-García, O., Gaytán-Alemán, L. R., ... & Véliz-Deras, F. G. (2021). Luteogenesis and Embryo Implantation Are Enhanced by Exogenous hCG in Goats Subjected to an Out-of-Season Fixed-Time Artificial Insemination Protocol. *Biology*, 10(5), 429.

Campbell, B. K. (1999). The Modulation of Gonadotrophs Hormone Action on the Ovary by Paracrine and Autocrine Factors. *Reproduction in Domestic Animals*, 34(3-4), 147-153.

Caraty, A., & Skinner, D. C. (1999). Progesterone priming is essential for the full expression of the positive feedback effect of estradiol in inducing the preovulatory

- gonadotropin-releasing hormone surge in the ewe. *Endocrinology*, 140(1), 165-170.
- Carías, A. A. R. (2013). Sostenibilidad y competitividad de sistemas de producción de pequeños rumiantes. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 278-283.
- Chemineau, P. (1993). Medio ambiente y reproducción animal. *World Animal Review*, 77(1), 2-14.
- Chemineau, P., Baril, G., & Delgadillo, J. A. (1993b). Control hormonal de la reproducción en el caprino.
- Contreras-Villarreal, V., Meza-Herrera, C. A., Rivas-Muñoz, R., Angel-García, O., Luna-Orozco, J. R., Carrillo, E., ... & Véliz-Deras, F. G. (2016). Reproductive performance of seasonally anovular mixed-bred dairy goats induced to ovulate with a combination of progesterone and eCG or estradiol. *Animal Science Journal*, 87(6), 750-755.
- Cosentino, I. O., Balara, M. F. A., Leal, F. S. C., Bade, A. L. C., Barbosa, L. D. F. C., Gonçalves, F. M., ... & Brandão, F. Z. (2020). Ovarian activity in dairy Saanen goats subjected to a short-term ovulation induction protocol and a single injection of leirelin (GnRH analog) given 28 h or 34 h after progestin pre-treatment. *Small Ruminant Research*, 191, 106214.
- De Bond, J. A., & Smith, J. T. (2014). Kisspeptin and energy balance in reproduction. *Reproduction*, 147(3), R53-R63.
- De castro, T., Menchaca, A & Rubianes, E. (2014). Fisiología reproductiva y control del desarrollo folicular en ovejas y cabras. *Instituto de reproducción animal de Uruguay*.
- Decourt, C., & Beltramo, M. (2018, September). New insights on the neuroendocrine control of puberty and seasonal breeding in female sheep. In 10. International Ruminant Reproduction Symposium (IRRS) (Vol. 15). BRAZILIAN COLL ANIMAL REPRODUCTION.

- Devoto, L., Fuentes, A., Kohen, P., Céspedes, P., Palomino, A., Pommer, R., ... & Strauss III, J. F. (2009). The human corpus luteum: life cycle and function in natural cycles. *Fertility and sterility*, 92(3), 1067-1079.
- Di Giorgio, N. P., Bizzozzero-Hiriart, M., Libertun, C., & Lux-Lantos, V. (2019). Unraveling the connection between GABA and kisspeptin in the control of reproduction. *Reproduction*, 157(6), R225-R233.
- Driancourt, M. A., Gibson, W. R., & Cahill, L. P. (1985). Follicular dynamics throughout the oestrous cycle in sheep. A review. *Reproduction Nutrition Développement*, 25(1A), 1-15.
- Drost, M., & Thatcher, W. W. (1992). Application of gonadotrophin releasing hormone as therapeutic agent in animal reproduction. *Animal Reproduction Science*, 28(1-4), 11-19.
- Duggavathi, R., Bartlewski, P. M., Pierson, R. A., & Rawlings, N. C. (2003). Luteogenesis in cyclic ewes: echotextural, histological, and functional correlates. *Biology of reproduction*, 69(2), 634-639.
- Duncan, W. C. (2019). Physiology of Ovulation. *How to Prepare the Egg and Embryo to Maximize IVF Success*, 1.
- Duncan, W. C., Myers, M., Dickinson, R. E., van den Driesche, S., & Fraser, H. M. (2009). Luteal development and luteolysis in the primate corpus luteum. *Animal Reprod*, 6, 34-46.
- Escareño Sánchez, L. M., Wurzinger, M., Pastor López, F., Salinas, H., Sölkner, J., & Iñiguez, L. (2011). La cabra y los sistemas de producción caprina de los pequeños productores de la Comarca Lagunera, en el norte de México. *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente*, 17(SPE), 235-246.
- Fabre-Nys, C., & Gelez, H. (2007). Sexual behavior in ewes and other domestic ruminants. *Hormones and Behavior*, 52(1), 18-25.
- Farrera-Vázquez, I. C., Cervantes-Escoto, F., & Palacios-Rangel, M. I. (2020). Factors influencing financial profit in goat farms in la laguna, Durango, Mexico Factores

- que inciden en la utilidad económica de los caprinocultores de la laguna, Durango, México. *Revista Bio Ciencias*, 7, e933.
- Fatet, A., Pellicer-Rubio, M. T., & Leboeuf, B. (2011). Reproductive cycle of goats. *Animal reproduction science*, 124(3-4), 211-219.
- Fernandez, J., Bruno-Galarraga, M. M., Soto, A. T., de la Sota, R. L., Cueto, M. I., Lacau, I. M., & Gibbons, A. E. (2018). Hormonal therapeutic strategy on the induction of accessory corpora lutea in relation to follicle size and on the increase of progesterone in sheep. *Theriogenology*, 105, 184-188.
- Flynn, J. D., Duffy, P., Boland, M. P., & Evans, A. C. O. (2000). Progestagen synchronisation in the absence of a corpus luteum results in the ovulation of a persistent follicle in cyclic ewe lambs. *Animal Reproduction Science*, 62(4), 285-296.
- García-Pintos, C., & Menchaca, A. (2016). Luteal response and follicular dynamics induced with equine chorionic gonadotropin (eCG) administration after insemination in sheep. *Small Ruminant Research*, 136, 202-207.
- Ginther, O. J., & Kot, K. (1994). Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. *Theriogenology*, 42(6), 987-1001.
- Gómez-Brunet, A., Santiago-Moreno, J., Montoro, V., Garde, J., Pons, P., Gonzalez-Bulnes, A., & López-Sebastián, A. (2007). Reproductive performance and progesterone secretion in estrus-induced Manchega ewes treated with hCG at the time of AI. *Small Ruminant Research*, 71(1-3), 117-122.
- Gonzalez-Bulnes, A., Menchaca, A., Martin, G. B., & Martinez-Ros, P. (2020). Seventy years of progestagen treatments for management of the sheep oestrous cycle: Where we are and where we should go. *Reproduction, Fertility and Development*, 32(5), 441-452.
- González-Maldonado, J., Martínez-Moreno, E. A., Domínguez-Caballero, J. F., Herrera-Corredor, C. ., & Gallegos-Sánchez, J. . (2021). Reproductive management of the goat. *Agro Productividad*. <https://doi.org/10.32854/agrop.v14i8.2059>

- Goodman RL. 1994. Neuroendocrine control of the ovine estrous cycle. In: The physiology of reproduction. Ed: Knobil E and Neill JD. Raven Press Ltd. New York (2) 659-724.
- Goodman, R. L., Gibson, M., Skinner, D. C., & Lehman, M. N. (2002). Neuroendocrine control of pulsatile GnRH secretion during the ovarian cycle: evidence from the ewe. *Reproduction (Cambridge, England) Supplement*, 59, 41-56.
- Goodman, R. L., Hileman, S. M., Nestor, C. C., Porter, K. L., Connors, J. M., Hardy, S. L., ... & Lehman, M. N. (2013). Kisspeptin, neurokinin B, and dynorphin act in the arcuate nucleus to control activity of the GnRH pulse generator in ewes. *Endocrinology*, 154(11), 4259-4269.
- Gootwine, E. (2011). *Husbandry of Dairy Animals | Sheep: Reproductive Management*.
- Haenlein, G. F. W. (2001). Past, present, and future perspectives of small ruminant dairy research. *Journal of dairy science*, 84(9), 2097-2115.
- Hafez, E. S. E., Jainudeen, M. R., & Rosnina, Y. (2000). Hormones, growth factors, and reproduction. *Reproduction in farm animals*, 31-54.
- Houghton, J. A. S., Liberati, N., Schrick, F. N., Townsend, E. C., Dailey, R. A., & Inskeep, E. K. (1995). Day of estrous cycle affects follicular dynamics after induced luteolysis in ewes. *Journal of animal science*, 73(7), 2094-2101.
- Hughes, C. K., & Pate, J. L. (2019). Luteolysis and the Corpus Luteum of pregnancy. In *The Ovary* (pp. 269-292). Academic Press.
- Hunter, M. G. (1990). Characteristics and causes of the inadequate corpus luteum. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 43, 91-99
- Inskeep, E. K. (1994). Factors that affect fertility during oestrous cycles with short or normal luteal phases in postpartum cows. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 49, 493-503.
- Jaquez, J. A. M., González, H. S., Moysen, E. D. V., Triana, M., & Gutierrez, J. D. J. E. A. Perfil socioeconomico de los caprinocultores del suroeste del estado de

coahuila méxico. Socioeconomic profile of goat producers in the southwest of coahuila state, mexico.

Karsch, F. J., Bttman, E. L., Foster, D. L., Goodman, R. L., Legan, S. J., & Robinson, J. E. (1984, January). Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. In *Proceedings of the 1983 Laurentian Hormone Conference* (pp. 185-232). Academic Press.

Knight, T. W., Hall, D. R. H., & Smith, J. F. (1988). Effects of immunisation with polyandroalbumin (Fecundin), pasture allowance, post-mating shearing, and method of synchronisation on reproductive performance of Romney and Marshall Romney ewes. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 31(3), 243-247.

Krsmanovic, L. Z., Martinez-Fuentes, A. J., Arora, K. K., Mores, N., Tomić, M., Stojilkovic, S. S., & Catt, K. J. (2000). Local regulation of gonadotroph function by pituitary gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology*, 141(3), 1187-1195.

Kumar, A., & Laxmi, N. A. (2015). Role of IGF 1 in male and female reproduction in bovines: A review. *Asia Pacific Journal of Research*, 1.

Kumar, P., & Sharma, A. (2014). Gonadotropin-releasing hormone analogs: Understanding advantages and limitations. *Journal of human reproductive sciences*, 7(3), 170.

Larson, L. L., & Ball, P. J. H. (1992). Regulation of estrous cycles in dairy cattle: a review. *Theriogenology*, 38(2), 255-267.

Legan, S. J., & Karsch, F. J. (1979). Neuroendocrine regulation of the estrous cycle and seasonal breeding in the ewe. *Biology of reproduction*, 20(1), 74-85.

Lehman, M. N., Coolen, L. M., & Goodman, R. L. (2010). Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology*, 151(8), 3479-3489.

Leyva, V., Buckrell, B. C., & Walton, J. S. (1998). Regulation of follicular activity and ovulation in ewes by exogenous progestagen. *Theriogenology*, 50(3), 395-416.

- Li, Q., Rao, A., Pereira, A., Clarke, I. J., & Smith, J. T. (2011). Kisspeptin cells in the ovine arcuate nucleus express prolactin receptor but not melatonin receptor. *Journal of neuroendocrinology*, 23(10), 871-882.
- Li, Q., Roa, A., Clarke, I. J., & Smith, J. T. (2012). Seasonal variation in the gonadotropin-releasing hormone response to kisspeptin in sheep: possible kisspeptin regulation of the kisspeptin receptor. *Neuroendocrinology*, 96(3), 212-221.
- Limonta, P., Moretti, R. M., Marelli, M. M., & Motta, M. (2003). The biology of gonadotropin hormone-releasing hormone: role in the control of tumor growth and progression in humans. *Frontiers in neuroendocrinology*, 24(4), 279-295.
- Lone, F. A., Malik, A. A., Khatun, A., Shabir, M., & Islam, R. (2016). Returning of cyclicity in infertile Corriedale sheep with natural progesterone and GnRH based strategies. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 5(1), 67-70.
- Lucy, M. (2008). Functional differences in the growth hormone and insulin-like growth factor axis in cattle and pigs: implications for post-partum nutrition and reproduction. *Reproduction in Domestic Animals*, 43, 31-39.
- Malpaux, B., Thiéry, J. C., & Chemineau, P. (1999). Melatonin and the seasonal control of reproduction. *Reproduction Nutrition Development*, 39(3), 355-366.
- Malpaux, B., Viguie, C., Skinner, D. C., Thiery, J. C., Pelletier, J., & Chemineau, P. (1996). Seasonal breeding in sheep: Mechanism of action of melatonin. *Animal reproduction science*, 42(1-4), 109-117.
- Manteca Vilanova, X., De Briyne, N., Beaver, B., & Turner, P. V. (2019). Horse welfare during equine Chorionic Gonadotropin (eCG) production. *Animals*, 9(12), 1053.
- Martinez-Ros, P., & Gonzalez-Bulnes, A. (2019). Efficiency of CIDR-based protocols including GnRH instead of eCG for estrus synchronization in sheep. *Animals*, 9(4), 146.
- Mazerbourg, S., Bondy, C. A., Zhou, J., & Monget, P. (2003). The insulin-like growth factor system: A key determinant role in the growth and selection of ovarian

- follicles? a comparative species study. *Reproduction in Domestic Animals*, 38(4), 247-258.
- Menchaca, A & Rubianes, E. (2014) Sincronización de la ovulación en ovejas y cabras. *Instituto de reproducción animal de Uruguay*.
- Menchaca, A. (2021). Sustainable Food Production: The Contribution of Genome Editing in Livestock. *Sustainability*, 13(12), 6788.
- Menchaca, A., & Rubianes, E. (2004). New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*, 16(4), 403-413.
- Meza-Herrera, C. A. (1987). Análisis estático de la ganadería caprina en ocho ejidos de la Comarca Lagunera. III Reunión Nacional sobre Caprinocultura. *UNAM. Cuautitlán-Izcalli. México*, 74-79.
- Möller-Holtkamp, P. (1980). Conceptal (R) e Iliren (R). Dos nuevas hormonas para combatir los trastornos de la reproducción en los animales. Jornadas de Buiatría. VIII Jornadas Uruguayas. IV Jornadas Latinoamericanas.
- Morgan K, Sellar R, Pawson AJ, Millar RP. 2006. Bovine and ovine gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-II ligand precursors and type II GnRH receptor genes are functionally inactivated. *Endocrinology* 147:5041-5051.
- Naitana, S., & Ledda, S. (2020). Reproductive technologies in sheep. In *Reproductive Technologies in Animals* (pp. 31-54). Academic Press.
- Nestor, C. C., Bedenbaugh, M. N., Hileman, S. M., Coolen, L. M., Lehman, M. N., & Goodman, R. L. (2018). Regulation of GnRH pulsatility in ewes. *Reproduction*, 156(3), R83-R99.
- Olivera-Muzante, J., Gil, J., Viñoles, C., & Fierro, S. (2013). Reproductive outcome with GnRH inclusion at 24 or 36 h following a prostaglandin F2 α -based protocol for timed AI in ewes. *Animal reproduction science*, 138(3-4), 175-179.

Pawson, A. J., & McNeilly, A. S. (2005). The pituitary effects of GnRH. *Animal reproduction science*, 88(1-2), 75-94.

Peters, A. R. (2005). Veterinary clinical application of GnRH—questions of efficacy. *Animal reproduction science*, 88(1), 155-167

Peters, A. R., Ward, S. J., Warren, M. J., Gordon, P. J., Mann, G. E., & Webb, R. (1999). Ovarian and hormonal responses of cows to treatment with an analogue of gonadotrophin releasing hormone and prostaglandin F2 α . *Veterinary record*, 144(13), 343-346.

Pineda, M. H. (2003). Reproductive patterns of sheep and goats. *McDonald's veterinary endocrinology and reproduction*, (Ed. 5), 435-457.

Prieto-Gómez, B., & Velázquez-Paniagua, M. (2002). Fisiología de la reproducción: hormona liberadora de gonadotrofinas. *Rev Fac Med UNAM*, 45(6), 252-257.

[Producción y productos lácteos: Pequeños rumiantes \(fao.org\)](http://fao.org)

Ramos, A. F., & Silva, B. D. M. (2018). Hormonal protocols in small ruminants. *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnología-Capítulo em livro científico (ALICE)*.

Redden, R., & Thorne, J. W. (2020). Reproductive management of sheep and goats. In *Animal Agriculture* (pp. 211-230). Academic Press.

Reiter, R. J., Tan, D. X., Manchester, L. C., Paredes, S. D., Mayo, J. C., & Sainz, R. M. (2009). Melatonin and reproduction revisited. *Biology of reproduction*, 81(3), 445-456.

Robinson, T. J. (1952). Role of progesterone in the mating behaviour of the ewe. *Nature*, 170(4322), 373-374.

Robinson, T. J., Moore, N. W., Lindsay, D. R., Fletcher, I. C., & Salamon, S. (1970). Fertility following synchronization of oestrus in the sheep with intravaginal sponges. I. Effects of vaginal douche, supplementary steroids, time of insemination, and numbers and dilution of spermatozoa. *Australian Journal of Agricultural Research*, 21(5), 767-781.

- Rubianes, E., & Menchaca, A. (2003). The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats. *Animal Reproduction Science*, 78(3-4), 271-287.
- Rubianes, E., Beard, A., Dierschke, D. J., Bartlewski, P., Adams, G. P., & Rawlings, N. C. (1997). Endocrine and ultrasound evaluation of the response to PGF 2 α and GnRH given at different stages of the luteal phase in cyclic ewes. *Theriogenology*, 48(7), 1093-1104.
- Rubianes, E., De Castro, T., & Kmaid, S. (1998). Estrous response after a short progesterone priming in seasonally anestrous goats. *Theriogenology*, 1(49), 356.
- Saleh, M., Shahin, M., Wuttke, W., Gauly, M., & Holtz, W. (2012). Pharmacokinetics of human chorionic gonadotropin after im administration in goats (*Capra hircus*). *Reproduction*, 144(1), 77.
- Salinas-González, H., Flores-Nájera, M. J, Echavarría-Cháirez, F., & Meza-Herrera, C.A. (2013). Investigación Participativa y su Rol en el Desarrollo y la Investigación de Rumiantes Menores en Zonas Áridas de México. La producción de Rumiantes Menores en las Zonas Áridas de Latinoamérica. Editado por Iñiguez-Rojas, L. cap. 11, pág. 249-277.
- Santos-Jimenez, Z., Guillen-Gargallo, S., Encinas, T., Berlinguer, F., Veliz-Deras, F. G., Martinez-Ros, P., & Gonzalez-Bulnes, A. (2020). Use of propylene-glycol as a cosolvent for GnRH in synchronization of estrus and ovulation in sheep. *Animals*, 10(5), 897.
- Santos-Jimenez, Z., Martinez-Herrero, C., Encinas, T., Martinez-Ros, P., & Gonzalez-Bulnes, A. (2020). Comparative efficiency of oestrus synchronization in sheep with progesterone/eCG and progesterone/GnRH during breeding and non-breeding season. *Reproduction in Domestic Animals*, 55(7), 882-884.
- Sarah C. Baumgarten, Carlos Stocco, Granulosa Cells, Editor(s): Michael K. Skinner, *Encyclopedia of Reproduction (Second Edition)*, Academic Press, 2018, Pages 8-13.

- Schally, A. V., Arimura, A., Kastin, A. J., Matsuo, H., Baba, Y., Redding, T. W., ... & White, W. F. (1971). Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones. *Science*, 173(4001), 1036-1038.
- Scudamore, C. L. (1988). Intravaginal sponge insertion technique. *Veterinary Record* (UK).
- SIAP (2020) Recuperado el 28 de julio de 2021 https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/655389/Inventario_2020_capri_no.pdf
https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/655390/Inventario_2020_ovino.pdf
- Simões, J. (2015). Recent advances on synchronization of ovulation in goats, out of season, for a more sustainable production. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 4(2), 157-165.
- Smith, J. T., Clay, C. M., Caraty, A., & Clarke, I. J. (2007). KiSS-1 messenger ribonucleic acid expression in the hypothalamus of the ewe is regulated by sex steroids and season. *Endocrinology*, 148(3), 1150-1157.
- Smith, J. T., Coolen, L. M., Kriegsfeld, L. J., Sari, I. P., Jaafarzadehshirazi, M. R., Maltby, M., ... & Lehman, M. N. (2008). Variation in kisspeptin and RFamide-related peptide (RFRP) expression and terminal connections to gonadotropin-releasing hormone neurons in the brain: a novel medium for seasonal breeding in the sheep. *Endocrinology*, 149(11), 5770-5782.
- Soto, A. T., Gómez, M. V., & Pastorelli, V. R. (2020). Reproducción en pequeños rumiantes. Libros de Cátedra.
- Szeliga, A., Czyzyk, A., Podfigurna, A., Genazzani, A. R., Genazzani, A. D., & Meczekalski, B. (2018). The role of kisspeptin/neurokinin B/dynorphin neurons in pathomechanism of vasomotor symptoms in postmenopausal women: from physiology to potential therapeutic applications. *Gynecological Endocrinology*, 34(11), 913-919.

- Teresa, De castro., Menchaca, A & Rubianes, E. (2014) Sincronización de la ovulación en ovejas y cabras. Instituto de reproducción animal de Uruguay.
- Titi, H. H., Kridli, R. T., & Alnimer, M. A. (2010). Estrus synchronization in sheep and goats using combinations of GnRH, progestagen and prostaglandin F2 α . *Reproduction in domestic animals*, 45(4), 594-599.
- Vázquez-García, V. (2015). Ganado menor y enfoque de género. Aportes teóricos y metodológicos. *Agricultura, sociedad y desarrollo*, 12(4), 515-531.
- Véliz-Deras, F. G., Meza-Herrera, C. A., Mellado, M., Contreras-Villarreal, V., Gaytán-Alemán, L. R., & Guillén-Muñoz, J. M. (2020). The Effect of P4+ eCG Estrus Induction Protocol during the Deep and the Transition Anestrous Period on the Reproductive Performance of Crossbred Dairy Goats. *Biology*, 9(10), 311.
- Vilariño, M., Rubianes, E., & Menchaca, A. (2011). Re-use of intravaginal progesterone devices associated with the Short-term Protocol for timed artificial insemination in goats. *Theriogenology*, 75(7), 1195-1200.
- Viñoles, C., Forsberg, M., Banchemo, G., & Rubianes, E. (2001). Effect of long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. *Theriogenology*, 55(4), 993-1004.
- Viñoles, C., Meikle, A., Forsberg, M., & Rubianes, E. (1999). The effect of subluteal levels of exogenous progesterone on follicular dynamics and endocrine patterns during the early luteal phase of the ewe. *Theriogenology*, 51(7), 1351-1361.
- Wagner, G. C., Johnston, J. D., Clarke, I. J., Lincoln, G. A., & Hazlerigg, D. G. (2008). Redefining the limits of day length responsiveness in a seasonal mammal. *Endocrinology*, 149(1), 32-39.
- Wheaton, J. E., Carlson, K. M., Windels, H. F., & Johnston, L. J. (1993). CIDR: A new progesterone-releasing intravaginal device for induction of estrus and cycle control in sheep and goats. *Animal reproduction science*, 33(1-4), 127-141.
- Wildeus, S. (2000). Current concepts in synchronization of estrus: Sheep and goats. *J. Anim. Sci*, 77, 1-14.

Zúñiga-García, S., Calderón-Leyva, G., & Ota-Salaverri, J. Evaluation of Different eCG Doses+ Progesterone to Induce Reproductive Activity During the Transitional Reproductive Season in Anestrous Creole Goats. *Indian Journal of Animal Research*, 1, 5.