



# Efecto de altas concentraciones de progesterona durante la fase luteal temprana sobre la secreción de LH y estradiol en ovejas\*

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Luis Fernando Uribe-Velásquez<sup>2</sup>, Maria Inês Lenz Souza<sup>3</sup>, Adriana Correa-Orozco<sup>4</sup>

<sup>2</sup>Departamento de Salud Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Caldas, Manizales, Caldas, Colombia.

<sup>3</sup>Departamento de Morfofisiología, Universidad Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS, Campo Grande, Mato grosso do Sul, MG, Brasil.

<sup>4</sup>Maestría en Ciencias Veterinarias, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Caldas, Manizales, Caldas, Colombia.

lfuribe@ucaldas.edu.co

(Recibido: septiembre 11, 2010; aprobado: noviembre 9, 2010)

**RESUMEN:** Se evaluaron los efectos de la progesterona ( $P_4$ ) sobre la endocrinología reproductiva en hembras ovinas. Las ovejas fueron sincronizadas con prostaglandina- $PGF_{2\alpha}$  (PG) y distribuidas aleatoriamente en dos grupos ( $n = 7$ /grupo): grupo-control y grupo tratado con progesterona (CIDR) después de la ovulación (día cero). Desde el día anterior a la aplicación de PG hasta el día 10 después de la ovulación, se realizó monitoreo ecográfico. Diariamente fueron colectadas muestras de sangre para la determinación de las concentraciones plasmáticas de  $P_4$  y estradiol ( $E_2$ ). Para el perfil de los pulsos de la hormona luteinizante (LH), las colectas de sangre se realizaron a intervalos de 30 minutos por un periodo de ocho horas, en los días uno y seis. Las concentraciones de las hormonas fueron determinadas por radioinmunoanálisis. La frecuencia de los pulsos de LH difirió en el primer día del ciclo ( $P < 0,01$ ), con valores de  $2,55 \pm 0,09$  pulsos/8 horas en el grupo-control y de  $1,49 \pm 0,11$  pulsos/8 horas en el grupo tratado. En el sexto día, el grupo-control presentó significativamente ( $P < 0,05$ ) mayor número de pulsos ( $2,20 \pm 0,09$  pulsos/8 horas) que el grupo tratado ( $1,22 \pm 0,11$  pulsos/8 horas). Las medias de las concentraciones plasmáticas de  $P_4$  difirieron entre los grupos ( $P < 0,001$ ), durante la administración de  $P_4$ , en el primer y sexto día del ciclo estral. Además, hubo diferencia significativa ( $P < 0,0001$ ) en las concentraciones de  $E_2$  entre los grupos durante la administración de  $P_4$ . Estos datos sugieren que la progesterona exógena reduce los pulsos de LH.

**Palabras clave:** CIDR, estradiol, LH, ovulación, sincronización

## Effect of high progesterone concentrations during the early luteal phase on LH and estradiol secretion in ewes

**ABSTRACT:** The effects of progesterone ( $P_4$ ) on reproductive endocrinology were studied in ewes. Ewes were synchronized using prostaglandin- $PGF_{2\alpha}$  (PG) and randomly divided in two groups ( $n = 7$ /group): control group and progesterone-treated group (CIDR) after ovulation (day zero). From the day before PG injection until day 10, ultrasonic monitoring was carried out. Blood samples were collected daily to determine plasma concentrations  $P_4$  and estradiol ( $E_2$ ). For the luteinizing hormone (LH) pulses profile, blood samples were collected at 30-min intervals during 8 hours on days one and six. Hormones concentrations were determined by radioimmunoassay. Differences in LH pulse frequency on day one ( $P < 0.01$ ) were observed with values of  $2.55 \pm 0.09$  pulses/8 h in control group and  $1.49 \pm 0.11$  pulses/8 h in treated-group. On day six, the control group showed significantly higher values ( $P < 0.05$ ) for LH pulse frequency ( $2.20 \pm 0.09$  pulses/8h) than the treated-group ( $1.22 \pm 0.11$  pulses/8 h). Mean plasma concentrations of  $P_4$  ( $P < 0.001$ ) were different between groups ( $P < 0,001$ ) during  $P_4$  administration on days one and six of the estrous cycle. Furthermore, there was significant difference ( $P < 0.0001$ ) in  $E_2$  plasma concentrations among groups during  $P_4$  administration. These data suggest that hexogen progesterone reduces LH pulse.

**Key words:** CIDR, estradiol, LH, ovulation, synchronization

\* Financiado por la FAPESP – São Paulo – Brasil.

## Introducción

El desempeño reproductivo es un factor importante que afecta el rendimiento tanto de la producción de carne como de leche en rumiantes (González-Bulnes et al., 2005). La inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) es una herramienta útil para mejorar la eficiencia de los programas de reproducción animal (Menchaca et al., 2007). Los tratamientos tradicionales para IATF consisten en una exposición larga a progestágenos asociada con una aplicación de gonadotropina coriónica equina (eCG) administrada al final del tratamiento (Menchaca et al., 2007). La manipulación de las concentraciones circulantes de progesterona ( $P_4$ ) permite la regulación del estro y de la ovulación (Leyva et al., 1998). Por otro lado, el estradiol ( $E_2$ ) y la  $P_4$  tienen una influencia sobre la secreción de LH y FSH, posiblemente por modificar la secreción de GnRH hipotalámica o por efecto directo sobre la respuesta a la GnRH de las células secretoras de gonadotropinas de la pituitaria anterior (Nett et al., 2002). Durante la fase luteal del ciclo estral, la  $P_4$  secretada por el cuerpo lúteo inhibe tanto la síntesis como la secreción pulsátil de LH, así como también el pico preovulatorio inducido por  $E_2$  (Skinner et al., 2000). Esto además, indica su posible importancia como mecanismo fundamental para regular el momento óptimo de la ovulación en las hembras mamíferas (Richter et al., 2002). La liberación pulsátil de LH disminuye rápidamente después del tratamiento con progestágenos elevados (Rhodes et al., 2003), siendo esta variable la que refleja el comportamiento de la hormona. El objetivo de este estudio fue determinar, por medio de radioinmunoanálisis (RIA), el efecto de la  $P_4$  exógena en la concentración plasmática de LH y de las hormonas esteroidales ( $P_4$  y  $E_2$ ) en ovejas Bergamacia.

## Materiales y Métodos

El trabajo experimental fue desarrollado en el Departamento de Reproducción Animal y Radiología Veterinaria, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia/UNESP-Botucatu, São

Paulo, Brasil. Se utilizaron 14 hembras ovinas de la raza Bergamacia durante la estación reproductiva, con peso corporal medio de  $60,42 \pm 8,16$  y de  $61,56 \pm 6,54$  kg para los tratamientos 1 (control) y 2 (CIDR), respectivamente, y con edades medias de  $4,5 \pm 1,2$  y de  $4 \pm 0,9$  años en el mismo orden de citación. Los animales, previamente examinados en cuanto a estado clínico general, sanitario y reproductivo, fueron mantenidos en cajas de 3 x 3 m, bajo luminosidad natural.

Sometidas a un período pre-experimental de un mes, para adaptación a la alimentación y a la estabulación, las ovejas fueron inicialmente pesadas y alimentadas con ración concentrada (20% de proteína bruta y 5% de fibra bruta) y heno de *Cynodon dactylon* (L.) Pers. cv. "coast-cross" (5% de proteína bruta y 35,9% de fibra bruta, en la materia seca). La cantidad formada fue de 1,5 kg/cabeza/día de ración concentrada y 2,0 kg/cabeza/día de heno y mezcla mineral y agua a voluntad.

En todas las ovejas se administraron vía intramuscular dos dosis de un análogo sintético de prostaglandina-PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , 125  $\mu$ g (Ciosin®)<sup>15</sup>, con intervalo de siete días, durante la mitad de la fase lútea, para la sincronización del estro. Posteriormente, fueron distribuidas aleatoriamente en dos grupos: grupo-control (n = 7) y grupo tratado (n = 7) con un dispositivo intravaginal (CIDR, Controlled internal drug release, AHI Plastic Moulding Company, Hamilton, Nueva Zelanda) conteniendo 0,3 g de progesterona, insertado después de la ovulación (6-10 horas).

Desde el día anterior a la aplicación de la segunda dosis de PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  hasta el 10° día del ciclo, las ovejas fueron monitoreadas por medio de ecografía. El día de la ovulación (día cero) fue definido como el momento de desaparición del mayor folículo ( $\geq 5$  mm). Las ovejas en posición de estación fueron monitoreadas por medio de ecógrafo provisto de un transductor linear prostático (SSD-500 e UST- 660-7,5, Aloka Co., Ltda. - Tokio, Japón).

<sup>15</sup> Cloprostenol, Mallinckrodt Veterinary - São Paulo, Brasil.

El cuerpo lúteo fue observado desde el tercer día después de la ovulación, siendo monitoreado y mapeado diariamente.

Las muestras de sangre fueron tomadas por venopunción yugular siempre a las 8 h, desde el día anterior a la aplicación de prostaglandina y durante todo el período experimental. Para la cuantificación de LH se colectaron en tubos heparinizados 17 muestras de sangre en el primero y sexto día del ciclo estral, durante ocho horas seguidas, en intervalos de 30 minutos para definir su amplitud y frecuencia. Las muestras fueron centrifugadas a 1000 g durante 15 minutos, el plasma almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  y usado para la determinación de  $\text{P}_4$ ,  $\text{E}_2$  y de LH.

Las concentraciones plasmáticas de  $\text{P}_4$  fueron determinadas por radioinmunoanálisis (RIA), utilizando *kits* comerciales Coat-A-Count (*Diagnostic Products Corporation*, Los Angeles, EUA) en fase sólida. La sensibilidad del ensayo para  $\text{P}_4$  fue de 0,1 ng/ml.

Para la concentración plasmática de  $\text{P}_4$ , fueron utilizados tres controles intra-ensayo con baja ( $0,41 \pm 0,02$  ng/ml), media ( $2,27 \pm 0,10$  ng/ml) y alta ( $5,97 \pm 0,13$  ng/ml) concentración de  $\text{P}_4$ . Los coeficientes de variación inter-ensayo fueron: 10,5% ( $0,38 \pm 0,04$  ng/ml), 2,2% ( $2,31 \pm 0,05$  ng/ml) y 2,3% ( $6,07 \pm 0,14$  ng/ml) para  $\text{P}_4$ , en el mismo orden de citación anterior. En la determinación de LH, se utilizó el procedimiento recomendado por Forsberg et al. (1993), usando un anticuerpo monoclonal (Mab 518B7), con sensibilidad mínima de 0,3  $\mu\text{g/L}$ . El pulso fue definido como la mayor concentración observada en comparación con la media más un desvío patrón. Para la dosificación de LH fueron realizados dos ensayos, que presentaron coeficientes de variación intra-ensayo de 7,4% ( $2,39 \pm 0,29$   $\mu\text{g/L}$ ), 2,7% ( $4,37 \pm 0,03$   $\mu\text{g/L}$ ) y 19,6% ( $7,6 \pm 0,14$   $\mu\text{g/L}$ ) e inter-ensayo de 7,1% ( $2,42 \pm 0,04$   $\mu\text{g/L}$ ), 13,4% ( $4,26 \pm 0,16$   $\mu\text{g/L}$ ) y 17% ( $6,4 \pm 1,7$   $\mu\text{g/L}$ ), siempre en el orden citado.

En la determinación de  $\text{E}_2$  fueron utilizados *kits* comerciales Coat-A-Count (*Diagnostic Products*

*Corporation*, Los Angeles, CA, USA) en fase sólida, en contador gama Cobra. La sensibilidad del ensayo fue de 8 pg/ml. Los coeficientes de variación intra-ensayo e inter-ensayo para el estradiol fueron de 19 y 22%, respectivamente.

Los efectos de los tratamientos sobre las concentraciones de  $\text{P}_4$ ,  $\text{E}_2$  y de LH fueron determinados por el análisis de medidas repetidas, utilizando el *Statistical Analysis System* (Latour & Littell, 1996). Las concentraciones basales de LH y la amplitud de los pulsos fueron transformadas en raíz cuadrada. Para el análisis de la frecuencia de los pulsos, los valores fueron transformados en Log. Para los efectos fijos (tratamiento, día, tratamiento x día), fue utilizado el test F, y para las comparaciones múltiples de las medias, se usó la prueba de Tukey-kramer.

## Resultados y Discusión

El intervalo desde la manifestación del estro hasta la ovulación fue de 56 horas en los dos grupos experimentales. Las concentraciones plasmáticas basales de LH en el primer (día cero = ovulación) y sexto día del ciclo estral (Tabla 1) no fueron diferentes entre los grupos control y tratado con  $\text{P}_4$  exógena ( $P > 0,05$ ). Las concentraciones plasmáticas de LH fueron bajas durante la fase luteal del ciclo estral, lo que coincide con lo relatado por Smith et al. (1995). Asimismo, Haresign et al. (1995) encontraron durante la fase luteal una concentración media de LH de 0,51  $\mu\text{g/L}$ .

La amplitud de los pulsos de LH no fue diferente ( $P > 0,05$ ) entre los grupos control y tratado con  $\text{P}_4$  en el primer y sexto día del ciclo estral. Sin embargo, la  $\text{P}_4$  exógena ejerció una significativa ( $P < 0,05$ ) disminución en la amplitud del pulso en el primer día, en comparación con aquella provocada en el sexto día. La amplitud de los pulsos fue similar a la verificada por Montgomery et al. (1993) y Currie et al. (1993). Norris et al. (1989), no constataron cambio alguno en la amplitud del pulso entre las diferentes fases del ciclo estral. Los cambios observados en la

amplitud de los pulsos son, principalmente, un reflejo de la intensa actividad de los esteroides sexuales (Goodman & Karsch, 1980). Goodman et al. (1982) observaron que la acción principal de  $P_4$  es en el hipotálamo, disminuyendo la frecuencia de los pulsos y aumentando su amplitud. Sin embargo, la sinergia existente entre  $P_4$  y  $E_2$  puede haber ejercido cambios significativos en la amplitud de la hormona. Según lo propuesto por Goodman et al. (1981), respecto a los efectos de  $P_4$  y  $E_2$  sobre la secreción de LH, la asociación de las hormonas esteroideas refleja, en parte, el aumento de la sensibilidad del sistema nervioso central a la retroalimentación negativa de  $P_4$ .

La frecuencia de los pulsos de LH fue estadísticamente diferente ( $P < 0,01$ ), entre los dos grupos de animales en el primer y sexto día del ciclo estral (Tabla 1). Se verificó que el dispositivo de  $P_4$  generó aumentos en las concentraciones plasmáticas de  $P_4$ , característicos de la fase luteal, con alteración de la frecuencia pulsátil de LH. Además, se constató una relación inversa entre los niveles en plasma de  $P_4$  y la frecuencia de los pulsos de LH, en el primer y sexto día del ciclo estral. Seekallu et al. (2009) encontraron que en ovejas tratadas con implantes de  $P_4$  entre el día 4 y

14 después de la ovulación, la frecuencia del pulso de LH en el día 10 fue más baja en comparación con ovejas del grupo control. La frecuencia pulsátil obtenida en el primer día mostró valores semejantes a los presentados por Haresign et al. (1995), quienes hallaron una media durante la fase luteal de 1,96 pulsos/10 horas. La frecuencia de los pulsos encontrada en el sexto día se aproximó a la observada por Montgomery et al. (1993) y Downing et al. (1997). Las frecuencias del primer y sexto día en el grupo tratado con la  $P_4$  exógena, fueron semejantes a los valores obtenidos por Leyva et al. (1998) en ovejas Suffolk. En el presente trabajo, la frecuencia de los pulsos de LH monitoreados cada 30 minutos fue suficiente para caracterizar la dinámica pulsátil de LH en la sangre durante la fase luteal del ciclo estral. Por lo tanto, se evidenciaron cambios significativos en la frecuencia de los pulsos después de la ovulación, con un aumento en el inicio de la fase luteal y disminución en la mitad del ciclo. Resultados semejantes fueron obtenidos por Campbell et al. (1990a), Scaramuzzi et al. (1993) y Tsukamura (1998), los cuales anotaron que la frecuencia de los pulsos, además de su amplitud, son variables que dependen de la fase del ciclo estral.

**Tabla 1.** Medias  $\pm$  EP de las concentraciones basales plasmáticas ( $\mu\text{g/L}$ ), amplitud ( $\mu\text{g/L}$ ) y frecuencia de los pulsos (pulsos/8 horas) de hormona luteinizante (LH) en el primero y sexto días del ciclo estral en hembras ovinas Bergamacia (día cero = ovulación).

| Día del ciclo estral | Grupo   | Concentración basal ( $\mu\text{g/L}$ ) | Amplitud de los pulsos ( $\mu\text{g/L}$ ) | Frecuencia de los pulsos (pulsos/8 h) |
|----------------------|---------|---|--|---------------------------------------|
| 1                    | Control | 0,66 $\pm$ 0,11 $a$                     | 0,33 $\pm$ 0,30 $a$                        | 2,55 $\pm$ 0,09 $a$                   |
|                      | Tratado | 0,56 $\pm$ 0,27 $a$                     | 0,42 $\pm$ 0,21 $a$                        | 1,490,11 $b$                          |
| 6                    | Control | 0,68 $\pm$ 0,11 $A$                     | 0,87 $\pm$ 0,30 $A$                        | 2,200,09 $A$                          |
|                      | Tratado | 0,58 $\pm$ 0,27 $A$                     | 0,70 $\pm$ 0,21 $A$                        | 1,22 $\pm$ 0,11 $B$                   |

Letras minúsculas diferentes en la columna son estadísticamente significativas ( $P < 0,01$ ).  
 Letras mayúsculas diferentes en la columna son estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ).

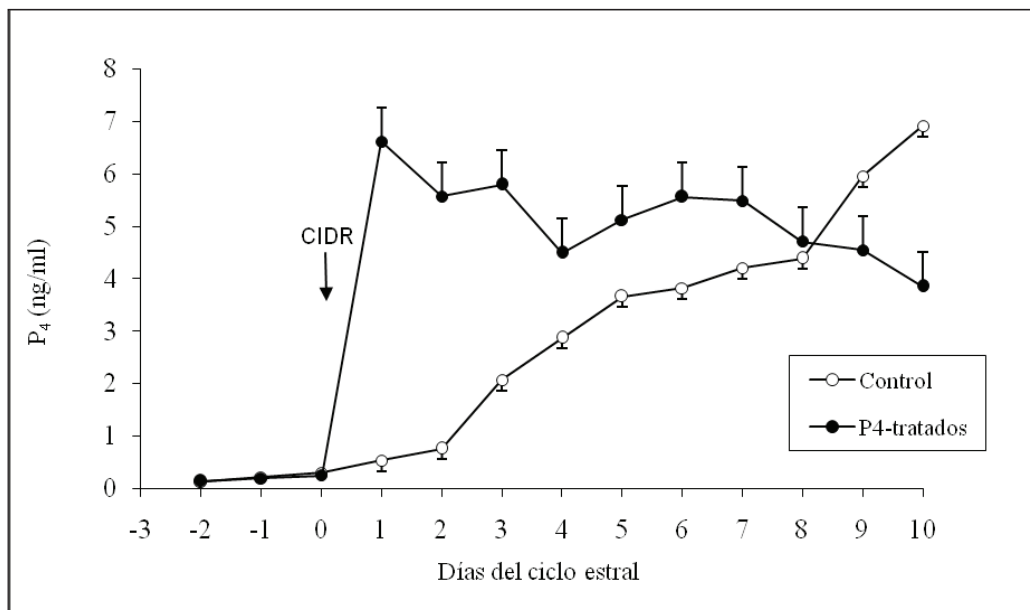
En el trabajo realizado por Sánchez et al. (1995), las dosis de progestágenos que pueden modular la secreción de LH y E<sub>2</sub>, de manera semejante a los efectos de P<sub>4</sub> durante la mitad de la fase luteal, pueden también estar ligados al tamaño y condición corporal de las hembras del estudio. En relación a esto, Kojima et al. (2003) en vacas de carne, observaron en el grupo de hembras tratadas con la mitad de un dispositivo intravaginal de liberación de progesterona (PRID) una mayor frecuencia de pulsos de LH los días 12, 17 y 21 del ciclo estral en comparación con las hembras tratadas con dos PRID. Asimismo, Kim et al. (2003) en cabras Shiba ovariectomizadas, concluyeron que los niveles subluteales de P<sub>4</sub> alrededor de 1 ng/ml suprimen completamente el pico de LH pero no tienen efecto inhibitorio sobre la frecuencia pulsátil de la LH.

En este sentido, existe clara evidencia en los rumiantes de que la P<sub>4</sub> inhibe la frecuencia de pulso de LH, y que el estradiol actúa principalmente para inhibir la amplitud de pulso de LH, a pesar de que puede ocurrir una cierta sinergia entre esas dos hormonas (Price, 1999).

Las concentraciones de P<sub>4</sub> en el plasma no fueron diferentes entre los grupos control y tratado

en los días -2 y -1 antes de la ovulación, con valores medios de 0,12±0,01 y 0,14±0,01 ng/ml y 0,21±0,01 y 0,19±0,01 ng/ml, respectivamente (Figura 1). Estos hallazgos son semejantes a los de Campbell et al. (1990a), Scaramuzzi et al. (1993) y Ali et al. (2009), quienes observaron valores por debajo de 1 ng/ml a través de la fase folicular hasta la ovulación, dos a tres días más tarde. Los valores de las concentraciones de P<sub>4</sub> antes de la ovulación fueron inferiores a los reportados por Uribe-Velásquez et al. (2008).

Las hembras ovinas control presentaron concentraciones circulantes de P<sub>4</sub> bajas en el primer día después ovulación (0,53±0,17 ng/ml), con un aumento en el tercer día (2,070,17 ng/ml). Las concentraciones aumentaron progresivamente desde el quinto día (3,66±0,17 ng/ml) hasta el décimo día (6,91±0,17 ng/ml), el cual evidenció una diferencia estadística (P<0,001) entre los días del ciclo estral estudiados (Figura 1). De esta forma, los resultados obtenidos en el grupo control están de acuerdo con las observaciones realizadas por Oyedipe et al. (1989), Norris et al. (1989), González-Reyna et al. (1991) en ovejas y Menchaca et al. (2002) en cabras. Valores menores para P<sub>4</sub> plasmática fueron reportados por Schrick et al. (1993).

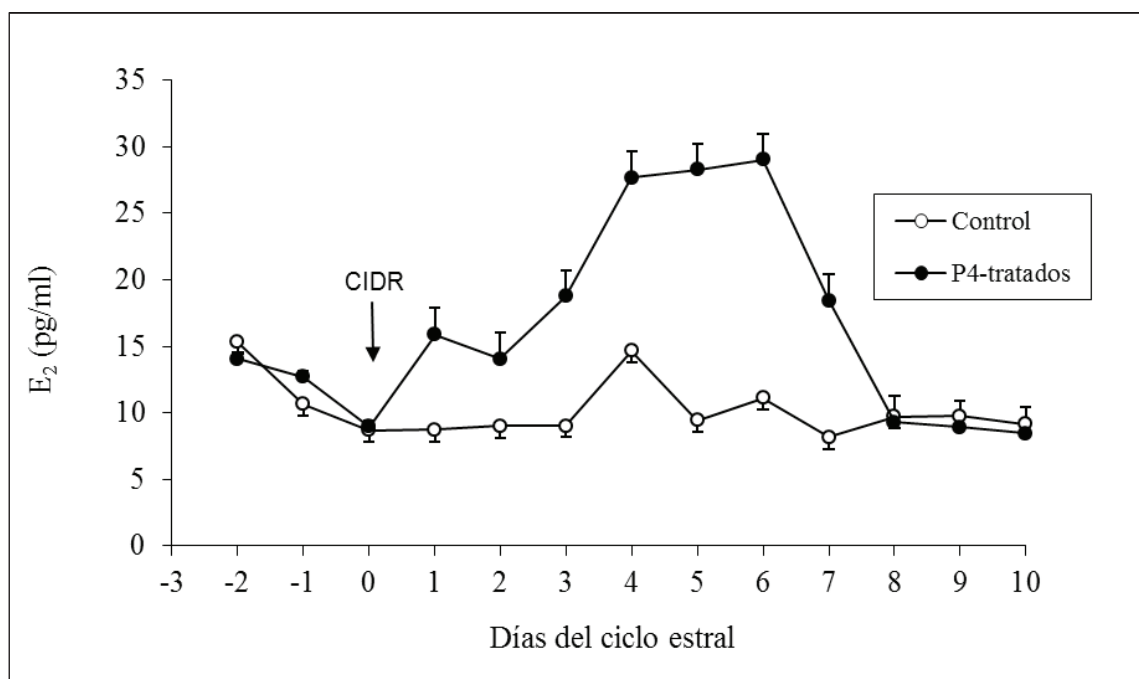


**Figura 1.** Concentraciones plasmáticas de progesterona (medias ± EP) en hembras ovinas Bergamacia (día cero = ovulación).

Hubo diferencia ( $P < 0,001$ ) en las concentraciones plasmáticas de  $P_4$  entre los tratamientos, durante el período de administración de  $P_4$  exógena. Del mismo modo, se evidenció también diferencia en los días ( $P < 0,001$ ) y en la interacción tratamiento y día ( $P < 0,0001$ ). En las hembras control, las concentraciones plasmáticas de  $P_4$  presentaron valores medios de  $0,30 \pm 0,02$  ng/ml y  $3,82 \pm 0,17$  ng/ml en el cero y sexto día del ciclo estral, respectivamente. Sin embargo, en las ovejas tratadas con la  $P_4$  exógena, las concentraciones de  $P_4$  en el día cero del ciclo estral fueron de  $0,25 \pm 0,02$  ng/ml, aumentado hasta  $5,56 \pm 0,56$  ng/ml en el sexto día del ciclo estral. Resultados similares fueron reportados por Seekallu et al. (2009), quienes encontraron valores de progesterona sérica más altos en ovejas tratadas con implantes de  $P_4$  en comparación con las hembras control ( $5,280,8$  ng/ml vs.  $2,550,4$  ng/ml), entre los días 4 y 14 después de la ovulación. Por el contrario, en cabras tratadas con  $P_4$  exógena, las concentraciones de  $P_4$  en la fase luteal temprana (día cero) fueron más altas, con un valor de  $2,1 \pm 0,7$  ng/ml (Menchaca et al., 2007).

La  $P_4$  exógena proporcionada por el CIDR ejercería un efecto de retroalimentación negativa que inhibe la liberación de GnRH desde el hipotálamo y la hipófisis, lo cual regula la liberación de las gonadotropinas, principalmente de LH (Martin, 1984; Mihm et al., 1996), que desencadenaría aumentos significativos en las concentraciones plasmáticas de  $P_4$ . Estos hallazgos concordaron con los estudios de Hamra et al. (1986) y Rubianes et al. (1996).

Las concentraciones de  $E_2$  en el plasma no fueron diferentes entre los grupos control y el tratado con  $P_4$  antes de ovulación, las cuales presentaron un pico en el día -2 de  $15,32 \pm 0,88$  y  $14,06 \pm 1,97$  pg/ml, que disminuyó luego en el día -1 a valores de  $10,66 \pm 0,88$  y  $12,69 \pm 1,97$  pg/ml, respectivamente, para los dos grupos experimentales (Figura 2). Los resultados obtenidos fueron semejantes a los de Thomas et al. (1988) y Campbell et al. (1990b). Aumentos en las concentraciones plasmáticas de  $E_2$  antes de la ovulación fueron encontrados también por Ravindra et al. (1994). En este sentido, Campbell et al. (1990b) determinaron que cada pulso de LH era seguido por un aumento en las secreciones de  $E_2$  y de androstenediona.



**Figura 2.** Concentraciones plasmáticas de estradiol (medias  $\pm$  EP) en hembras ovinas Bergamacia (día cero = ovulación).

En los animales control, el  $E_2$  plasmático se mantuvo bajo en el inicio y mitad de la fase lútea. El patrón de secreción mostró un valor medio de  $8,66 \pm 0,88$  pg/ml en el día de la ovulación, con dos aumentos en el cuarto ( $14,67 \pm 0,88$  pg/ml) y en el sexto día ( $11,11 \pm 0,88$  pg/ml) del ciclo estral, mostrando que hubo una diferencia estadística significativa ( $P < 0,0001$ ) entre los días, durante la fase luteal del ciclo estral, lo que refleja posiblemente el incremento en la actividad folicular. En un estudio que evaluó las concentraciones séricas de estradiol en ovejas, se encontró una concentración de  $4,59 \pm 0,7$  pg/ml entre los días 7 y 11 después de la ovulación (Seekallu et al., 2009). Menchaca et al. (2002) reportaron en cabras sometidas a condiciones similares, una media de las concentraciones séricas de estradiol entre los días 3 y 5 (día cero = ovulación) de  $4,4 \pm 0,9$  pg/ml y  $1,6 \pm 0,2$  pg/ml, para hembras con tres y cuatro ondas foliculares, respectivamente.

Previas investigaciones desarrolladas en bovinos por Badinga et al. (1992), indicaron que las concentraciones plasmáticas de  $E_2$  son elevadas en el quinto día del ciclo estral, hecho que coincide con aumentos en la actividad de la aromataza de los folículos dominantes. La disminución en las concentraciones foliculares de  $E_2$  en los días ocho y 12 del ciclo estral fue asociada con la caída paralela de las concentraciones foliculares de androstenediona. Por lo tanto, esa reducción podría estar relacionada con el substrato disponible, en este caso, los andrógenos.

Las concentraciones de  $E_2$  aumentaron después de la regresión luteal en asociación con el crecimiento del folículo dominante. También fueron constatadas por Scaramuzzi et al. (1993), y Schrick et al. (1993), elevaciones en las concentraciones de  $E_2$  plasmático en los días tres a ocho.

Por otro lado, Schrick et al. (1993) demostraron que, además del aumento significativo en los días tres o cuatro del ciclo, fueron verificados otros dos aumentos significativos en los días seis a nueve, y 11 a 15, lo que sugiere que pueden

ser constatados tres aumentos significativos en las concentraciones plasmáticas de  $E_2$  durante la fase lútea del ciclo estral ovino. Este mecanismo también fue observado por Campbell et al. (1990b), los cuales indicaron que el incremento de  $E_2$  en la sangre después de la luteólisis puede ser atribuido, en parte, a los efectos directos de LH en su secreción durante la fase luteal, sumado a emergencia de folículos grandes estrogénicos en las 10 horas siguientes a inducción de la luteólisis. Por lo tanto, aunque la secreción de  $E_2$  en respuesta al LH sea un marcador de la capacidad esteroidogénica de los folículos grandes, no necesariamente refleja las concentraciones del esteroide en la circulación periférica (Souza et al., 1996). En el presente experimento, las concentraciones medias de  $E_2$  fueron significativamente mayores durante el crecimiento, en comparación con aquellas encontradas durante la fase estática y en la fase de regresión del folículo dominante de la primera onda folicular.

Así, la gran variabilidad en la secreción de  $E_2$  verificada, es compatible con los diferentes estadios de desarrollo de los folículos antrales a través de la fase luteal, al presentar reducción de la secreción de  $E_2$  en el día 10 de la fase luteal, como resultado probablemente de la habilidad secretoria de los folículos en los diferentes estadios de maduración y al control gonadotrófico de la misma, sumados a la disminución de la frecuencia de los pulsos de LH (Campbell et al., 1990a, b).

Las concentraciones plasmáticas de  $E_2$  en la sangre, están de acuerdo con las observaciones de Kaneko et al. (1991) en bovinos, siendo esta secreción estimulada por la liberación pulsátil de LH y su acción en el folículo dominante (Campbell et al., 1990a; Schrick et al., 1993).

El perfil de  $E_2$  en los animales control fue más alto que el descrito por Joseph & Rawlings (1990). Ya la secreción de androstenediona, recibe una significativa contribución de los folículos pequeños (Souza et al., 1996).

Posiblemente, según Campbell et al. (1990a), los cambios observados en los patrones de la secreción de  $E_2$  sean debidos a las diferentes capacidades de la secreción de los folículos en los diferentes estadios de maduración y en su control gonadotrófico. También fue destacado, por Tsonis et al. (1984) en ovejas, que la actividad de la aromatasas es menor en los folículos que presentan avanzado estadio atrésico, por lo cual se llega a la conclusión de que los folículos grandes contienen baja actividad en los estadios más avanzados de la atresia.

Hubo diferencia significativa ( $P < 0,0001$ ) en las concentraciones plasmáticas de  $E_2$  entre los tratamientos, durante el período de administración de  $P_4$  exógena y también en los días ( $P < 0,0001$ ), y en la interacción entre tratamiento y momentos ( $P < 0,0001$ ). Las hembras ovinas tratadas con la  $P_4$  exógena en el día de la ovulación, presentaron altas concentraciones plasmáticas de  $E_2$  después la inserción del CIDR (Figura 2), las cuales fueron de  $15,89 \pm 1,97$  pg/ml en el primer día del ciclo estral, alcanzando valores de  $28,28 \pm 1,87$  pg/ml en el quinto día, a partir del cual las concentraciones plasmáticas disminuyeron. Por el contrario, Seekallu et al. (2009) no hallaron diferencias en las concentraciones séricas de estradiol entre ovejas tratadas con implantes de  $P_4$  y el grupo control, durante los días 4 a 14 después de la ovulación.

Por otro lado, en cabras tratadas con  $P_4$  exógena durante 16 días, los niveles de estradiol 48 horas antes del retiro de la  $P_4$  correspondieron a  $4,2 \pm 0,4$  pg/ml (Fernández-Moro et al., 2008). En hembras bovinas tratadas con dosis de  $P_4$  o progestágenos sintéticos, usados comercialmente en la sincronización del ciclo estral, se originan mayores concentraciones circulantes de  $E_2$ , las cuales parecen ser provenientes del desarrollo de folículos ovarianos persistentes (Wherman et al., 1993). Sin embargo, estos aumentos circulantes de  $E_2$  en el plasma, presentes en el desarrollo de los folículos ováricos persistentes, pueden ser consecuencia de la liberación de LH en frecuencia semejante a aquella descrita durante la fase folicular del ciclo estral bovino (Kinder

et al., 1991). El aumento en las concentraciones plasmáticas de  $E_2$  después de la inserción del CIDR intravaginal, está de acuerdo con los resultados obtenidos en el trabajo de Wherman et al. (1993) en vacas, quienes relataron un incremento en las concentraciones de  $E_2$  en los dos días siguientes al inicio del tratamiento con el dispositivo de  $P_4$ . Estos autores observaron que el dispositivo provocó aumentos en las concentraciones plasmáticas de  $P_4$ , características de la fase luteal, alterando la secreción de LH y la actividad folicular.

Los resultados obtenidos para las concentraciones plasmáticas de  $E_2$ , coincidieron con los valores encontrados por Johnson et al. (1996), quienes anotaron que las altas concentraciones plasmáticas de  $E_2$  antes de la cobertura interfieren con la fertilización y el transporte espermático. Según Kinder et al. (1996), se puede presentar reducción de la fertilidad, como resultado del avanzado estadio de desarrollo de los oocitos en el momento de la ovulación, y/o mortalidad embrionaria originada del desajuste uterino o cambios en el oviducto, durante la primera semana siguiente a la fertilización.

En esa mismo sentido, Custer et al. (1994) reportaron en bovinos que la manutención de las concentraciones plasmáticas de  $P_4$ , sea con un PRID, CIDR, CIDR-B o *norgestomet*, en la ausencia de un cuerpo lúteo activo, origina elevación de las concentraciones plasmáticas de  $E_2$ , con la consecuente reducción de la tasa de concepción. De acuerdo con Sánchez et al. (1995), el uso de *norgestomet* (6 mg) en hembras bovinas desencadenó mayores concentraciones de  $E_2$  plasmático en comparación con los animales control con cuerpo lúteo presente. Los mismos autores, observaron aumentos en las concentraciones de  $E_2$  al final del tratamiento, en hembras que presentaban dos dispositivos con *norgestomet*. Además de eso, sugirieron que las dosis de progestágenos que pueden modular la secreción de LH y  $E_2$ , de manera semejante a los efectos de  $P_4$  durante a mitad de la fase luteal, dependen del tamaño y condición corporal de las hembras bovinas en estudio.



El aumento en la liberación de los pulsos de LH en bovinos, según Kinder et al. (1996), es el factor primario para el desarrollo de folículos ovarianos que permanecen por más tiempo al usar progestágenos. Así, fueron observados, durante el crecimiento de la primera onda folicular en las hembras ovinas, mayores concentraciones de E<sub>2</sub> circulante, momento en el cual se encuentran folículos en crecimiento.

Aun en la literatura consultada, se observó que el desarrollo y selección del folículo antral en hembras ovinas es un proceso multifactorial complejo con diferentes niveles de control. El primer control, es hecho por las gonadotrofinas dentro de la hipófisis, al modular el desarrollo del folículo ovulatorio. El segundo, es la producción de factores por el folículo ovulatorio, que inhiben el desarrollo de la población folicular a través de los mecanismos dependientes de gonadotrofinas. Y el último, es el conjunto de eventos intrafoliculares, que aumentan o disminuyen los efectos gonadotróficos para estimular el crecimiento y diferenciación celular dentro del folículo ovulatorio (Campbell et al., 1990a).

### Conclusiones

La progesterona exógena reduce los pulsos de LH en hembras ovinas Bergamacia. Los patrones de comportamiento de las concentraciones plasmáticas de E<sub>2</sub> observadas en la presente investigación están estrechamente ligados a los cambios de la población folicular durante el ciclo estral, lo que puede estar relacionado también con la variación de los niveles de estimulación gonadotrófica.

### Referencias Bibliográficas

- Ali, A.; Hayder, M.; Saifelnaser, E.O.H. Ultrasonographic and endocrine evaluation of three regimes for oestrus and ovulation synchronization for sheep in the subtropics. **Reproduction in Domestic Animals**, v.44, p.873-878, 2009.
- Badinga, L.; Driancourt, M.A.; Savio, J.D. et al. Endocrine and ovarian response associated with the first-wave dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v.47, p.871-883, 1992.
- Campbell, B.K.; Mann, G.E.; McNeilly, A.S. et al. The pattern of ovarian inhibin, estradiol, and androstenedione secretion during the estrous cycle of the ewe. **Endocrinology**, v.127, p.227-235, 1990a.
- Campbell, B.K.; Mann, G.E.; McNeilly, A.S. et al. Pulsatile secretion of inhibin, oestradiol and androstenedione by the ovary of the sheep during the oestrus cycle. **Journal of Endocrinology**, v.126, p.385-393, 1990b.
- Currie, W.D.; Medhamurthy, R.J.; Cook, S.J. et al. Seasonal fluctuation in diurnal rhythms of luteinizing hormone secretion in ewes during the mid-luteal phase of the oestrus cycle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.97, p.71-74, 1993.
- Custer, E.E.; Beal, W.E.; Wilson, S.J. et al. Effect of melengestrol acetate (MGA) or progesterone-releasing intravaginal device (PRID) on follicular development, concentrations of estradiol-17 $\beta$  and progesterone, and luteinizing hormone release during an artificially lengthened bovine estrous cycle. **Journal of Animal Science**, v.72, p.1282-1289, 1994.
- Downing, J.A.; Joss, J.; Scaramuzzi, R.J. Ovulation rate and the concentrations of LH, FSH, GH, prolactin and insulin in ewes infused with tryptophan, tyrosine or tyrosine plus phenylalanine during the luteal phase of the oestrus cycle. **Animal Reproduction Science**, v.45, p.283-297, 1997.
- Fernández-Moro, D.; Veiga-López, A.; Ariznavarreta, C. et al. Preovulatory follicle development in goats following oestrous synchronization with progestagens or prostaglandins. **Reproduction in Domestic Animals**, v.43, p.9-14, 2008.
- Forsberg, M.; Tagle, R.; Madej, A. et al. Radioimmunoassay of bovine, ovine and porcine luteinizing hormone with a monoclonal antibody and a human tracer. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.34, p.255-262, 1993.
- González-Bulnes, A.; Veiga-López, A.; García, P. et al. Effects of progestagens and prostaglandin analogues on ovarian function and embryo viability in sheep. **Theriogenology**, v.63, p.2523-2534, 2005.

- González-Reyna, A.; Valencia, M.J.; Foote, W.C. et al. Hair sheep in México: reproduction in the Pelibuey sheep. **Animal Breeding Abstracts**, v.59, p.509-524, 1991.
- Goodman, R.L.; Bittman, E.L.; Foster, D.L. et al. The endocrine basis of the synergistic suppression of luteinizing hormone by estradiol and progesterone. **Endocrinology**, v.109, p.1414-1417, 1981.
- Goodman, R.L.; Bittman, E.L.; Foster, D.L. et al. Alterations in the control of luteinizing hormone pulse frequency underline the seasonal variation in estradiol negative feedback in the ewe. **Biology of Reproduction**, v.27, p.580-589, 1982.
- Goodman, R.L.; Karsch, F.J. Pulsatile secretion of luteinizing hormone: Differential suppression by ovarian steroids. **Endocrinology**, v.107, p.1286-1290, 1980.
- Hamra, A.H.; Massri, Y.G.; Marcek, J.M. et al. Plasma progesterone levels in ewes treated with progesterone-controlled drug-release dispenser, implants and sponges. **Animal Reproduction Science**, v.11, p.187-194, 1986.
- Haresign, W.; Cooper, A.C.; Khalid, M. et al. Patterns of gonadotropin secretion in cyclic Finn ewes selected for low and again high ovulation rate. **Animal Science**, v.61, p.251-257, 1995.
- Johnson, S.K.; Dailey, R.A.; Inskeep, E.K. et al. Effect of peripheral concentrations of progesterone on follicular growth and fertility in ewes. **Domestic Animal Endocrinology**, v.13, p.69-79, 1996.
- Joseph, I.B.J.K.; Rawlings, N.C. Infusion of estradiol during the luteal phase of the estrous cycle in the ewe completely eliminates LH pulses. **Canadian Journal of Animal Science**, v.70, p.1147-1150, 1990.
- Kaneko, H.; Terada, T.; Taya, T. et al. Ovarian follicular dynamics and concentrations of oestradiol-17 $\beta$ , progesterone, luteinizing hormone and follicle stimulating hormone during the periovulatory phase of the oestrus cycle in the cow. **Reproduction, Fertility and Development**, v.3, p.529-535, 1991.
- Kim, S.; Tanaka, T.; Kamomae, H. Different Effects of Subnormal Levels of Progesterone on the Pulsatile and Surge Mode Secretion of Luteinizing Hormone in Ovariectomized Goats. **Biology of Reproduction**, v.69, p.141-145, 2003.
- Kinder, J.E.; García-Winder, M.; Imakawa, K. et al. Circulating concentrations of 17 $\beta$ -estradiol influence pattern of LH in circulation of cows. **Domestic Animal Endocrinology**, v.8, p.463-470, 1991.
- Kinder, J.E.; Kojima, F.N.; Bergfeld, E.G.M. et al. Progesterin and estrogen regulation of pulsatile LH release and development of persistent ovarian follicles in cattle. **Journal of Animal Science**, v.74, p.1424-1440, 1996.
- Kojima, F.N.; Bergfeld, E.G.M.; Wehrman, M.E. et al. Frequency of luteinizing hormone pulses in cattle influences duration of persistence of dominant ovarian follicles, follicular fluid concentrations of steroids, and activity of insulin-like growth factor binding proteins. **Animal Reproduction Science**, v.77, p.187-211, 2003.
- Latour, D.; Littell, R. **Advanced general linear models with an emphasis on mixed models**. Version 6.12. Cary: SAS Institute, 1996. 268p.
- Leyva, V.; Buckrell, B.C.; Walton, J.S. Regulation of follicular and ovulation in ewes by exogenous progestagen. **Theriogenology**, v.50, p.395-416, 1998.
- Martin, G.B. Factors affecting the secretion of luteinizing hormone in the ewe. **Biological Reviews**, v.59, p.1-87, 1984.
- Menchaca, A.; Miller, V.; Salveraglio, V. et al. Endocrine, luteal and follicular responses after the use of the Short-Term Protocol to synchronize ovulation in goats. **Animal Reproduction Science**, v.102, p.76-87, 2007.
- Menchaca, A.; Rubianes, E. Relation between progesterone concentrations during the early luteal phase and follicular dynamics in goats. **Theriogenology**, v.57, p.1411-1419, 2002.
- Mihm, M.; Diskin, M.G.; Roche, J.F. Regulation of follicle wave growth in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v.31, p.531-538, 1996.
- Montgomery, G.W.; Martin, G.B.; Pelletier, J. Changes in pulsatile LH secretion after ovariectomy in Ile-de-France in two seasons. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.73, p.173-183, 1993.
- Nett, T.M.; Turzillo, A.M.; Baratta, M. et al. Pituitary effects of steroid hormones on secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, p.33-42, 2002.
- Norris, T.A.; Weesner, G.D.; Shelton, J.M. Biological activity of LH during the peripartum period and the estrous cycle of the ewe. **Domestic Animal**

- Endocrinology**, v.61, p.25-33, 1989.
- Oyedipe, E.O.; Pathiraja, N.; Gyang, E.O. et al. Effect of dose of pregnant mare serum gonadotrophin on estrus parameters, ovulation rate and peripheral progesterone concentrations in Yankasa ewes. **Animal Reproduction Science**, v.20, p. 255-264, 1989.
- Price, C.A. Secreção pulsátil de LH alterada durante a superovulação em bovinos. **Arquivos da Faculdade de Veterinária**, v.27, p.35-53, 1999.
- Ravindra, J.P.; Rawlings, N.C.; Evans, A.C.O. et al. Ultrasonographic study of ovarian follicular dynamics in ewes during the estrous cycle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.101, p.501-509, 1994.
- Rhodes, F.M.; Chagas, L.M.; Clark, B.A. et al. Effect of dietary intake on steroid feedback on release of luteinizing hormone in ovariectomized cows. **Reproduction, Fertility and Development**, v.15, p.11-17, 2003.
- Richter, T.A.; Robinson, J.E.; Evans, N.P. Progesterone blocks the estradiol-stimulated luteinizing hormone surge by disrupting activation in response to a stimulatory estradiol signal in the ewe. **Biology of Reproduction**, v.67, p.119-125, 2002.
- Rubianes, E.; Castro, T.; Carbajal, B. Effect of high progesterone levels during the growing phase of the dominant follicle of wave 1 in ultrasonically monitored ewes. **Canadian Journal of Animal Science**, v.76, p.1-3, 1996.
- Sánchez, T.; Wehrman, M.E.; Kojima, F.N. et al. Dosage of the synthetic progestin, norgestomet, influences luteinizing hormone pulse frequency and endogenous secretion of 17- $\beta$ -estradiol in heifers. **Biology of Reproduction**, v.52, p.464-469, 1995.
- Scaramuzzi, R.J.; Adams, N.R.; Baird, D.T. et al. A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. **Reproduction, Fertility and Development**, v.5, p.459-478, 1993.
- Schrick, F.N.; Surface, R.A.; Pritchard, J.Y. et al. Ovarian structures during the estrous cycle and early pregnancy in ewes. **Biology of Reproduction**, v.49, p.1133-1140, 1993.
- Seekallu, S.V.; Toosi, B.M.; Rawlings, N.C. LH pulse frequency and the emergence and growth of ovarian antral follicular waves in the ewe during the luteal phase of the estrous cycle. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.7, p.78-93, 2009.
- Skinner, D.C.; Harris, T.G.; Evans, N.P. Duration and amplitude of the luteal phase progesterone increment times the estradiol-induced luteinizing hormone surge in ewes. **Biology of Reproduction**, v.63, p.1135-1142, 2000.
- Smith, J.F.; Briggs, R.M.; Parr, J. et al. Seasonal changes in LH profiles of ewes selected for and against an early lambing date. In: Conference of New Zealand Society of Animal Production, 55, 1995, Otago. **Proceedings...** Otago: New Zealand Society of Animal Production, 1995. p.224-227.
- Souza, C.J.H.; Campbell, B.K.; Baird, D.T. Follicular dynamics and ovarian steroid in sheep during anoestrus. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.108, p.101-106, 1996.
- Thomas, G.B.; Martin, G.B.; Ford, J.R. et al. Secretion of LH, FSH and oestradiol-17 $\beta$  during the follicular phase of the oestrus cycle in the ewe. **Australian Journal of Biological Sciences**, v.41, p.303-308, 1988.
- Tsonis, C.G.; Carson, R.S.; Findlay, J.K. Relationships between aromatase activity, follicular fluid oestradiol-17 $\beta$  and testosterone concentrations, and diameter and atresia of individual ovine follicles. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.72, p.153-163, 1984.
- Tsukamura, H. Neuroendocrine mechanism regulating luteinizing hormone secretion during periovulatory period: Negative and positive feedback actions of estrogen in the brain. **Journal of Reproduction and Development**, v.44, p.j81-j90, 1998.
- Uribe-Velásquez, L.F.; Souza, M.I.L.; Loaiza, A.M. Efecto de la sincronización del estro con prostaglandina-F2 $\alpha$  vs CIDR + 500 UI de eCG en ovejas Bergamacia durante el inicio de la fase luteal. **Revista Científica, FCV-LUZ**, v.18, n.4, p.368-373, 2008.
- Wherman, M.E.; Roberson, M.S.; Cupp, A.S. et al. Increasing exogenous progesterone during synchronization of estrus decreases endogenous 17 $\beta$ -estradiol and increases conception in cows. **Biology of Reproduction**, v.49, p.214-220, 1993.