

## La administración de una solución neoglucogénica incrementa el reclutamiento folicular en ovejas en anestro

### The administration of a neoglucegenic solution increases follicular recruitment in anoestrous ewes

López-Mazz, C<sup>a</sup>; Regueiro, M<sup>a</sup>; Carriquiry, M<sup>a</sup>; Crooker, B<sup>b</sup>; Pérez-Clariget, R<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Producción Animal y Pasturas, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Uruguay. e-mail: tatolopezmazz@gmail.com

<sup>b</sup>Department Animal Sciences, Universidad de Minnesota, USA

#### RESUMEN

Para probar la hipótesis que el incremento de la glicemia durante 24 h al momento de la introducción de los carneros influencia el desarrollo folicular y la tasa ovulatoria en ovejas Corriedale en anestro inducidas a ovular usando esponjas intravaginales conteniendo 10 mg de medroxiprogesterona durante 6 días previos a la introducción de los machos, 62 ovejas Corriedale adultas, secas, fueron asignadas al azar a: Grupo Tratamiento (GT; n=28): administración oral, cada 6 h, de 125ml de una solución neoglucogénica (glicerol 70%, propilenglicol 20%, agua destilada 10%) durante 24 h comenzando inmediatamente después de introducidos los carneros y Grupo Control (GC; n=34): administración oral de agua destilada en dosis/frecuencia similares a las del GT. La glicemia fue mayor ( $P<0.01$ ) en el GT que en el GC después de 6 h de administrada la primera dosis y hasta 6 h después de la última dosis. El diámetro máximo del folículo preovulatorio fue mayor ( $P<0.05$ ) en el GT que en el GC. El número de folículos de 2 mm se incrementó en el GT 24 horas después de iniciados los tratamientos ( $P<0.05$ ); el número de folículos de 3 mm no fue afectado por el tratamiento ( $P=0.16$ ). El número de cuerpo lúteo fue similar en ambos grupos (GT:1.12 vs. GC:1.29;  $P=0.26$ ). El incremento de glicemia disminuyó ( $P=0.067$ ) los niveles plasmáticos de IGF-I en el GT (periodo 0 a 48 hs) pero las medias generales durante todo el periodo de muestreo (0 a 168 h) fueron similares ( $P=0.35$ ) entre grupos.

**Palabras clave:** Tasa ovulatoria, oveja, glucemia, IGF-I

#### ABSTRACT

Sixty-two adult non-lactating Corriedale ewes were used to evaluate the hypothesis that an increase of glycaemia for 24 h at the moment rams are introduced influences follicular development and ovulation rate of anoestrous ewes. Ewes were induced to ovulate using sponges containing 10 mg of medroxyprogesterone acetate for 6 d before rams were introduced and were randomly assigned to receive an oral administration of neoglucoenic (125 ml; 70% glycerol, 20% propilenglycol, 10% distilled water; n= 28; Group-S) or saline (n=34; Group-C) solutions. Solutions were administered every 6 h for a 24 h-period, starting immediately after sponge withdrawal. Data were analyzed with a repeated measures analysis. Glycaemia was greater ( $P<0.01$ ) in Group-S than Group-C from 6 h after the first dose until 6 h after the last dose (6 to 24 h). Glucose treatment increased the maximum diameter of follicles before follicle collapse at ovulation (Group-S:  $4.1\pm 0.6$ mm; Group-C:  $3.4\pm 0.8$ mm,  $P<0.05$ ). There was an interaction ( $P=0.04$ ) between treatment and day from treatment on the number of small as Group-S presented more 2 mm-follicles on day 1 after treatment than Group-C (day 0: Group-S:  $2.8\pm 2.4$  vs Group-C:  $3.9\pm 2.2$ ,  $P>0.05$ ; day 1: Group-S:  $6.0\pm 2.2$  vs Group-C:  $4.1\pm 2.0$ ,  $P<0.05$ ). However, the number of 3 mm-follicles and the average number of corpus lutea (1.12 vs 1.29 for Group-S and Group-C, respectively) were not different ( $P>0.05$ ) between treatments. The increase of glycaemia tended ( $P=0.067$ ) to decrease plasma IGF-I concentrations in Group-S during the first 48 h after administration of neoglucoenic solution but overall mean IGF-I concentrations during the sampling period (0 to 168 h) did not differ ( $P=0.35$ ) between treatments.

**Key words:** Ovulatory rate, ewe, glycaemia, IGF-I

#### INTRODUCCIÓN

Es conocida la estrecha relación existente entre la nutrición y la reproducción. Elevados niveles de alimentación al momento del servicio en las ovejas produce un efecto positivo en la fertilidad y prolificidad (Lindsay *et al.*, 1991). Evidencias experimentales indican que la glucosa estaría involucrada en el efecto del

flushing sobre la foliculogénesis en las ovejas (Muñoz-Gutierrez *et al.*, 2002; Viñoles *et al.*, 2005). Es más, se ha observado que un incremento de la glicemia aumenta la tasa ovulatoria en ovejas inducidas a ovular (Rodríguez Iglesias *et al.*, 1996). En el presente trabajo probamos la hipótesis que el incremento de la glicemia durante 24 h al momento de la introducción de los carneros influencia el desarrollo folicular y la tasa ovulatoria en ovejas Corriedale en anestro estacional inducidas a ovular usando el efecto macho.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los procedimientos experimentales se ajustaron a las normas establecidas por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal de la Universidad de la República. El trabajo se realizó en la Estación Experimental "Bernardo Rosengurt" de la Facultad de Agronomía, (Cerro Largo), Uruguay (32° 25' LS y 54° 15' LW) durante la primavera tardía (20 de noviembre - 15 de diciembre; 13h 58' - 14 hs 17' horas luz, respectivamente), época de anestro estacional (Fernández-Abella *et al.*, 1996).

Se utilizaron 62 ovejas Corriedale de 1.5 a 3.5 años, en anestro, confirmado por ausencia de cuerpo lúteo al examen ultrasonográfico y por niveles inferiores a 0.5 ng/ml de progesterona en tres muestras consecutivas separadas por un intervalo de 4 d, con peso vivo (PV) de  $47.7 \pm 3.9$  Kg. ( $x \pm sem$ ) y una condición corporal (CC; en una escala de 1 - 5; Bianchi, 1994) de  $2.9 \pm 0.3$ . Las ovejas habían parido un solo cordero en la última parición, el que fue destetado 30 días antes del comienzo del trabajo. Estas ovejas fueron seleccionadas de un rebaño Corriedale (400 ovejas) con una historia de partos múltiples (análisis de 5 años de registros) no superior al 6% anual (López-Mazz, datos no publicados). Las ovejas pastoreaban en potreros con pasturas nativas, con una proporción verde-seco en el forraje disponible de 70-30% y registros pluviométricos de 32 y 65 mm para los meses de noviembre y diciembre respectivamente (Panissa, G., datos no publicados). Durante el mes previo al experimento, las ovejas se mantuvieron separadas de los machos (distancia mayor a 2 km), de manera que no se podían ver, oír ni oler.

A todas las ovejas se les colocó esponjas intravaginales (EIV) conteniendo 10 mg de Medroxiprogesterona (MAP) durante 6 días y al momento de su retiro se introdujeron 12% de machos adultos y 20% de ovejas en celo. A partir de ese momento y durante 120 h se detectó el celo cada 12 h. Las ovejas fueron asignadas al azar considerando la edad, el PV y la CC a dos grupos experimentales: Grupo Tratamiento (GT;  $n = 28$ ) el cual recibió oralmente, cada 6 h, 125 ml de una solución neoglucogénica (glicerol 70%, propilenglicol 20% y agua destilada 10%) durante 24 h, comenzando inmediatamente después del retiro de las EIV (total de dosis: 4, volumen: 500 ml) y Grupo Control (GC  $n=34$ ) el cual recibió agua destilada en dosis y frecuencia similares a las del GT. Se tomaron muestras de sangre por venopunción yugular en tubos heparinizados a 20 ovejas por grupo 12 h previas al inicio del tratamiento (día 0), previamente a cada dosificación y diariamente hasta el día previo a la laparoscopia (7 días). Las muestras fueron centrifugadas y el plasma almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

La concentración de glucosa se determinó en las muestras tomadas 12 h antes hasta 48 h después del inicio de los tratamientos utilizando un kit comercial (Wiener lab, Rosario, Argentina) y un multianalizador automático marca Vitalab modelo Seltra 2. La concentración de IGF-I se determinó en las todas las muestras menos en las tomadas a las 6 y 18 hs de iniciados los tratamientos, utilizando radioinmunoanálisis (Weber *et al.*, 2007) previamente validado para plasma ovino.

Se examinaron diariamente ambos ovarios de 13 ovejas (GC=7 y GT=6) por ultrasonografía transrectal, utilizando un equipo ALOKA SSD 500 con un transductor de 7.5MHz prostático de uso humano, comenzando el día de inicio de los tratamientos y hasta el día 7. Se contaron y midieron todos los folículos iguales o mayores a 2 mm de diámetro y el diámetro máximo del folículo preovulatorio antes de su colapso. Se registró en todas las ovejas el número de cuerpos lúteos (CL) en ambos ovarios a los 8 días después del inicio del tratamiento, previo ayuno de 12 h, por endoscopia laparoscópica utilizando un equipo marca Storz de ángulo de visión de 30°, de 7 mm de diámetro, conectado a una fuente de luz Storz (Cold Light Fountain 482). Las ovejas fueron colocadas en camillas para laparoscopia en posición de Trendelenburg. Las ovejas fueron pesadas y la CC estimada por dos técnicos entrenados al iniciar y finalizar el trabajo (23 días después).

Los datos de PV, CC, glicemia e IGF-I y número de folículos fueron analizados usando un análisis de medidas repetidas en el tiempo mediante PROC MIXED de SAS (2001). El modelo incluía tratamiento, hora o día y su interacción como efectos fijos y animales como efecto aleatorio. Adicionalmente, para las variables glicemia e IGF-I, se utilizó el valor de la muestra pre-tratamiento como covariable. Los datos del intervalo retiro de las EIV-presentación de celos y diámetro máximo del folículo pre-ovulatorio se analizaron con un modelo que incluía tratamiento como efecto fijo y animal como efecto aleatorio usando PROC MIXED (SAS, 2001). El número de CL se analizó utilizando el PROC GENMOD (SAS, 2001). Los datos se presentan como  $x \pm eem$ .

## RESULTADOS Y DISCUSION

El tratamiento no afectó ( $P = 0.37$ ) el intervalo retiro de las EIV-presentación del celo ( $52.9 \pm 4.1$  vs  $47.1 \pm 4.5$  h para GT y GC, respectivamente). Durante el periodo experimental, los animales perdieron ( $P < 0.001$ ) casi 4% de su PV y 0.25 unidades de CC. El déficit de lluvias registrado en el mes de noviembre y diciembre (registro histórico para esos meses: 103 mm y 83 mm, respectivamente) probablemente explique estas pérdidas debido al impacto negativo que tuvo en la disponibilidad y calidad del forraje ofrecida a los animales. De manera similar a lo observado en experimentos previos (López-Mazz *et al.*, 2004) la administración de la solución neoglucogénica aumentó ( $P < 0.01$ ) la glicemia en el GT a partir de las 6 h de la primera dosis, diferencia ( $P < 0.01$ ), que se mantuvo hasta 6 h después de la última dosificación, luego de la cual, la glicemia del GT regresó a los valores pre-tratamiento, no diferenciándose ( $P > 0.05$ ) de los niveles del GC (Figura 1).

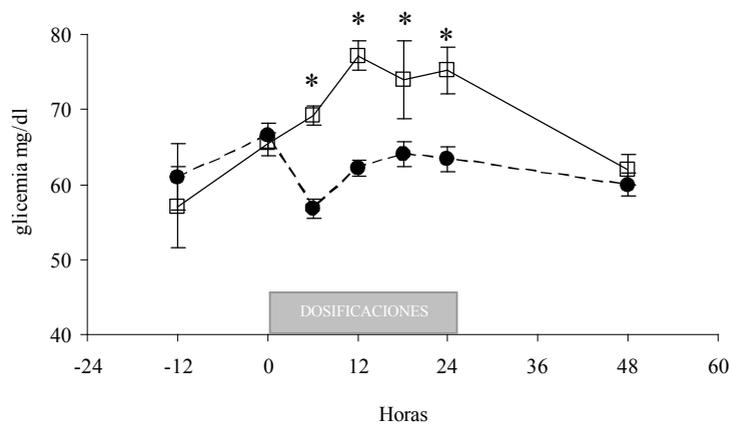


Figura 1. Glicemia en ovejas a las que se les administró una solución neoglucogénica (GT; □, n = 28) y agua destilada (GC; ●, n = 34) en relación al momento de las dosificaciones. La barra indica el periodo de administración de tratamientos. Los \* indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.01$ ).

La solución neoglucogénica incrementó ( $P < 0.05$ ) el diámetro máximo del folículo preovulatorio ( $4.1 \pm 0.2$  mm vs.  $3.4 \pm 0.3$  mm para GT y GC, respectivamente). Se observó una interacción ( $P = 0.024$ ) entre tratamiento y día cuando se comparó el número de folículos de 2 mm ya que el número de folículos fue similar en los dos grupos de ovejas el día anterior a la dosificación de la solución neoglucogénica pero aumentó el día posterior solamente en el GT. Sin embargo, esta diferencia no se mantuvo en los días posteriores (Figura 2). No se observó efecto del tratamiento ( $P = 0.16$ ) ni del día ( $P = 0.77$ ) sobre el número de folículos de 3 mm de diámetro. Sin embargo existió una tendencia ( $P = 0.095$ ) a la interacción entre tratamiento y día, con el número de folículos incrementándose en el GT y disminuyendo en el GC en los tres días posteriores a la aplicación del tratamiento (Figura 2).

El número de CL fue similar ( $P = 0.26$ ) en ambos grupos (1.12 vs 1.29 para GT y GC, respectivamente). Se observaron 74% de ovulaciones simples, 23% de ovulaciones dobles y 3% (1 oveja) de ovulaciones triples en el GC mientras que en el GT, 89% de las ovejas presentaron ovulación simple y 11% doble. Es posible que el incremento de glucosa por 24 h al momento del retiro de las esponjas e introducción de los machos (fase folicular) fuera suficiente para incrementar el reclutamiento folicular pero insuficiente para estimular el desarrollo de los folículos hasta la etapa pre-ovulatoria.

El incremento de glicemia disminuyó ( $P = 0.067$ ) los niveles de IGF-I en plasma ya que el GT ( $158.5 \pm 4.9$  ng/ml) tuvo menores concentraciones que el GC ( $172.2 \pm 4.3$  ng/ml) durante las 24 h en que el primero presentó glicemias más elevadas. Sin embargo, las medias de los tratamientos para todo el experimento fueron similares ( $163.6 \pm 7.0$  vs. GC:  $173.0 \pm 6.5$  ng/ml para GT y GC, respectivamente,  $P = 0.35$ ) y no se encontró una interacción ( $P > 0.1$ ) entre tratamiento y hora en ninguno de los dos periodos de tiempo analizados (0 a 48 h y 0 a 168 h; Figura 3). El inesperado hallazgo del efecto negativo del incremento de glicemia sobre la concentración de IGF-I podría estar asociado, más que a un efecto inhibitorio sobre su síntesis, a una mayor utilización de esta hormona o a una

mayor tasa de recambio que determinarían una menor cantidad de moléculas presentes en sangre. Teniendo en cuenta la información generada concluimos que un incremento de la glicemia durante 24 h después del retiro de EIV e introducción de los machos produce un incremento del diámetro del foliculo pre-ovulatorio y del reclutamiento folicular pero no de la tasa ovulatoria.

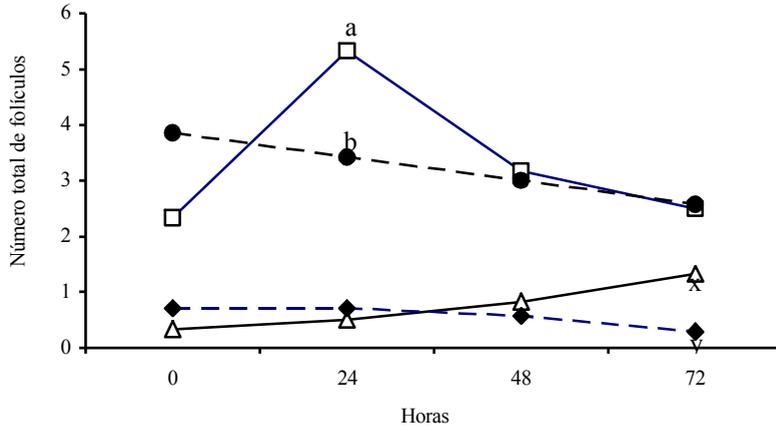


Figura 2. Número total de folículos de 2 mm en GT (□, n = 6) y GC (●, n = 7) y de 3 mm en el GT (Δ, n = 6) y GC (◆, n = 7) en relación al día (0) de las dosificaciones. Literales a y b indica diferencia estadísticamente significativa ( $P = 0.024$ ); x e y una tendencia ( $P = 0.095$ ).

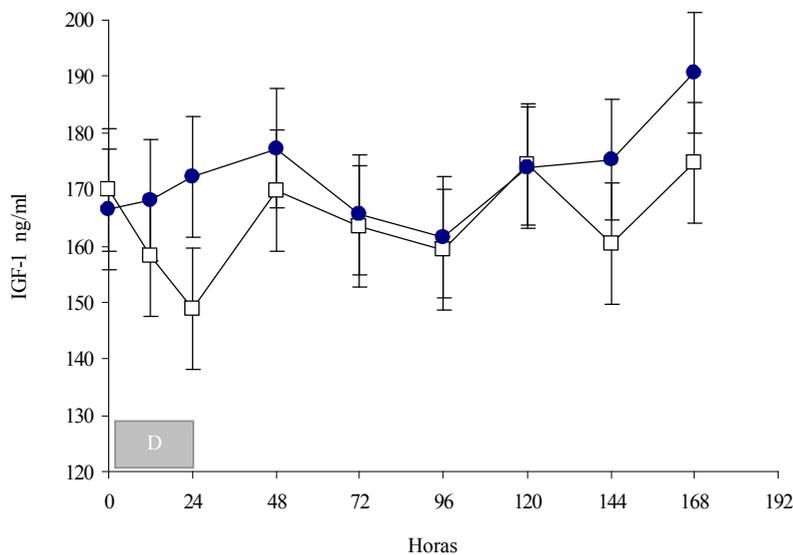


Figura 3. Concentración de IGF-1 en ovejas a las que se les administró una solución neoglucogénica (GT; □, n = 6) y agua destilada (GC; ●, n = 7) en relación al momento de las dosificaciones (D).

### **Agradecimiento**

Los autores agradecen a las Dras. Georget Banchemo y Graciela Quintans (INIA) por el equipo de ultrasonografía, al Dr. Gonzalo Urioste (DILAVE) por el análisis de glicemia, al Dr. Pablo Mariño por la laparoscopia y a las Ing. Agr. Ana Astessiano, Andrea Regalado y Ona Syrvys por su ayuda durante el trabajo de campo.

### **LITERATURA CITADA**

- Abella Fernández, D.; S. Saldaña; L. Surraco; N. Villegas y R. Rodríguez Palma. 1996. Evaluación de la variación estacional de la actividad sexual y crecimiento de lana en cuatro razas ovinas. Primer Congreso Uruguayo de Producción Animal. Montevideo, Uruguay.
- Bianchi, G. 1994. Alternativas tecnológicas para mejorar la producción ovina: Manejo del estado corporal. *Cangué* 1:29-31.
- Lindsay, D. R.; G. B. Martin y H. Williams. 1991. Nutrition and reproduction. In *Reproduction in Domesticated Animals; World Animal Science, Series*, pp 459-491
- López-Mazz, C.; R. Pérez-Clariget; A. López; M. Regueiro y J. Burgueño. 2004. Effect of administration of a gluconeogenic solution on ovulation rate and glycemia in cyclic Corriedale sheep. *Reproduction, Fertility and Development* 16:522:45
- Muñoz Gutierrez, M.; D. Blache; G. B. Martin y R. J. Scaramuzzi. 2002. Folliculogenesis and ovarian expression of mRNA encoding aromatase in anoestrous sheep after 5 days of glucose or glucosamine infusion or supplementary lupin feeding. *Reproduction* 124:721-731.
- Rodríguez Iglesias, R. M.; N. H. Ciccioi; H. Irazoqui y C. Giglioli. 1996. Ovulation rate in ewes after single oral glucogenic dosage during a ram-induced follicular phase. *Animal Reproduction Science* 44:211-221.
- SAS Institute, 2001. *SAS User's Guide Statistics*. SAS Inst. Inc. Cary, NC. USA
- Viñoles, C.; M. Forsberg.; G.B. Martin.; C. Cajarville.; J. Repetto y A. Meikle. 2005. Short-term nutritional supplementation of ewes in low body condition affects follicle development due to an increase in glucose and metabolic hormones. *Reprod. and Fert.*: 129:299-309.