

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**COMPARACIÓN REPRODUCTIVA DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE IATF
VÍA CERVICAL EN OVINOS EN BASE A PROSTAGLANDINA O
PROGESTÁGENOS Y eCG**

Por

**BENTANCOR BERTALMIO Eliana
GONZÁLEZ CASTRILLEJO Valentina**

**TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias
Orientación: Producción Animal**

MODALIDAD: Ensayo experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2015**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Presidente de mesa
Dr. Jorge Gil

Segundo miembro (tutor)
Dr. PhD. Julio Olivera Muzante

Tercer miembro
Ing. Daniel Fernández Abella

Cuarto miembro (co-tutor)
Dr. MSc. Sergio Fierro Fernández

Fecha 5 de Mayo 2015

Autores
Br. Eliana Bentancor Bertalmio

.....
Br. Valentina González Castrillejo

AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. Julio Olivera, nuestro tutor quien nos guio para realizar el trabajo de campo de este ensayo así como en la escritura y nos apoyó para poder culminar esta difícil etapa final.
- Al Dr. Sergio Fierro, nuestro co-tutor quien formo parte de todo este proceso siendo indispensable su apoyo y participación en el mismo.
- A todo el personal, estudiantes del año 2013 e institución de la Escuela Agraria “La Carolina” por permitarnos realizar el trabajo experimental y brindarnos tanto el alojamiento como su tiempo y trabajo sin los cuales hubiese sido imposible realizar este proyecto.
- A la institución, personal y docentes de la Estación Experimental Mario A Cassinoni (EEMAC), donde vivimos una etapa de aprendizaje muy importante.
- A los compañeros de producción 2012 con los que compartimos ese período.
- A la Universidad de la Republica y los docentes que trabajan en ella por permitarnos aprender y formarnos tanto profesional como personalmente.
- Al todo el personal de biblioteca que siempre estuvo dispuesto a ayudarnos con la realización de la bibliografía, y a brindarnos todo el material necesario.
- A nuestros compañeros y amigos: Josefina Ferrari, Juan Manuel Vizcaíno y Diego Donadío por formar parte de nuestro grupo de trabajo.
- Por último y más importante a nuestras familias y amigos que nos acompañaron en todo este proceso y nos contuvieron en todo momento siendo imposible haber llegado a esta etapa sin ellos.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|---|----|
| PÁGINA DE APROBACIÓN..... | 2 |
| AGRADECIMIENTOS..... | 3 |
| TABLA DE CONTENIDO | 4 |
| INDICE DE CUADROS Y FIGURAS | 5 |
| RESUMEN | 6 |
| SUMMARY | 7 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 8 |
| 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA..... | 9 |
| 2.1 Fisiología reproductiva | 9 |
| 2.1.1 Estacionalidad reproductiva y ciclo estral en ovinos | 10 |
| 2.1.2 Perdidas reproductivas..... | 15 |
| 2.2 Inseminación artificial (IA)..... | 16 |
| 2.2.1 Ventajas y desventajas de la IA | 17 |
| 2.2.2 Técnicas de IA..... | 17 |
| 2.3 Métodos de sincronización de estros y ovulaciones en ovinos | 18 |
| 2.3.1 Métodos farmacológicos de sincronización de estros: protocolos de IATF | 18 |
| 2.3.1.1 Protocolos en base al uso de Progesterona y/o progestágenos | 18 |
| 2.3.1.2 Protocolos en base al uso de Prostaglandina y sus análogos sintéticos | 21 |
| 2.3.1.3 Protocolos en base a GnRH | 22 |
| 2.4 Respuesta fisiológica luego de la administración de una PG | 23 |
| 2.5 Protocolos en base a PG utilizados en sincronización de estros..... | 24 |
| 2.6 Protocolo Synchrovine® | 27 |
| 2.7 Modificaciones en los protocolos en base a PG..... | 27 |
| 3. HIPÓTESIS | 32 |
| 4. OBJETIVOS | 32 |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 32 |
| 5.1 Animales | 32 |
| 5.2 Manejo nutricional | 33 |
| 5.3 Manejo sanitario..... | 33 |
| 5.4 Diseño experimental..... | 33 |
| 5.5 Manejo del semen e IA..... | 35 |
| 5.6 Evaluaciones reproductivas..... | 35 |

| | |
|-------------------------------|----|
| 5.7 Análisis estadístico..... | 36 |
| 6. RESULTADOS..... | 36 |
| 7. DISCUSIÓN..... | 38 |
| 8. CONCLUSIÓN..... | 41 |
| 9. BIBLIOGRAFÍA..... | 42 |

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

CUADROS

| | |
|---|----|
| Cuadro 1. Duración de la estación de cría en distintas razas en Uruguay (adaptado de Fernández Abella, 1993)..... | 11 |
| Cuadro 2. Diferentes análogos sintéticos de PGF2 α y sus respectivas dosis (adaptado de Fierro y col., 2013)..... | 22 |
| Cuadro 3. Intervalo de tiempo (h) al inicio del estro (PG-IE) y la ovulación después de la segunda inyección de PG en ovejas sincronizadas con un régimen de doble inyección de PG con diferentes intervalos entre tratamientos (adaptado de Fierro y col., 2013)..... | 25 |
| Cuadro 4. Resultados de fertilidad obtenidos con varios protocolos basados en PG, con diferentes modificaciones, comparados con protocolos en base P4-eCG..... | 26 |
| Cuadro 5. Modificaciones realizadas al protocolo Synchrovine® y sus resultados de fertilidad (%) y prolificidad (adaptado de Fierro, 2010)..... | 28 |
| Cuadro 6. Respuesta reproductiva en ovejas sincronizadas con un análogo sintético de PGF2 α (PG) administrado a diferentes intervalos de tiempo (Bonino y Grela, 2014)..... | 31 |
| Cuadro 7. Respuesta ovulatoria en ovejas multíparas sincronizadas con un análogo sintético de PGF2 α (PG) administrado a diferentes intervalos de tiempo, y en comparación con progestágenos y eCG (P4-eCG)..... | 36 |
| Cuadro 8. Respuesta reproductiva en ovejas sincronizadas con un análogo sintético de PGF2 α (PG) administrado a diferentes intervalos de tiempo, y en comparación con progestágenos-eCG (P4-eCG)..... | 37 |

FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Representación esquemática del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (Adaptado de Baird, 1983)..... | 10 |
| Figura 2. Representación esquemática de los cambios hormonales en las diferentes fases del ciclo estral de la oveja (adaptado de Martin y Thomas, 1990)..... | 12 |
| Figura 3. Onda de crecimiento folicular que tienen lugar a lo largo del ciclo estral de la oveja (adaptado de Viñoles y col., 2000)..... | 13 |
| Figura 4. Esquema de Diseño Experimental..... | 34 |

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue comparar la respuesta reproductiva a la Inseminación Artificial a Tiempo Fijo (IATF) de ovejas sincronizadas con dos dosis de un análogo sintético de PGF2 α (PG) con diferente intervalo de tiempo entre ellas y un grupo control con progestágenos-eCG (P4-eCG). El experimento se realizó en la Escuela Agraria-UTU “La Carolina” (Ruta 23 km 162,5, Ismael Cortina, Flores, Uruguay, 33°S – 57°W), en estación reproductiva (marzo a junio del 2013). Se utilizaron 610 ovejas de raza Corriedale (440 multíparas y 170 nulíparas), manejadas sobre campo natural con disponibilidad promedio inicial de 1956 \pm 1766 kg/MS/ha (6,7% PB, 2,3 Mcal/kg/MS EM). Se conformaron seis grupos mediante bloqueo por categoría, CC y PV, de los cuales cinco fueron tratados con dos inyecciones intramusculares (im) de PG (Delprostenate, Glandinex®, Universal Lab, Uruguay, 160 μ g/oveja/inyección) separadas 12, 13, 14, 15 ó 16 días (PG12, PG13, PG14, PG15 o PG16; n= 100, 104, 103, 100 ó 100 ovejas respectivamente), más un grupo control sincronizado con P4-eCG (n= 103): esponjas con medroxiprogesterona por 14 días (MAP 60 mg; Syntex, Uruguay) y eCG im a su retiro (Novormon 5000®; Syntex, Uruguay; 380UI). Se realizó IATF 56 o 48 \pm 1,5 h luego de la segunda PG o de retirada las esponjas respectivamente, utilizando semen fresco vía cervical (pool de 9 carneros raza Corriedale diluido, dilución -1+1- en leche UHT con antibiótico; 160 millones de spz/oveja). Se evaluó en ovejas multíparas: el porcentaje de ovejas que ovularon (ovejas que ovularon/total de ovejas*100), la tasa ovulatoria (TO; CLs/oveja que ovuló) y el nivel ovulatorio (CLs/total de ovejas*100) al Día 8 pos IATF, por medio de ultrasonografía vía transrectal; y en ambas categorías: la tasa de no retorno al estro (NR_D21; ovejas que no retornan al estro/total de ovejas*100) mediante carneros pintados desde el Día 13 al 21 pos IATF (3/100 ovejas); la fertilidad (ovejas gestantes/inseminadas*100), prolificidad (fetos/ovejas gestantes) y fecundidad (fetos/ovejas inseminadas*100) al Día 60 por ultrasonografía vía transabdominal. No se observaron diferencias significativas entre grupos de sincronización en el porcentaje de ovejas ovuladas (97, 2, 100, 97, 4, 98, 6, 100, 98,6%; PG12, PG13, PG14, PG15, PG16 y P4-eCG respectivamente), ni entre grupos de PG en TO (1,55, 1,50, 1,65, 1,58, 1,57) o nivel ovulatorio (150, 150, 161, 156, 157%; PG12, PG13, PG14, PG15 y PG16 respectivamente; P>0,05). Sin embargo, el grupo P4-eCG presentó una mayor TO (1,88) y nivel ovulatorio (185%) que todos los grupos de PG (P<0,05). El NR_D21, la fertilidad y fecundidad entre los grupos PG15 (66, 65 y 81%), PG16 (58, 57 y 71%) y P4-eCG (68, 62 y 86%) fue similar, pero superior a los grupos PG12 (44, 41 y 51%) y PG13 (48, 44 y 51% respectivamente; P<0,05). El protocolo PG14 tuvo resultados intermedios respecto a los demás grupos (P>0,05). No se observaron diferencias significativas entre grupos en prolificidad, salvo el grupo PG13 que fue inferior al P4-eCG (1,15 vs. 1,39, P<0,05). Se concluye que una separación de 15 y 16 días entre dosis de PG permitiría en la raza Corriedale resultados reproductivos a la IATF superiores a 12 y 13 días de separación, pero similares al protocolo de P4-eCG, siendo alternativas de sincronización de estros e IATF con semen fresco más “limpias, verdes y éticas” que opciones tradicionales.

SUMMARY

The aim of this study was to compare the reproductive response to Fixed Time Artificial Insemination (TAI) sheep synchronized with two doses of a synthetic analogue of PGF2 α (PG) with different time interval between them and a control group with progestogen-eCG (P4-eCG). The experiment was conducted at the Agrarian UTU School "La Carolina" (route 23 km 162,5, Ismael Cortinas, Flores, Uruguay, 33° S - 57 ° W), in breeding season (March to June 2013). Corriedale ewes (440 multiparous and 170 nulliparous), under natural pasture with initial forage availability of 1956 \pm 1766kg/DM/ha (6,7% CP, 2,3 Mcal/kg/MS MS) were used. Six groups were formed blocked by category, CC and PV, of which five of these groups were treated with two intramuscular (im) injections of PG (Delprostenate, Glandinex®, Universal Lab, Uruguay, 160 μ g/sheep/injection) separated 12, 13, 14, 15 or 16 days (PG12, PG13, PG14, PG15 or PG16; n = 100, 104, 103, 100 and 100 sheep respectively), plus a control group synchronized P4-eCG (n = 103) with medroxyprogesterone sponges for 14 days (MAP 60 mg; Syntex, Uruguay) and eCG im in his retirement (Novormon 5000®; Syntex, Uruguay; 380UI). TAI 56 or 48 \pm 1,5 h was performed after the second PG or removal sponges respectively using fresh semen via cervical (pool of 9 Corriedale rams diluted, dilution -1+1- in milk UHT + antibiotic; 160 million spz / sheep). Parameters evaluated were: the percentage of ovulating females (ovulated sheep / total sheep * 100), the ovulatory rate (TO; CLs / sheep-oval) and the ovulatory levels (CLs / total sheep * 100) to Day 8 pos IATF, by transrectal ultrasonography; and in both categories: the rate of no return to estrus (NR_D21; sheep not return to estrus / total sheep * 100) by rams painted from Day 13 to 21 after TAI (3/100 sheep); fertility (ewes / inseminated * 100), prolificacy (fetuses / ewes) and fecundity (fetuses / inseminated ewes * 100) 60 Day by transabdominal ultrasonography. No significant differences were observed between groups in the percentage of sheep ovulated (97,2, 100, 97,4, 98,6, 100, 98,6%, PG12, PG13, PG14, PG15, PG16 and P4-eCG respectively) and between groups of PG groups in TO (1,55, 1,50, 1,65, 1,58, 1,57) or ovulatory level (1,50, 1,50, 1,61, 1,56, 1,57%, PG12, PG13, PG14, PG15, PG16 respectively; P > 0.05). However, the P4-eCG group had a higher level TO (1,88) and ovulatory level (185%) than all groups of PG (P<0, 05). In the NR_D21, fertility and fecundity among PG15 (66, 65 and 81%), PG16 (58, 57 and 71%) and P4-eCG (68, 62 and 86%) groups was similar but superior to groups PG12 (44, 41 and 51%) and PG13 (48, 44 and 51% respectively; P <0,05). The PG14 protocol had intermediate results compared to the other groups (P>0,05). No significant differences were observed between groups in prolificacy, except the group PG13 that was lower than the P4-eCG (1,15 vs. 1,39, P<0,05). It is concluded that a separation of 15 to 16 days between doses of PG allow reproductive outcomes higher than 12 or 13 days, but similar than the protocol P4-eCG group, being alternatives of estrus synchronization and TAI more "green, clean and ethic".

1. INTRODUCCIÓN

La economía en nuestro país, depende en gran parte de la producción del sector agropecuario (DIEA, 2013). Dentro del mismo, la producción ovina representa uno de los rubros de importancia, generando entre lana y carne cerca del 9% del valor bruto de la producción agropecuaria del país (DIEA, 2013).

Respecto al stock ovino, y a pesar que en el 2011 se registró el valor más bajo en los últimos 50 años (7.471.000 ovinos), en los últimos años este ascendió a 8.190.182 ovinos (DI.CO.SE, 2013). Esta mejora en el stock se vio estimulada por un incremento y estabilización de los precios de la lana y carne ovina, y potenciada por un aumento en el valor de señalada de los últimos 5 años, que promedió un 75% (Carlos Salgado, SUL, comunicación personal).

Los componentes para una mejora de la tasa reproductiva o señalada, son la fertilidad de las ovejas encarneradas, la prolificidad de las ovejas paridas y la supervivencia de los corderos nacidos (Azzarini, 2000). Dentro de este contexto, parece importante viabilizar distintas técnicas que permitan mejorar la eficiencia reproductiva global de nuestras majadas. La inseminación artificial (IA) es una de las herramientas disponibles para ello, debido a que permite entre otras cosas un mayor y mejor aprovechamiento de los reproductores, maximizando el progreso genético de una raza y/o la realización de cruzamientos (Menchaca y Rubianes, 2004). Sin embargo su adopción es históricamente escasa, no superando el 8% de la majada en servicio (Duran del Campo, 1980; Fernández-Abella, SUL, comunicación personal). Una alternativa que minimizaría los problemas de manejo, sanitarios y de costos derivados del uso de la IA tradicional (o a “estro visto”) y su extendida implementación en días es la IA a tiempo fijo (IATF; Olivera y Gil, 2005). Esta tecnología permitiría, por su concentración de actividades en el tiempo, un uso más eficiente de la escasa mano de obra de nuestros predios, realizar alimentación “focalizada” o de corta duración en forma precisa al servicio y al parto, ajustar en forma conveniente la fecha de esquila pre-parto, generar una parición concentrada permitiendo un mejor control de la misma, y generar lotes de corderos más parejos al embarque. Pero para alcanzar una masificación en la adopción de esta biotecnología, y por ende de la IA en sí misma, es importante primero lograr aceptables resultados por vía cervical, con protocolos de bajo costo, fácil implementación, y que consideren en cierta forma aspectos del bienestar “humano-

animal-ambiental” (residuos en carne y leche, estrés animal por manejo, residuos en el ambiente) considerados hoy en día relevantes para nuestros mercados (Martin y col., 2004; Olivera-Muzante y col., 2011a); es decir alternativas más “limpias, verdes y éticas” (Martin, 2009). Para ello es necesario investigar y validar otros protocolos de sincronización de estros e IA, que equiparen los resultados de los tradicionales protocolos en base a progestágenos y gonadotropinas (P4-eCG) utilizados hasta el momento.

En ese sentido, y empleando protocolos de IATF utilizando análogos sintéticos de PGF2 α (PG), basados en una disminución del intervalo en días entre las dosis (7 días, protocolo Synchrovine®; Rubianes y col., 2004), no se han alcanzado avances sustanciales (Olivera-Muzante y col., 2011a, b; Olivera-Muzante y col., 2013; Fierro y col. 2014). Sin embargo, a partir de trabajos de investigación básica y una profunda revisión del tema (Fierro y col. 2011; Fierro y col., 2013) surgen nuevas hipótesis de trabajo a considerar. Incursionando en las mismas, Dutra da Silveira y Soler (2013), Hourcade y Pechi (2014), y Bonino y Grela (2014) han obtenidos resultados promisorios con protocolos que se basan en el incremento del intervalo entre dosis de PG. Por esta razón, el principal objetivo de este trabajo fue comparar, por la vía cervical y con semen fresco, estos protocolos en base a PG, con el tradicional protocolo de P4-eCG.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fisiología reproductiva

En el proceso reproductivo intervienen tres elementos básicos: el hipotálamo, la hipófisis y las gónadas (eje hipotálamo-hipófisis-gonadal, Figura 1). En las neuronas secretoras del hipotálamo, se secreta GnRH o no en función de los estímulos a los esteroides ováricos (estradiol y progesterona). La GnRH se libera a la circulación portal hipotálamo-hipofisaria para secretar la hormona luteinizante (LH) (sobre todo) y también la hormona folículo estimulante (FSH) cuyo lugar de acción es el ovario, uniéndose a las células de la teca y la granulosa del folículo tomando parte activa en su crecimiento, desarrollo y subsiguiente ovulación, formación y mantenimiento de cuerpo lúteo (CL) de gestación o no. Estas gonadotropinas hipofisarias también actúan en el endometrio el cual sufre cambios estructurales en función de la fase del

ciclo, en relación al posible establecimiento de la gestación si se produce la fecundación (Abecia y Forcada, 2010).

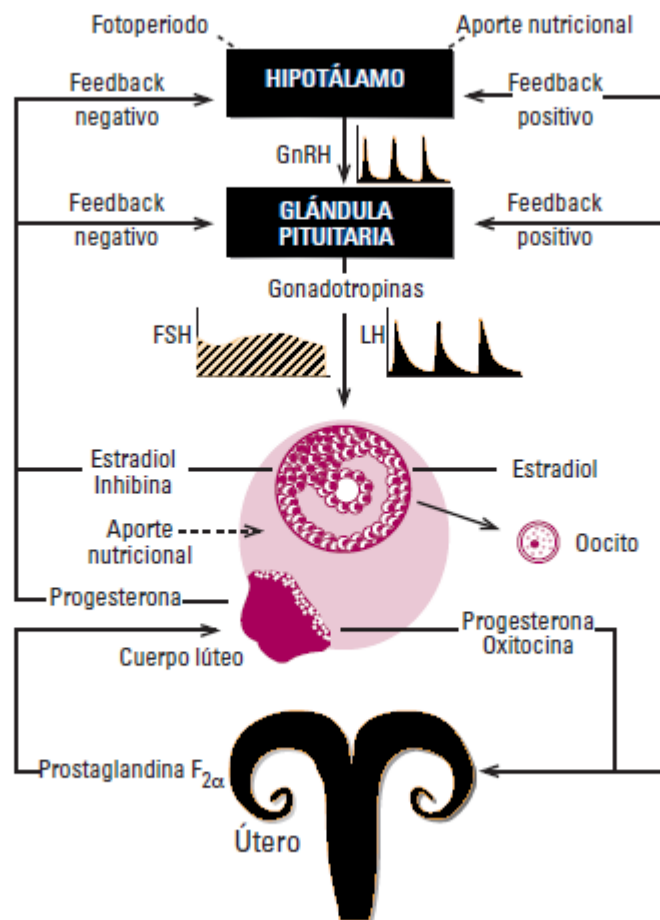


Figura 1. Representación esquemática del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (adaptado de Baird, 1983).

2.1.1 Estacionalidad reproductiva y ciclo estral en ovinos

La oveja es un rumiante poliéstrico estacional de día corto, es decir empieza a reproducirse cuando las horas luz disminuyen. Cuando los días comienzan a acortarse luego del solsticio de diciembre el fotoperiodo actúa estimulando el eje glándula pineal-hipotálamo-hipófisis-gonadal. La melatonina secretada por la glándula pineal hace de mediador en la respuesta a los cambios de las horas-luz, es decir actúa como una señal para el eje neuroendocrino (Durán del Campo, 1980). Esta estacionalidad también está ligada a la raza, de modo que las razas originarias de latitudes cercanas al ecuador manifiestan temporada reproductiva durante la

mayor parte del año, y aquellas de origen más extremo presentan una estación de cría más marcada (Fernández Abella, 1993). Respecto a las razas criadas en nuestro país, según ensayos realizados, se confirman las mismas variaciones estacionales observadas en otros países (Fernández Abella, 1993. Cuadro 1).

Cuadro 1. Duración de la estación de cría en distintas razas en Uruguay (adaptado de Fernández Abella, 1993).

| | Comienzo | Fin |
|---------------------------------------|-------------------|-------------|
| Merino | Setiembre-octubre | Junio-julio |
| Criolla Ideal Merilin | Octubre-noviembre | Junio-julio |
| Corriedale Hampshire Down | Diciembre-enero | Junio-julio |
| Ile-De-France Romney Marsh | Enero-febrero | Junio-julio |
| Lincoln Texel | Febrero-marzo | Junio-julio |

La especie ovina presenta una duración de ciclo estral con una media de 17 días, abarcando un rango de 15 a 19 días (Ungerfeld, 2001). Tomando como día 0 el inicio del estro, el ciclo estral se puede dividir en dos fases (figura 2): una fase luteal caracterizada por altos niveles de progesterona generados por el CL (Hansel y Convey, 1983), que se extiende desde el día 2 del ciclo, hasta aproximadamente el día 13 (Ungerfeld, 2001), y otra fase folicular que se caracteriza hormonalmente por la secreción de estradiol por parte de los folículos dominantes (Evans y col., 2000; Evans, 2003), que va desde la luteolisis (regresión del CL) que se produce el día 13-14 hasta el día 1 (Ungerfeld, 2001). El estro, entendido como el momento en que la hembra muestra signos de aceptación del macho, dura entre 24 y 36 horas dependiendo de la raza, la edad, la estación y la presencia del macho; ocurriendo la ovulación entre 24 a 36 horas de comenzado el estro (Hafez y col., 1992).

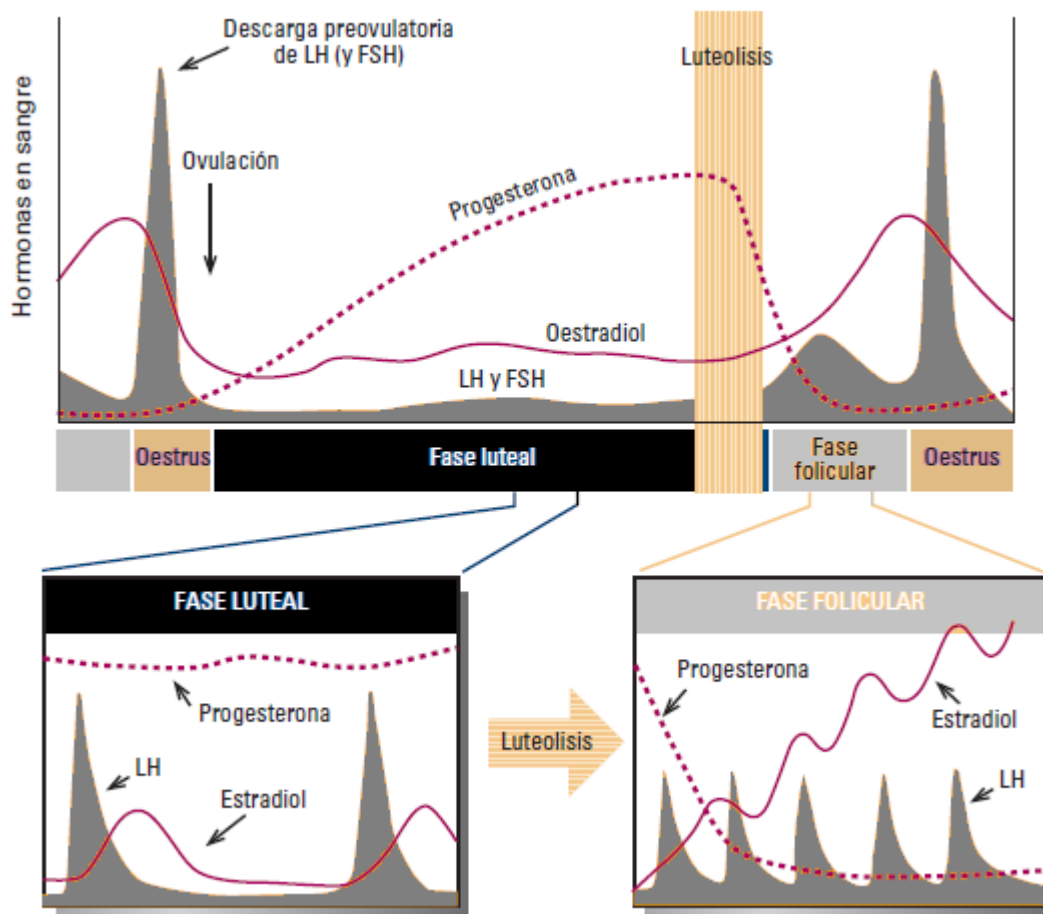


Figura 2. Representación esquemática de los cambios hormonales en las diferentes fases del ciclo estral de la oveja (adaptado de Martin y Thomas, 1990).

Con la incorporación de la ultrasonografía transrectal para el estudio de la fisiología ovárica en pequeños rumiantes (Schrick y col., 1993; Ginther y col., 1994; Ravindra y col., 1994; Rubianes y col., 1996) se pudo demostrar que la emergencia de los folículos es dinámica, ocurriendo en ondas (ver figura 3). Esta dinámica folicular es definida como un proceso continuo de crecimiento y regresión de folículos antrales, que finaliza en la atresia o la ovulación (Lucy y col., 1992). Un rango de 2 a 5 ondas foliculares ocurren en cada ciclo interovulatorio pero el patrón predominante es de 3 ondas que emergen respectivamente alrededor de los días 0, 6 y 11 del ciclo estral ovino (Ginther y col., 1995; Leyva y col., 1999; Bartlewsky y col., 1999; Viñoles y col., 1999^a; Evans y col., 2000). En este sentido, cada onda está compuesta por 3 etapas, denominadas reclutamiento, selección y dominancia (Goodman y Hodgen, 1983).

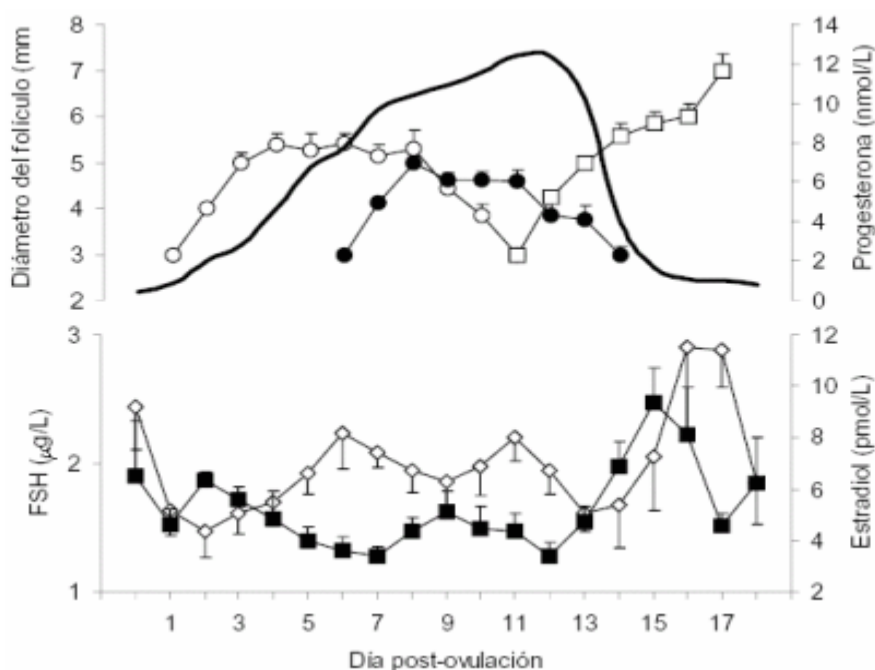


Figura 3. Onda de crecimiento folicular que tienen lugar a lo largo del ciclo estral de la oveja. Folículo mayor de la onda 1 (circulo blanco). Folículo mayor de la onda 2 (circulo negro) y folículo ovulatorio (cuadrado blanco) y sus relaciones con las concentraciones circulantes de progesterona (línea negra), FSH (rombo blanco) y estradiol (cuadrado negro) en ovejas con muy buena condición corporal durante el intervalo interovulatorio (adaptado de Viñoles y col., 2000).

Las fluctuaciones de las concentraciones séricas de la FSH están íntimamente asociadas con la emergencia de las ondas. Como se observa en la figura 3, un aumento de la FSH precede la emergencia de cada onda, dando lugar al reclutamiento folicular de aquellos folículos primordiales sensibles a la FSH (Picton y col., 1990; Ungerfeld y col., 2002). Estos folículos en desarrollo secretan inhibina, generando una disminución en los niveles de FSH, lo cual limita el número de folículos que continúan su crecimiento (McNeilly y col., 1991; Gibbons y col., 1997; 1999; Padmanabhan y col., 2002). Los folículos que siguen creciendo, presentan cambios en los receptores, logrando una modificación en la dependencia de FSH a LH (Campbell y col., 1999) sobre las células de la granulosa y de la teca, lo cual es muy importante en el mecanismo de selección del “folículo dominante” (selección folicular), el cual continúa creciendo a una tasa de 1 mm/día alcanzando su máximo tres días luego de la emergencia (Viñoles y col., 2001). Mientras crece, este folículo

dominante sintetiza estradiol, que también inhibe los niveles de FSH, impidiendo el reclutamiento de otros folículos de la misma onda, limitando así la cuota ovulatoria (Baird, 1983). Si bien cualquier folículo mayor de 2 mm es capaz de ovular aquellos con un tamaño igual o superior a 3,5 mm presentan una mayor capacidad de producción de estrógenos (E2), lo cual incrementa la posibilidad de ser dominantes y evitar su destrucción (Carson y col., 1978; Tsonis y Findlang, 1981; Huesh y col., 1984).

Este folículo preovulatorio (FPO) puede ser capaz de ovular siempre y cuando se encuentre en una fase folicular y se produzca, paralelamente un pico preovulatorio de LH (Driancourt y col., 1988; Price y Webb, 1989); en caso contrario, en un ambiente con altos niveles de progesterona (fase luteal), donde se inhiben los pulsos de LH (retroalimentación negativa sobre el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal); el folículo de tamaño ovulatorio entra en proceso de atresia, dando paso al desarrollo de otro folículo reclutado del grupo de folículos que responden a las gonadotropinas, que lo reemplaza (Campbell y col., 1995), formándose una nueva onda folicular, “recambio folicular”, siendo estimulada por la FSH que aumenta nuevamente (Ginther y col., 1995).

En torno a los días 12-14 del ciclo estral, desde el endometrio se inician los procesos que conducen la lisis del CL. Esto se produce por la acción de la prostaglandina (PGF2 α), la cual se sintetiza y libera en el endometrio uterino (Wathes y Lamming, 1995; Ungerfeld, 2002) disminuyendo la producción de progesterona (McCracken y col., 1970). Este proceso de luteólisis coincide con la fase de crecimiento de una onda folicular; donde comienza la fase folicular del ciclo estral. La disminución brusca de los niveles de progesterona, dan lugar a una mayor liberación de LH (deja de estar inhibida); necesaria para el desarrollo, maduración y ovulación del FPO (López-Sebastián y col., 1997; Adams, 1999). Dichos pulsos de LH, estimulan al folículo dominante a producir más E2 (retroalimentación positiva), que induce el pico preovulatorio de LH dando lugar a la ovulación del FPO (Baird, 1978; Duggavathi y col., 2005). La oveja es capaz de desarrollar más de un folículo dominante, fenómeno denominado co-dominancia, lo que permite ovulaciones múltiples (Scaramuzzi y col., 1993). Las ovulaciones múltiples pueden ocurrir por el reclutamiento de un mayor número de folículos dentro de una misma onda, o por la ovulación de folículos dominantes de dos ondas consecutivas (Scaramuzzi y col., 1993). La ovulación es un proceso reproductivo indispensable para la propagación

de las especies (Hartman, 1932; Espey, 1994). En esencia, consiste en la ruptura de la pared del folículo ovárico y la liberación de su contenido, incluyendo el oocito maduro, para dar lugar a un CL (Pineda, 1989); es decir las células foliculares se diferencian a células luteales que comienzan a producir progesterona (Murphy, 2000; Weems y col., 2006).

2.1.2 Perdidas reproductivas

Cuando ocurre la fertilización luego de la ovulación, se producen las primeras divisiones celulares del embrión en el oviducto, llegando al útero ovino aproximadamente el día 4 pos estro. Luego de varios procesos comienza la implantación, ocurriendo la unión final al endometrio a partir del día 16 (Winterberguer Torres y Sevellec, 1987). En el reconocimiento materno de la gestación, el embrión envía señales a la madre a partir del día 12 pos servicio que determinan la prolongación de la vida del CL, por lo tanto la síntesis y liberación de progesterona, la cual estimula funciones en el endometrio para llevar a cabo el mantenimiento de la gestación (Spencer y col. 2004a). Cuando existe alguna alteración en este proceso se pueden producir pérdidas reproductivas (embrionarias o fetales) las cuales generan pérdidas económicas para los sistemas de producción ovina (Fernández Abella, 1993). Las pérdidas embrionarias se pueden producir en dos momentos: antes del reconocimiento materno de la gestación (mortalidad embrionaria precoz, hasta los 19 días pos servicio), o después del reconocimiento materno (mortalidad embrionaria media o tardía, hasta los 35 días pos servicio) (Duran del Campo, 1980; Olivera y col., 2007).

Algunos factores que incrementan la mortalidad embrionaria:

Los factores ambientales afectan directa o indirectamente la reproducción (Duran del Campo, 1980). El estrés por calor podría afectar considerablemente la mortalidad embrionaria pero nuestras condiciones de campo no parecen ser tan extremas para ocasionar grandes pérdidas (salvo en los servicios de verano, Duran del Campo, 1980). Las altas precipitaciones dificultan la manifestación y detección de estros e incrementan las pérdidas embrionarias. Cuando se producen temporales y las ovejas han sido sincronizadas, las pérdidas pueden ser muy elevadas (Fernández Abella, 2006). Según Gun y Doney (1973), las precipitaciones fuertes

bloquean el estro, reducen la tasa ovulatoria (TO) e incrementan la mortalidad embrionaria precoz.

La nutrición puede afectar la vida embrionaria a través de cambios rápidos en niveles nutricionales (Duran del Campo, 1980). Largos periodos de restricción alimenticia (Kleemann y Walker, 2005) y/o muy intensos al comienzo de la gestación, pueden aumentar la mortalidad embrionaria (Duran del Campo, 1980).

Se ha demostrado que el estado corporal (EC) de las ovejas determina su desempeño reproductivo (Fernández Abella y Formoso, 2007). En este trabajo cuando las ovejas presentan una EC menor a 2,5 (escala 1 a 5, Rusell y col., 1969), la menor fertilidad se puede explicar por un incremento de las pérdidas embrionarias (22.7%).

El estado sanitario de los animales afecta también indirectamente la TO a través de las pérdidas de peso y EC (Nari y Cardozo, 1987). Fernández Abella y col. (2006), demostraron un efecto marcado del nivel de parasitosis (evaluado por hpg) sobre la TO, siendo esta un 15% inferior en los animales con nivel medio de parasitosis y de un 21% menor en los animales con nivel alto.

Las enfermedades febriles son factores importantes que afectan la mortalidad embrionaria a través del aumento de la temperatura corporal, como ejemplo claro de estas están las enfermedades podales las cuales producen disminución tanto en EC como en peso vivo de los animales (Mederos y col., 2001) y como fue mencionado anteriormente las pérdidas de ambos parámetros productivos afectan la mortalidad embrionaria.

2. 2 Inseminación artificial (IA)

Se entiende por IA, a la técnica de reproducción que consiste en introducir el material fecundante masculino por medios artificiales, en las vías genitales femeninas. Los medios mecánicos sustituyen a los órganos, sin necesidad de poner en presencia y en contacto a los progenitores (Fernández Abella, 1995). Es una biotecnología de la reproducción que permite una extensa variedad de ventajas en el campo de la genética y de la sanidad. El comienzo de la IA en ovinos en Uruguay data a fines de la década del 30 (Riet y col., 1938). A pesar del progreso tecnológico

que genera la IA, su uso no se ha extendido al mismo nivel que en el ganado vacuno (Duran del Campo, 1980; Gil, 2003).

2.2.1 Ventajas y desventajas de la IA

Las principales ventajas de la IA son: 1) progreso genético: que maximiza la utilización de machos con genes superiores pudiendo alcanzar un número altamente superior de hembras servidas en comparación con la monta natural; además se logra tener registros inequívocos del servicio y permite eliminar individuos infértiles o con características indeseables transmisibles a la progenie. 2) operativas: el uso de machos incapacitados por lesiones adquiridas o por edad, los cuales pueden continuar en servicio; permite reducir el número de machos en el predio, facilitando el manejo; admite el uso de semen congelado lo cual facilita el transporte del material genético entre cabañas distantes e incluso entre países; además permite la utilización de programas de sincronización de estros y servicios dentro y fuera de la estación reproductiva. 3) sanitarias: se evita el contacto macho-hembra lo cual previene la transmisión de enfermedades, principalmente las venéreas (Gil, 2003).

Las principales desventajas de la IA se originan, la mayoría, de errores en la aplicación de la técnica. En el caso de que la técnica se aplique correctamente, estas desventajas son muy escasas (Evans y Maxwell, 1987): 1) menor fertilidad: esto ocurre cuando hay fallas en la detección de estros o cuando el semen no es manejado correctamente por el operario. 2) costos: estos pueden ser relativos, ya que deben incluirse los beneficios de la técnica. 3) necesidad de personal capacitado (Gil, 2003).

2.2.2 Técnicas de IA

IA cervical: esta modalidad de inseminación se realiza mediante un vaginoscopio, el cual se introduce por la vagina de la oveja, depositando el semen en el orificio externo del cérvix. Tiene como ventaja que es un técnica sencilla de aplicar y que puede ser utilizada en diferentes condiciones de campo por técnicos entrenados, requiere poco tiempo por oveja y es muy económico si se consideran los resultados (Gil, 2003).

IA vaginal profunda o a ciegas: esta técnica consiste en depositar el semen cranealmente en la vagina, sin intentar ubicar el cérvix. La mayor ventaja es que es la técnica más sencilla de todas, rápida de realizar y requiere menos instrumentos que la anterior (Gil, 2003). La mayoría de los trabajos reportan resultados menores que la IA cervical (Durán del Campo, 1993), aunque también hay informes de resultados similares (Paulenz y col., 2000), cuando la dosis espermática es alta.

IA intrauterina laparoscópica: esta técnica se realiza mediante un laparoscopio. El acceso al útero se realiza a través del abdomen, utilizando semen congelado. La práctica de esta técnica es complicada y requiere de destreza por parte del inseminador. Las operaciones a realizar conllevan cierto riesgo para el animal, por lo que es vital la experiencia del inseminador (Abecia y Forcada, 2010). A esto se le suma el mayor costo, equipamiento de alta especialización, infraestructura e instalaciones más complejas (Gil, 2003).

2.3 Métodos de sincronización de estros y ovulaciones en ovinos

El control del ciclo estral, concretamente la inducción y sincronización del estro, se ha llevado a cabo en ovinos mediante el empleo de métodos farmacológicos y/o naturales. Entre los primeros se destacan el uso de la progesterona y sus análogos, administrados principalmente en forma de dispositivos intravaginales, y el uso de prostaglandina o sus análogos, administrados por vía parenteral. Entre los métodos naturales, destaca el uso de la bioestimulación ejercida por la presencia del carnero más conocido como “efecto macho”.

2.3.1 Métodos farmacológicos de sincronización de estros: protocolos de IATF

2.3.1.1 Protocolos en base al uso de Progesterona y/o progestágenos

Los métodos de sincronización del estro y de la ovulación que utilizan progesterona o sus análogos sintéticos (P4), se basan en sus efectos sobre la fase luteal del ciclo, simulando la acción de la progesterona natural producida en el CL después de la ovulación (Mejía y María, 2010), motivo por el cual los tratamientos tradicionales duran 12 a 14 días (Gordon, 1999), en donde se inhibe la GnRH (Uribe-

Velásquez y col., 2009; Abecia y col., 2012) y consecuentemente también la LH y la FSH (Aké y col., 2003). Por lo tanto, controla la vida del CL y las concentraciones circulantes de progesterona permitiendo la regulación del ciclo estral, presentando estro y ovulación tras su retirada (Robinson, 1965; Abecia y col., 2012). El uso de progesterona natural o P4 es una alternativa flexible, ya que pueden ser utilizados tanto en anestro estacional como en la estación reproductiva (principal ventaja) (Menchaca y Rubianes, 2004).

Generalmente, se administran por medio de dispositivos y/o esponjas intravaginales; siendo los más utilizados comercialmente la progesterona (en dosis de 300 mg habitualmente), el acetato de fluorogestona (FGA; entre 20 y 40 mg) y el acetato de medroxiprogesterona (MAP; dosis 60 mg), ya sea en forma de un dispositivo de liberación controlada conocido como CIDR (progesterona natural) o en forma de esponjas de poliuretano (MAP y FGA) (Ungerfeld y col., 2002; Mejía y María, 2010; Abecia y col., 2011; González-Bulnes y Contreras y Solis, 2012) sin diferencias en fertilidad entre dispositivos (Ungerfeld y Rubianes, 2002). Al momento de la retirada, y con la finalidad de mejorar la maduración folicular y la sincronía de la ovulación, habitualmente se combina con la administración de gonadotropina coriónica equina (eCG), en dosis que varían de 350 a 600 U.I., según raza, peso del animal y época del año (Roberts y Hafez, 1969; Langford y col., 1983; Greyling y col., 1997; Leyva y col., 1998), ocurriendo la ovulación a las 60 h de retirados los dispositivos (Maxwell, 1986).

Es recomendado realizar la IATF con aceptables resultados entre las 48 y 60 h de retirado el dispositivo, dependiendo de la vía de IA utilizada (cervical o uterina), y del tipo de preservación seminal realizada (Cognie y col., 1970; Colas y col., 1974). El uso de estas hormonas combinadas (P4-eCG) ha obtenido hasta el momento mejores resultados reproductivos que otros protocolos en base a PG (Olivera-Muzante y col., 2011a), pero con una fertilidad menor a un estro espontáneo (Hawk y Cooper, 1977; Larson y Ball, 1992).

La sincronización con P4 por 12 a 14 días (protocolo “tradicional” o largo), podría provocar una menor tasa de fertilidad (Camacho y col., 2008; Uribe-Velásquez y col., 2009), al promover la persistencia de un folículo dominante con la consecuente ovulación de ovocitos envejecidos y menos fértiles (Ungerfeld y Rubianes, 1999; Viñoles y col., 2001; Abecia y col., 2002; Aisen, 2004).

Si las ondas foliculares emergen cada 4 a 6 días, no parece justificado el uso de tratamientos hormonales tan prolongados. Se realizaron experimentos fuera (Ungerfeld y Rubianes, 1999; Ungerfeld y Rubianes, 2002) y durante la estación reproductiva (Viñoles y col. 2001; Vilariño y col. 2013) comparando estos tratamientos. Si bien los tratamientos cortos (5-7 días) no alcanzan una buena sincronización de los estros cuando no se asocian a una PG al final del tratamiento (menos ovejas en estro acumuladas hasta las 96 h), tuvieron una fertilidad significativamente mejor a los tratamientos largos cuando se utilizó monta natural hasta las 144 h pos retiro del dispositivo (Viñoles y col. 2001), pero no diferente utilizando monta natural (Ungerfeld y Rubianes, 1999), o en IATF por vía IU (Vilariño y col. 2013). La ovulación de folículos envejecidos no siempre se ha relacionado con una menor fertilidad. En ese sentido se obtuvieron embriones de calidad similar y porcentajes de pariciones similares, comparando ovejas que ovularon folículos jóvenes vs. folículos envejecidos (Evans y col., 2001). En resumen, los resultados de fertilidad a IATF en ovinos utilizando tratamientos cortos (5-7 días) o largos (12 a 14 días) resultan similares, adecuando el uso de uno u otro según necesidad, economía y disponibilidad (en caso de uso y reutilización de CIDRs) o practicidad (Menchaca y col., 2013).

Por otra parte, los protocolos de sincronización de estros basados en el uso de P4 y eCG presentan algunos inconvenientes de importancia: como ser más costosos y poco prácticos de aplicar, ocurrir pérdidas de dispositivos (Durán del Campo, 1980; Viñoles y col., 2007), generar desechos contaminantes para el medio ambiente (Martin y col., 2004; Menchaca y Rubianes, 2004; Olivera y Gil, 2005), producir adherencias y vaginitis (Duran del Campo 1980; González-Bulnes y col., 2005; Viñoles y col., 2006), debiendo utilizar antibióticos para evitarlo. Sumado a estos inconvenientes estos protocolos dejan residuos en carne y leche en los animales con un tiempo de espera para el consumo de 30 días luego de la administración de la medroxiprogesterona (esponjas vaginales Syntex®, Laboratorio Syntex), y/o de la eCG (Novormon® 500, Laboratorio Syntex). Todo esto genera una preocupación en los consumidores, que consideran aspectos del bienestar “humano-animal-ambiental”, siendo hoy en día relevantes para nuestros mercados (Martin y col., 2004; Olivera-Muzante y col., 2011a). Es decir alternativas más “limpias, verdes y éticas” para la producción de materias primas. El uso reiterado de eCG puede generar además anticuerpos anti-eCG que alterarían el pico pre ovulatorio de LH,

con la consecuente baja en la fertilidad (Roy, 1999; Drion y col., 2001a, b). Es por ello, que en busca de la masificación del uso de la IATF, parece importante identificar y validar otros protocolos de sincronización de estros que permitan simplificar, economizar y equiparar resultados obtenidos con el protocolo de P4-eCG.

2.3.1.2 Protocolos en base al uso de Prostaglandina y sus análogos sintéticos

La PGF₂ α es el factor luteolítico en rumiantes, por ello, esta hormona y sus análogos sintéticos (PG), son utilizados para la inducción y sincronización de estros y ovulaciones (Weems y col., 1999). La aplicación de estos tratamientos induce la lisis del CL (McCracken y col., 1970), y en consecuencia, la aparición de una fase folicular acompañada de estro y ovulación (Acritopoulou y col., 1977). Presenta como desventajas, que su utilización se restringe a la estación reproductiva, ya que necesita de un CL activo, y además si no se conoce el estado reproductivo y manejo previo de la majada a la cual se va aplicar la PG, esta puede inducir aborto en hembras gestantes, provocando pérdidas reproductivas. Sin embargo la PG es una buena alternativa desde el punto de vista de una producción “limpia y verde”, ya que se metaboliza en un solo pasaje por el pulmón (99%), por lo tanto no se acumula en los tejidos (Moller-Holtkamp, 1980; Davis y col., 1980; Light y col., 1994; Fierro y col., 2013). Además presenta un considerable menor costo respecto al método P4-eCG; su vía de administración es intramuscular, lo que conlleva a una mejora en el manejo, sanidad y bienestar de las hembras ovinas (Abecia y col., 2012); debido a esto, no se producen problemas por vaginitis o adherencias, así como contaminación medio ambiental (Fierro y col., 2013).

Diversos análogos sintéticos han sido desarrollados de manera de retrasar la rápida degradación de la PGF₂ α (Fierro y col, 2013). El más ampliamente utilizado es el Clorprostenol (Binder y col., 1974), con propiedades biológicas más selectivas sobre el CL (Dukes y col., 1974), siendo 100 veces más potente que la PGF₂ α y con mayor vida media en sangre (Baird y Scaramuzzi, 1975). El uso del análogo sintético ONO 1052 (Delprostenate), fue reportado en pocos artículos (Bonifacino y Aragunde, 1981) a pesar de sus buenos resultados (Fierro y col., 2013, Cuadro 2). Loubser y van Niekerk (1981) utilizaron dos dosis de otro análogo sintético

(Dinoprost) separadas por 11 días, con resultados reproductivos aceptables con una dosis de 10 mg.

Cuadro 2: Diferentes análogos sintéticos de PGF₂α y sus respectivas dosis (adaptado de Fierro y col., 2013).

| Referencia | Análogo sintético | Dosis |
|------------------------------------|---|--|
| Hearnshaw y col., 1974 | ICI 79939 | 31,2 mg* |
| Baird y Scaramuzzi, 1975 | 16-aryloxy prostaglandina (Clorprostenol; ICI 80996) | 50 mg* |
| Hughes y col., 1976 | 15-[RS-metil-13,14-dihidro-PGF ₂ α (ONO 453) | 2 mg* |
| Acritopoulou-Fourcroy y col., 1977 | 16-aryloxy prostaglandina (Clorprostenol; ICI 80996) | 100 mg* |
| Bonifacino y Aragunde, 1981 | Delprostenate (ONO 1052) | 40 mg* si se aplica una sola inyección 35 mg* si se aplican dos inyecciones |
| Loubser y van Niekerk, 1981 | Dinoprost | 10 mg* si se aplica dos inyecciones separadas 11 días |

*Dosis mínimas necesarias para producir luteólisis

2.3.1.3 Protocolos en base a GnRH

Se ha adaptado el método de sincronización de estros y ovulaciones en bovinos, denominado "Ovsynch", a ovinos (Deligiannis y col., 2005; Titi y col., 2010). Este método se utiliza en estación reproductiva, consistiendo en la administración inicial de un análogo de GnRH (Día 0), seguido a los 5 días por una inyección de PG, a las 36h más tarde se administra una segunda dosis de GnRH, de manera de sincronizar las ovulaciones, y realizándose la IA (laparoscópica) a las 12-14h posteriores; obteniendo aceptables resultados en concepción (Deligiannis y col., 2005). Oliveira y col. (2009), obtuvo resultados en porcentaje de preñez significativamente mayores con el protocolo Ovsynch cuando lo comparó con un grupo control sincronizado con esponjas con MAP durante 14 días (P4-ecG).

Existen trabajos realizados, tanto en ovinos como en caprinos, donde se ha combinado la GnRH y la PG con la administración de progestágenos en forma de esponjas durante 5 días, al momento de la administración de la GnRH, pudiendo ser eficaz en la sincronización de estros y en la mejora de la fecundidad (Titi y col., 2010). Aunque el uso de la GnRH y PG (protocolo Ovsynch) obtuvo aceptables resultados, la adición de progestágenos pareció mejorar los parámetros reproductivos, posiblemente a través de la mejora del desarrollo folicular (Titi y col., 2010). La progesterona puede prevenir la ovulación durante el periodo en el que se puede producir luteólisis espontáneas en animales cuyos folículos dominantes no son sensibles a la inyección de GnRH (Titi y col., 2010). Dicha combinación puede dar mejores respuestas que el protocolo tradicional de P4+ecG.

2.4 Respuesta fisiológica luego de la administración de una PG

Las concentraciones plasmáticas de progesterona luego de producida una luteólisis inducida por PG, disminuyen bruscamente en comparación con una luteólisis natural (Stacey y col., 1976), por lo cual se puede acortar el ciclo y presentar el estro con anterioridad (Cárdenas y col., 2004; Fierro y col., 2011). La regresión luteal completa se logra de 6 a 24 h en una luteólisis inducida, mientras que en la natural se logra a las 72 h (Haresign y Acritopoulpou-Fourcroy, 1978; Wiley y col., 1997).

Las características de la descarga de LH luego de la administración de la PG, fueron similares a la que se produce naturalmente (Acritopoulpou-Fourcroy y col., 1977; Haresign y col., 1978; Thimonier, 1979); sin embargo se produce una segunda descarga de LH más leve, ocurriendo de 7 a 8 (Bindon y col., 1979) o 10,5 h (Carlson y col., 1973) después de la inyección de PG; la cual se ve estimulada por la retroalimentación positiva generada entre el primer pico de LH y el estradiol (Carlson y col., 1973).

Respecto al diámetro folicular luego de la administración de PG, hay controversia; Houghton y col. (1995) informaron que presenta un menor diámetro respecto a ovejas no tratadas; en cambio Fierro y col. (2011) informaron un mayor diámetro luego de la luteólisis inducida con PG. Del mismo modo, Nephew y col. (1991) y Letelier y col. (2011) no encontraron diferencias significativas en el diámetro folicular. Además, Fierro y col. (2011) informaron que el mayor diámetro folicular se

asoció con una tasa de crecimiento más rápida de los folículos en las ovejas inducidas con PG.

Considerando el efecto del uso de PG sobre la TO y prolificidad, Fierro y col. (2011) y Forichi y col. (2004), informaron una disminución de esta cuando la PG se administra durante la fase luteal temprana respecto a un estro de origen natural. Sin embargo Letelier y col. (2011) constataron un aumento de la TO cuando la PG se administró en la fase lútea media, explicándose por el desarrollo de un FPO “menos dominante” con una capacidad esteroidogénica inferior manteniendo las concentraciones de FSH por encima del umbral estimulando la selección de múltiples folículos ovulatorios; o por la posibilidad de la ocurrencia de la ovulación de folículos provenientes de la segunda y tercer onda (Bartlewsky y col., 1999; Gibbons y col., 1999). Sin embargo, Bonino y Grela (2014) sobre raza Corriedale no encontraron diferencias significativas en TO cuando la PG fue administrada en dos dosis separadas 7, 10, 12, 14 ó 16 días ($1,33\pm 0,50$, $1,33\pm 0,50$, $1,33\pm 0,50$, $1,46\pm 0,52$ ó $1,43\pm 0,52$ respectivamente).

En resumen, la respuesta a la PG es dependiente de la fase del ciclo estral al momento de su administración (Rubianes y col., 1997), debido a los cambios dinámicos en el crecimiento del folículo que se producen por progesterona, FSH y LH en la fase luteal (González-Bulnes y col., 2005). Las alteraciones de la función esteroidogénica del FPO, la TO y la prolificidad tras la administración de PG, son controvertidos.

2.5 Protocolos en base a PG utilizados en sincronización de estros

Al administrar una dosis de PG a un grupo de ovejas, éstas se encuentran en diferentes días del ciclo estral (Acritopoulou y Haresing, 1980; Houghton y col., 1995), y por lo tanto en diferentes etapas de desarrollo luteal y/o folicular. A mayor edad del CL la respuesta en horas desde la inyección de la PG al comienzo del estro será más tardía (Houghton y col., 1995). Además si al momento de la inyección de PG el folículo dominante se encuentra en la fase de crecimiento o estático se producirá la ovulación en un corto periodo de tiempo, mientras que si se encuentra en regresión, tendrá que emerger una nueva onda folicular que originará el FPO, ocurriendo la ovulación en forma más tardía (Viñoles y Rubianes, 1998). Conociendo esta dificultad para determinar con exactitud la fase del ciclo estral de un grupo de hembras, se hace necesaria la aplicación de 2 dosis de PG (Abecia y col., 2012). La

segunda inyección de PG permite mejorar la sincronía del estro, sin embargo el inicio del estro y la ovulación se dispersan en el tiempo de acuerdo a los diferentes intervalos de aplicación entre las dosis de PG, como se muestra en el cuadro 3 (Fierro y col., 2013).

Cuadro 3: Intervalo de tiempo (h) al inicio del estro (PG-IE) y la ovulación después de la segunda inyección de PG en ovejas sincronizadas con un régimen de doble inyección de PG con diferentes intervalos entre tratamientos (adaptado de Fierro y col., 2013).

| Referencias | Intervalo entre las PG (días) | PG-IE | Ovulación |
|--------------------------------------|-------------------------------|-------------------------|------------|
| Rubianes y col., 2003 | 7 | 40,6± 0,5 | 60,8 ± 1,8 |
| Contreras-Solis y col., 2009 | 7 | - | 61,1 ± 1,1 |
| Acritopoulou y col., 1978 | 9 | 38,8 ± 1,3 | 73,1 ± 1,6 |
| Haresing y Acritopoulou y col., 1978 | 9 | 38,6 ± 0,8 | 72,9 ± 1,5 |
| Acritopoulou, 1979 | 9 | 43,5 ± 6,0 ^a | - |
| | 9 | 49,9 ± 3,7 ^b | - |
| Godfrey y col., 1997 | 10 | 69,6 ± 9,6 | - |
| Das y col., 1999 | 10 | 51,6 ± 2,4 | - |
| Oyediji y col., 1990 | 11 | 41,7 ± 2,2 | - |

^a Estación reproductiva media; ^b Estación reproductiva tardía.

Tradicionalmente la sincronización de estros con PG estuvo basada en tratamientos de una o dos dosis de PG separadas 9 a 12 días, que presentaron en términos globales dos inconvenientes importantes: 1) una gran dispersión en la manifestación de estros (24 a 120 h) y, 2) una aparente menor concepción de los mismos en comparación con los protocolos en base a P4-eCG y/o estro natural (Hackett y col., 1981; Loubser y van Niekerk, 1981, Duran del Campo, 1982). Las diferentes condiciones de producción comparadas (biotipos raciales, latitudes), el bajo número de animales empleados en alguno de estos ensayos, y la variabilidad de resultados alcanzados, conllevan a no poder sacar conclusiones claras al respecto, y a limitar hasta el momento su recomendación de uso como protocolos de IATF en ovinos. Por esta razón fueron desestimados como alternativas para realizar IATF (Menchaca y Rubianes, 2004). En el cuadro 4, se muestran los resultados de

fertilidad con diferentes intervalos de separación entre dosis de PG, así como la comparación con protocolos en base a P4-eCG.

Cuadro 4: Resultados de fertilidad obtenidos con varios protocolos basados en PG, con diferentes modificaciones, comparados con protocolos en base P4-eCG.

| Referencias | Protocolos | n | Tipo de servicio | Preñez (%) |
|------------------------------------|-----------------------|----|------------------------|-------------------|
| Boland y col., 1978a | 2 PG 9d | 26 | M.N. | 65 |
| | 2 PG 9d + eCG | 24 | M.N. | 53,5 |
| | 2 PG14d | 26 | M.N. | 42,1 |
| | 2 PG 14d + eCG | 27 | M.N. | 71,4 |
| | MAP 14d | 23 | M.N. | 72,7 |
| | MAP 14d + eCG | 23 | M.N. | 85,7 |
| Loubser y van Niekerk, 1981 | 2 PG 11 d (5 mg/inj) | 28 | IATF cervical 20 y 32h | 59,1 ^x |
| | 2 PG 11 d (10 mg/inj) | 28 | | 75,3 ^y |
| Hackett y col., 1981 | 2 PG 11 d | 31 | IATF cervical 60h | 35 |
| | | 31 | IATF cervical 72h | 52 |
| | | 29 | IATF cervical 60 y 72h | 52 |
| Acritopoulou-Fourcroy y col., 1982 | 2 PG 12 d | 42 | IATF cervical 56h | 54,8 ^x |
| | | 32 | IATF cervical 60h | 37,5 ^y |
| | | 39 | IATF cervical 66h | 30,8 ^y |
| | | 42 | IATF cervical 56 y 66h | 61,9 ^x |
| | MAP y eCG | 45 | IATF cervical 55h | 37,8 ^y |

Las letras diferentes indican diferencias estadísticas ($P < 0,05$).

M.N.: monta natural; MAP: acetato de medroxiprogesterona; eCG: gonadotropina coriónica equina.

La fertilidad en ovejas con estros inducidos, tanto con PG como con P4, generalmente es menor, con respecto a ovejas no tratadas (Gordon, 1999; Fierro y col., 2011). Esto se ha asociado con alteraciones en las contracciones del miometrio (Davies y col., 2006), donde una disminución en el número de contracciones uterinas hacia el oviducto resulta en menos espermatozoides que llegan al sitio de fertilización (Hawk y Conley, 1975; Hawk y Cooper, 1977; Bartlewsky y col., 2003). También se reportan alteraciones en la mucosa vaginal afectando el transporte espermático desde el cuello uterino hacia el cuerpo del útero (Rubianes y col., 1997). La disminución de la capacidad esteroidogénica del FPO, que se ha comunicado al usar métodos hormonales (White y col., 1987), afectaría el transporte

de gametos, debido a que los esteroides son los encargados de preparar al oviducto y útero para la fecundación y el transporte del embrión y la inducción de las contracciones musculares de dicho órgano, por lo que esto se ve afectado, disminuyendo el éxito reproductivo (Meikle y col., 2001; Sosa y col., 2008). La recuperación de embriones fue similar en ovejas tratadas con PG en comparación con ovejas tratadas con P4 (Mutiga y Baker, 1982; Gonzales-Bulnes y col., 2005), pero menor en comparación con un estro espontáneo (Schiewe y col., 1990; Fierro y col., 2011), sin embargo, la calidad del embrión no fue diferente (Fierro y col., 2011).

2.6 Protocolo Synchrovine®

Contrariamente a lo que se sostenía por algunos autores (Acritopoulou y Haresign, 1980) se ha demostrado que el CL es refractario a la PG solo en los primeros dos días pos ovulación (Rubianes y col., 2003; Contreras-Solis y col., 2009). Basándose en ello, Rubianes y col. (2004) proponen acotar el intervalo entre dosis de PG para ser utilizado en IATF. Este hallazgo dio lugar a desarrollar un protocolo que consistió en la administración de 2 dosis de PG separadas 7 días al cual llamaron Synchrovine®. De esta manera, sin conocer el momento del ciclo estral durante el cual se administra la primera dosis, al momento de administrar la segunda dosis, los CLs tendrán entre 3 a 5 días y todas las ovejas se encontraran en la primer onda de desarrollo folicular (Fierro y col., 2010). El uso de este protocolo, determinó la sincronización del 78% de los estros entre las 24 y 48 h, y las ovulaciones entre las 48 y 72 h de administrada la segunda dosis; lo que permitió su uso para IATF (Menchaca y col., 2004).

En la aplicación de este protocolo a nivel experimental y comercial, los resultados obtenidos han sido variables y generalmente bajos, no superando en promedio el 50% de fertilidad (Menchaca y col., 2004; Olivera y col., 2007; Fierro, 2010).

2.7 Modificaciones en los protocolos en base a PG.

En base a los magros y variables resultados que se obtuvieron con el uso del protocolo Synchrovine®, se han planteado diferentes alternativas para poder

mejorarlos. Con esta finalidad se evaluó la detección de estros (Forichi y col., 2004), la dosis de PG (80 vs 160 µg de Delprostenate, Glandinex®; Olivera y col., 2004a, b), la inclusión de un análogo sintético de GnRH para mejorar la sincronización de la ovulación (Gil y col., 2004; Correa, 2005; Olivera-Muzante y col., 2011b, 2013), diferentes categorías de las hembras (Olivera y col., 2004b; 2006); el intervalo entre las dosis de PG (8 vs. 7; Olivera y col., 2007., 2011b), el momento más apropiado para la inseminación (42 vs. 48 vs. 54 h) con distintos métodos de preservación seminal (Menchaca y col., 2004; Fierro y col., 2007; Fossati y col., 2008; Bottaro, 2009), la asociación con el efecto macho (Contreras-Solis y col., 2009), diferentes vías de deposición seminal (cervical vs. Intrauterina, Olivera-Muzante y col., 2011b), y un programa de alimentación focalizada (Fierro y col., 2014). Todo esto sin obtener impactos relevantes en ninguna de las variantes estudiadas (cuadro 5).

Cuadro 5: Modificaciones realizadas al protocolo Synchrovine® y sus resultados de fertilidad (%) y prolificidad (adaptado de Fierro, 2010).

| Referencia | Protocolo | n | Fertilidad (%) | Prolificidad |
|------------------------------|--|-----|------------------|-------------------|
| Menchaca y col., 2004 | Synchrovine® IATF 42h semen fresco | 152 | 36 ^a | - |
| | Synchrovine® IATF 48h semen fresco | 120 | 25 ^{ab} | - |
| | Synchrovine® IATF 54h semen fresco | 164 | 22 ^b | - |
| Olivera-Muzante y col., 2006 | Synchrovine® IATF 44h Borregas | 79 | 37 ^a | 1,03 ^a |
| | Synchrovine® IATF 44h Ovejas | 90 | 40 ^b | 1,19 ^b |
| Gil y col., 2006 | Synchrovine® IU Ovejas semen congelado | 93 | 13 ^a | 1,00 ^a |
| | Synchrovine® IU Borregas semen congelado | 86 | 13 ^a | 1,08 ^a |
| Fossati y col., 2008 | Synchrovine® IATF 42h semen fresco | 82 | 27 ^{ab} | 1,09 ^a |
| | Synchrovine® IATF 48h semen fresco | 96 | 31 ^b | 1,03 ^a |
| | Synchrovine® IATF 54h semen fresco | 90 | 26 ^{ab} | 1,04 ^a |
| Bottaro, 2009 | Synchrovine® IATF 42h semen refrigerado | 89 | 6 ^a | 1,00 ^a |
| | Synchrovine® IATF 48h semen refrigerado | 89 | 24 ^b | 1,00 ^a |
| | Synchrovine® IATF 54h semen refrigerado | 91 | 22 ^b | 1,05 ^a |
| | Synchrovine® IATF 48h semen fresco | 96 | 31 ^b | 1,03 ^a |

| | | | | |
|-------------------------------|--|-----|-------------------|-------------------|
| Contreras-Solis y col., 2009 | Synchrovine® IATF 48h + EM | 24 | 62 ^a | - |
| | Synchrovine® IATF 55h + EM | 25 | 44 ^b | - |
| Olivera-Muzante y col., 2011b | Synchrovine® IATF 42h | 145 | 45 ^a | 1,09 ^a |
| | Synchrovine® IATF 48h | 145 | 51 ^a | 1,04 ^a |
| | Synchrovine® 8 días entre PG IATF 42h | 147 | 33 ^b | 1,02 ^a |
| | Synchrovine® 8 días entre PG IATF 48h | 146 | 29 ^b | 1,19 ^b |
| | Synchrovine® AD PGF2 α | 64 | 42 ^a | 1,11 ^a |
| | Synchrovine® BD PGF2 α | 63 | 24 ^b | 1,13 ^a |
| Fierro y col., 2011 | Synchrovine® IATF IU semen fresco | 135 | 62 ^a | 1,25 ^a |
| | Estro Espontáneo IU semen fresco | 73 | 85 ^b | 1,50 ^b |
| Olivera-Muzante y col., 2013 | Synchrovine® | 101 | 42,6 ^a | 1,09 ^a |
| | Synchrovine® + GnRH 24h | 98 | 10,2 ^b | 1,00 ^a |
| | Synchrovine® + GnRH 36h | 95 | 33,7 ^a | 1,13 ^a |
| Fierro y col., 2014 | Synchrovine® | 100 | 46 ^a | 1,09 ^a |
| | Synchrovine® + Suplementación protéica | 93 | 56 ^a | 1,06 ^a |

Las letras diferentes dentro de cada trabajo indican diferencias estadísticas ($P < 0,05$).

IATF: Inseminación Artificial a tiempo Fijo; IU: IA intrauterina; EM: efecto macho; AD: alta dosis; BD: baja dosis; SupPr: suplementación proteica.

Considerando que no se lograron mejorías sustanciales de este protocolo, se planteó buscar la razón de ello. Fierro (2010), en un estudio de carácter básico sugirió que los bajos resultados reproductivos del protocolo Synchrovine® se podrían asociar a un ambiente uterino con crecientes pero bajas concentraciones de progesterona durante el desarrollo del FPO, debido a la presencia de un CL de tan solo 3-5 días de edad. Esto llevaría a un FPO de mayor diámetro asociado con una tasa de crecimiento folicular mayor, lo que se asociaría finalmente, con una menor TO, fertilidad, prolificidad y fecundidad observada con el protocolo Synchrovine® cuando se lo comparo con un estro espontáneo (Fierro y col., 2011). En trabajos anteriormente presentados se describió que los folículos inducidos a ovular después de un tratamiento con PG, presentarían menos células en la granulosa, por lo que podría disminuir su capacidad esteroideogénica (Nephew y col., 1991; Wiley y col., 1997), resultando en el desarrollo de un CL con vida media más corta que produciría menos cantidad de progesterona (White y col., 1987).

Existen reportes internacionales previos, del uso de protocolos de más días de separación entre las dosis de PG (Boland y col., 1978a; Loubser y van Niekerk, 1981; Hackett y col., 1981; Acritopoulou-Fourcroy y col., 1982; ver cuadro 4), que parecerían tener mejores resultados reproductivos en términos numéricos que el protocolo Synchronone®; donde indican que un intervalo de 12-14 días entre dos inyecciones de PG da resultados comparables, y donde la reducción de este intervalo a 8-9 días es seguida por una caída en los resultados de fertilidad (Fairnie y col., 1977; Greyling y van der Westhuysen, 1980b), además de un incremento en el porcentaje de ovejas en estro y mayor tasa de preñez cuando se adiciono una fuente de P4 externa 8 días antes de la inyección de PG (proporcionada por dispositivos intravaginales; Loubser y van Niekerk, 1981). Por ello, Fierro y col. (2013) plantearon en su trabajo de revisión, la hipótesis de que una mayor separación entre las dosis de PG podría generar un adecuado desarrollo folicular en un ambiente con mejores niveles de progesterona plasmática, con mejor calidad de los ovocitos generados y/o calidad embrionaria, y en consecuencia con mejores resultados reproductivos finales. Sin embargo no se conocía a ese momento, y en nuestras condiciones de explotación, que separación entre dosis de PG permitiría realizar IATF, y cuál sería la hora de inseminación a utilizar. Intentando contestar estas interrogantes, se plantearon ensayos en la raza Corriedale comparando protocolos con 10, 12, 14 o 16 días de intervalo entre dosis de PG. Por un lado se observaron diferencias en respuesta estral acumulada y sincronía estral (a favor de 10 y 12 días respecto a 16 días de separación entre dosis de PG; Dutra da Silveira y Soler, 2013), pero no así en el intervalo segunda PG-inicio del estro, diámetro folicular máximo y final, dinámica folicular preovulatoria, u hora de ovulación pos segunda PG (Hourcade y Pechi, 2014). Sin embargo, realizando IA con semen fresco por vía cervical sobre estro detectado, la concepción de los grupos de 14 y 16 días, fue superior a los grupos de 10 y 12 de separación entre dosis de PG ($P < 0,05$), sin diferencias significativas ($P > 0,05$) con un grupo control de estro espontáneo (Dutra da Silveira y Soler, 2013). Finalmente, Bonino y Grela (2014), confirmando la hipótesis previamente planteada, no obtuvieron diferencias significativas en el porcentaje de ovejas que ovularon, ni en TO entre los grupos comparados ($P > 0,05$), sin embargo el protocolo de 7 días de separación entre PG presentó un menor nivel ovulatorio que los protocolos de 14 y 16 días de separación entre dosis ($P < 0,05$). En cuanto a respuesta reproductiva, obtuvieron una mayor tasa de NR_D21, fertilidad y

fecundidad a la IATF en los protocolos de 12, 14 y 16 días, respecto a los de 7 y 10 días de separación entre PG ($P<0,05$), no existiendo diferencia en prolificidad entre grupos comparados ($P>0,05$, cuadro 6).

Cuadro 6: Respuesta reproductiva en ovejas sincronizadas con un análogo sintético de PGF2 α (PG) administrado a diferentes intervalos de tiempo (Bonino y Grela, 2014).

| Grupo (n) | NR_D21 (%) | Fertilidad (%) | Prolificidad | Fecundidad (%) |
|------------------|-------------------|-------------------|------------------------------|-------------------|
| PG7 (95) | 35,8 ^a | 32,6 ^a | 1,19 \pm 0,40 ^a | 38,9 ^a |
| PG10 (96) | 33,3 ^a | 31,3 ^a | 1,30 \pm 0,47 ^a | 40,6 ^a |
| PG12 (96) | 50,0 ^b | 49,0 ^b | 1,32 \pm 0,47 ^a | 64,6 ^b |
| PG14 (94) | 61,7 ^b | 59,6 ^b | 1,29 \pm 0,49 ^a | 76,6 ^b |
| PG16 (98) | 61,2 ^b | 59,2 ^b | 1,26 \pm 0,44 ^a | 74,5 ^b |

a, b igual columna: $P<0,05$.

PG7, PG10, PG12, PG14, PG16: dos dosis de un análogo sintético de PG separadas 7, 10, 12, 14 ó 16 días respectivamente. Día 0: día de la IATF. NR_D21 (tasa de no retorno al estro desde el Día 12 al 21 pos IATF; ovejas que no retornan al estro/total de ovejas*100). Fertilidad (%): ovejas gestantes/total de ovejas*100. Prolificidad: fetos/oveja gestante. Fecundidad (%): fetos/total de ovejas*100 al Día 60.

No se conocen sin embargo, para nuestras condiciones de explotación, resultados utilizando intervalos de separación intermedios a los ya estudiados (13 ó 15 días), ni resultados comparativos con el protocolo tradicional de sincronización de estros en base a P4-eCG. La validación de estos resultados de IATF vía cervical con protocolos en base a PG, y su contrastación con el protocolo tradicional de P4-eCG, es de sumo interés para masificar esta biotecnología, y para hacer más práctica y viable la incorporación de mejora genética en los sistemas productivos, constituyéndose en el principal objetivo del presente trabajo experimental.

3. HIPÓTESIS

La administración de dos dosis de PG inyectadas en intervalos entre 12 y 16 días de separación no genera diferencias entre grupos en respuesta ovulatoria y/o reproductiva a la IATF, y equipara resultados obtenidos con el protocolo de P4-eCG.

4. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo fue el estudio de la respuesta reproductiva a la IATF de ovejas sincronizadas con dos dosis de PG administradas a diferentes intervalos de tiempo (12, 13, 14, 15 ó 16 días respectivamente) y compararlas con el protocolo tradicional de P4-eCG.

El objetivo específico fue estudiar la respuesta ovulatoria (porcentaje de ovejas que ovulan, TO y nivel ovulatorio) en la categoría multíparas, y la respuesta reproductiva de estos protocolos (porcentaje de no retorno al estro a 21 días-NR_D21-, fertilidad, prolificidad y fecundidad a los 60 días pos IATF) en ovejas multíparas y nulíparas, realizar la comparación en estas variables con el protocolo tradicional de P4-eCG.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental se realizó en la Escuela Agraria-UTU “La Carolina” (Ruta 23 km 162,5; Ismael Cortina, Flores, Uruguay, 33°S – 57°W), en estación reproductiva (meses de marzo a junio de 2013). Los procedimientos experimentales fueron puestos a consideración y avalados previamente por el Comité de Bioética Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República (Exp: 111400-000079-12).

5.1 Animales

Se utilizaron 610 ovejas de la raza Corriedale reproductiva y sanitariamente aptas al momento del servicio: 440 ovejas multíparas con un promedio de PV de 54,2±5,5 kg (medias ±DE) y CC de 3,1±0,4 (escala 1-5; Russell y col., 1969), y 170

ovejas nulíparas con promedio de $49,6 \pm 4,9$ kg de PV y CC de $3,3 \pm 0,3$. Se utilizaron 9 carneros de raza Corriedale, reproductivamente aptos (clínica y serológicamente: libres de *Brucella ovis*, DILAVE-MGAP, Montevideo, Uruguay), a los cuales se les realizó una evaluación seminal previo a ser utilizados.

5.2 Manejo nutricional

La alimentación de los animales se basó en campo natural (suelos de Cristalino) antes, durante y después del experimento, con una disponibilidad promedio inicial de 1956 ± 1766 kg/MS/ha (6,7% de PB, 2,3 MCal/kg/MS de EM). Las precipitaciones acumuladas durante el periodo marzo a mayo fueron de 277mm (75, 147, 54 mm, marzo, abril y mayo respectivamente).

5.3 Manejo sanitario

Previo al comienzo del experimento los animales se dosificaron contra parásitos gastrointestinales (Closantel + Levamisol, oral, 10 mg/kg de PV, Closamisol®, Lab. Microsules, Montevideo, Uruguay), controlándose cada 15 días la evolución de la carga parasitaria (muestreos de hpg en materia fecal), manteniéndose sin carga parasitaria hasta 60 días pos IATF. Se inmunizaron contra enfermedades clostridiales (Clostrisan®, subcutánea, Lab. Santa Elena, Montevideo, Uruguay). Recibieron además un baño podal de pasaje (formol al 5%) y un baño de aspersion precaucional contra piojo ovino (Diazinón 60%, 1 L/1000 L de agua, Ectovet®, Lab. Uruguay, Montevideo, Uruguay). No se registró ningún tipo de afecciones podales durante el resto del período experimental.

5.4 Diseño experimental

Se conformaron seis grupos mediante bloqueo por categoría (nulípara o múltipara), CC y PV evaluado mediante balanza electrónica (TOLEDO MGR-3000, $\pm 0,1$ Kg). Cinco grupos fueron sincronizados con dos inyecciones intramusculares de PG (Delprostenate, Glandinex®, Universal Lab, Uruguay, 160 μ g/oveja/inyección) separadas 12, 13, 14, 15 ó 16 días (PG12, PG13, PG14, PG15 ó PG16; n= 100, 104,

103, 100 y 100 ovejas respectivamente), más un grupo control sincronizado con P4-eCG (n= 103): esponjas con medroxiprogesterona por 14 días (MAP 60 mg; Syntex, Uruguay) y eCG intramuscular a su retiro (Novormon 5000®; Syntex, Uruguay; 380UI). La aplicación de la segunda PG se realizó el mismo día y hora en todos los grupos desfasando la primera dosis. La extracción de las esponjas vaginales se efectuó 8 horas más tarde (Ver Figura 4).

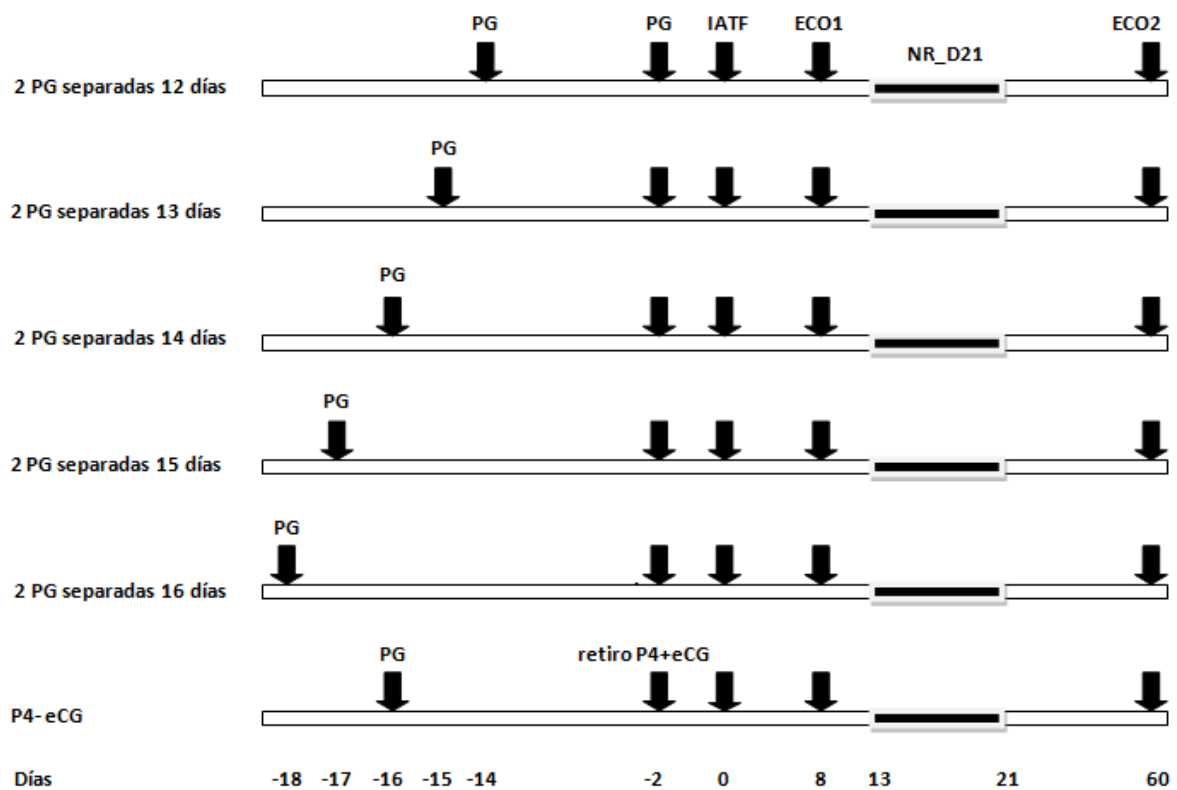


Figura 4: Esquema de Diseño Experimental. Ovejas sincronizadas con dos dosis de un análogo sintético de PGF₂ α (160 μ g de Delprostenate/dosis/oveja; PG) a intervalos de 12, 13, 14, 15 ó 16 días (grupos PG12, PG13, PG14, PG15 o PG16 respectivamente) y grupo control sincronizado con P4-eCG: esponjas con medroxiprogesterona por 14 días (MAP 60 mg) y eCG intramuscular a su retiro (380 UI). Día 0= día de la IATF. ECO1= ecografía transrectal para evaluar la respuesta ovulatoria al Día 8. NR_D21: control de no retorno al estrógeno desde el Día 13 al Día 21 pos IATF con carneros pintados. ECO2: ecografía vía transabdominal para evaluar la respuesta reproductiva al Día 60.

5.5 Manejo del semen e IA

Se utilizó semen fresco diluido en leche descremada UHT con antibióticos (Enrofloxacin 5%; Baytril®, 250 mg/Lt), dilución 1+1; unificado de 9 carneros adultos de raza Corriedale, asegurando un dosis espermática de 160 millones de espermatozoides/ oveja. La colecta y dilución de semen se realizó una hora antes de la IATF mediante vagina artificial (Duran del Campo, 1980), siendo los carneros previamente entrenados para la realización de la misma.

La IATF (Día= 0) se realizó en forma conjunta y al azar a todas las ovejas. En los grupos sincronizados con PG se realizó a las $56 \pm 1,5$ h pos segunda PG (según Hourcade y Pechi, 2014), mientras que en el grupo P4-eCG se realizó a las $48 \pm 1,5$ h después del retiro de las esponjas (Colas y col., 1974). En todos los grupos, la vía empleada fue la cervical según Duran del Campo (1980).

5.6 Evaluaciones reproductivas

Se evaluó la respuesta ovárica en las ovejas múltiparas de cada grupo: el porcentaje de ovejas que ovularon (ovejas que ovulan/total de ovejas*100), la tasa ovulatoria (TO; CLs/oveja que ovuló) y el nivel ovulatorio (CLs/total de ovejas*100) al Día 8 pos IATF, por medio de ultrasonografía vía transrectal (Aloka® 500, Overseas Monitor Corp. Ltd., Richmond, BC, Canadá; con transductor lineal de 7,5 MHz Aloka®, Tokyo, Japan) siguiendo la técnica descrita por Viñoles y col. (2010).

Además se evaluó la respuesta reproductiva en ambas categorías: fertilidad (ovejas gestantes/inseminadas*100), prolificidad (fetos/ovejas gestantes) y fecundidad (fetos/ovejas inseminadas*100) al Día 60; por ultrasonografía vía transabdominal (Aloka® 500, Overseas Monitor Corp. Ltd., Richmond, BC, Canadá; con transductor lineal de 3,5 MHz Aloka®, Tokyo, Japan); utilizando la metodología descrita por Viñoles y col. (2010). Se evaluó la tasa de no retorno al estro (NR_D21; ovejas que no retornan al estro/total de ovejas*100) mediante servicio a campo con carneros pintados con grasa y tierra de color negra, desde el Día 13 al Día 21 pos IATF, a razón de 3 carneros/100 ovejas (Figura 4).

5.7 Análisis estadístico

Se consideró el efecto de la categoría y su interacción con los diferentes protocolos en las variables cuantificadas. El porcentaje de ovulación, la tasa de NR_D21 y la fertilidad fueron comparadas mediante el test de Chi Cuadrado; la TO, el nivel ovulatorio, la prolificidad y la fecundidad por el test de Brown, considerando como nivel de significación $P < 0,05$.

6. RESULTADOS

Los resultados de este trabajo se resumen en los cuadros N°7 y N° 8. No se observó un efecto significativo de la categoría, ni una interacción categoría*grupo en la respuesta reproductiva ($P < 0.05$), por lo cual los datos son presentados en forma conjunta para cada grupo experimental.

Cuadro 7: Respuesta ovulatoria en ovejas multíparas sincronizadas con un análogo sintético de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (PG) administrado a diferentes intervalos de tiempo, y en comparación con progestágenos y eCG (P4-eCG).

| Grupo (n) | Ovulación (%) | TO | Nivel Ovulatorio (%) |
|--------------------|--------------------|------------------------|----------------------|
| PG12 (72) | 97,2 ^a | 1,54±0,65 ^a | 150 ^a |
| PG13 (74) | 100,0 ^a | 1,50±0,60 ^a | 150 ^a |
| PG14 (76) | 97,4 ^a | 1,65±0,63 ^a | 161 ^a |
| PG15 (70) | 98,6 ^a | 1,58±0,65 ^a | 156 ^a |
| PG16 (72) | 100,0 ^a | 1,57±0,50 ^a | 157 ^a |
| P4-eCG (74) | 98,6 ^a | 1,88±0,67 ^b | 185 ^b |

^{a, b} igual columna: $P < 0,05$.

PG12, PG13, PG14, PG15, PG16: dos dosis de PG separadas 12, 13, 14, 15, ó 16 días respectivamente. P4-eCG: esponjas de medroxiprogesterona (MAP) 60 mg durante 14 días y 380 UI de eCG a su retirada. Ovulación (N° de ovejas que ovulan/total de ovejas; %). TO (tasa ovulatoria: N° de ovulaciones/oveja ovulada al Día 8 pos IATF). Nivel Ovulatorio (N° de ovulaciones/total de ovejas*100 al Día 8 pos IATF). Día 0: día de la IATF.

No se observaron diferencias significativas entre grupos de sincronización en porcentaje de ovejas que ovularon, ni entre grupos de PG en TO o nivel ovulatorio ($P>0,05$). Sin embargo, el grupo P4-eCG presentó una mayor TO y un mayor nivel ovulatorio que todos los grupos de PG ($P<0,05$).

Cuadro 8: Respuesta reproductiva en ovejas sincronizadas con un análogo sintético de PGF2 α (PG) administrado a diferentes intervalos de tiempo, y en comparación con progestágenos-eCG (P4-eCG).

| Grupo (n) | NR_D21 (%) | Fertilidad (%) | Prolificidad | Fecundidad (%) |
|---------------------|--------------------|-----------------------|-------------------------------|-----------------------|
| PG12 (100) | 44 ^{ab} | 41 ^{ab} | 1,24 \pm 0,49 ^{ab} | 51 ^{ab} |
| PG13 (104) | 48,1 ^{ab} | 44,2 ^{ab} | 1,15 \pm 0,36 ^{bc} | 51 ^{ab} |
| PG14 (103) | 51,5 ^{bc} | 49,5 ^{bc} | 1,33 \pm 0,48 ^{ab} | 66 ^{bc} |
| PG15 (100) | 66 ^d | 65 ^d | 1,25 \pm 0,43 ^{ab} | 81 ^{cd} |
| PG16 (100) | 58 ^{cd} | 57 ^{cd} | 1,25 \pm 0,43 ^{ab} | 71 ^{cd} |
| P4-eCG (103) | 68 ^d | 62,1 ^d | 1,39 \pm 0,52 ^{ad} | 86,4 ^{de} |

^{a, b} igual columna: $P<0,05$.

PG12, PG13, PG14, PG15, PG16: dos dosis PG separadas 12, 13, 14, 15, ó 16 días respectivamente e IATF a 56 h pos segunda PG. P4-eCG: esponjas de medroxiprogesterona (MAP) 60 mg durante 14 días con 380 UI de eCG a su retirada e IATF a 48 h pos retiro. NR_D21 (Tasa de no retorno al estro desde el Día 13 al 21 pos IATF;%). Fertilidad (ovejas gestantes/total de ovejas inseminadas, al Día 60 pos IATF;%). Prolificidad (fetos/oveja gestante al Día 60 pos IATF). Fecundidad (fetos/total de ovejas inseminadas, al Día 60 pos IATF;%). Día 0: día de la IATF.

El NR_D21, la fertilidad y la fecundidad fue similar entre los grupos PG15, PG16 y P4-eCG, pero superior a los grupos PG12 y PG13 ($P<0,05$). No se observaron diferencias significativas entre grupos en prolificidad, salvo el grupo PG13 que fue inferior al de P4-eCG ($P<0,05$). El protocolo PG14 tuvo resultados intermedios respecto a los demás grupos ($P>0,05$).

7. DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo confirman parcialmente la hipótesis planteada. La administración de dos dosis de PG inyectadas con intervalos entre 12 y 16 días de separación no generó diferencias en respuesta ovárica entre grupos, pero sí en respuesta reproductiva a favor de los grupos con mayor intervalo entre dosis de PG (PG15 y PG16, respectivamente), equiparando los resultados del protocolo control en base a P4-eCG.

Respecto a la respuesta ovárica, en primer término no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de ovejas que ovularon entre grupos sincronizados con PG y/o P4-eCG, siendo muy alta en todos los grupos. Ello evidencia, que en las condiciones de manejo establecidas (estación reproductiva, biotipo, manejo nutricional y sanitario), la gran mayoría de las ovejas con estros inducidos con ésta separación entre dosis de PG y/o tratadas con P4-eCG ovularon, y que los CL generados con estos protocolos se mantuvieron “ecográficamente funcionales” al menos hasta el Día 8 (Viñoles y col., 2010). Esto se asemeja a lo obtenido previamente por Dutra da Silveira y Soler (2013) y Bonino y Grela (2014), comparando separaciones entre dosis de PG de 10, 12, 14 y 16 días (fase luteal media a tardía), bajo similares condiciones de trabajo. Con estos resultados a la vista podemos pensar que la administración de PG no afectó el fenómeno de ovulación en sí mismo. Sin embargo, ha sido reportado que la secreción endógena de FSH y LH podría verse alterada en ovejas sincronizadas con PG (Barrett y col., 2002; Liu y col., 2006), reduciendo el número de folículos reclutados, o determinando fallas de ovulación del/o los FPO y/o formación de CLs, fundamentalmente cuando la PG se aplica en fase luteal temprana (Barret y col., 2002). En segundo término, no se observaron tampoco diferencias significativas en TO ni en el nivel ovulatorio entre grupos sincronizados con PG, pero sí en la comparación con el grupo control de P4-eCG. Esto confirma, por un lado, los resultados de otros autores (Bindon y col., 1979; Houghton y col., 1995; Letelier y col., 2011; Dutra da Silveira y Soler, 2013; Bonino y Grela, 2014), quienes concluyen que la administración de PG en fase luteal media a tardía no influiría en estos parámetros, y de Dutra da Silveira y Soler (2013) y Errandonea (2014; no publicado) cuando se lo compara con un estro espontáneo. La inclusión de una dosis promedio de eCG en el protocolo control (380 UI), y su doble función gonadotrófica (actividad

de FSH y LH; Gordon, 1999; Menchaca y Rubianes, 2004) determina, además de una mejor sincronía ovulatoria, una estimulación al crecimiento y ovulación de folículos de más de una onda folicular. En consecuencia, es de esperar una mayor TO y nivel ovulatorio final con este protocolo y esta dosis de eCG (Ainshwort y col., 1977; Boland y col., 1979).

En lo referente a la respuesta reproductiva, se observó que la tasa de NR_D21, la fertilidad y la fecundidad final fueron significativamente superiores en los grupos PG15 y PG16 respecto a los grupos PG12 y PG13, sin diferencias en prolificidad entre ningún grupo de PG. Es decir que, mayores intervalos entre las dosis de PG (semejantes a una fase luteal de duración más fisiológica), determinaron mejores resultados a la IATF vía cervical con semen fresco. Las diferencias en fertilidad entre grupos se evidenciaron ya al NR_D21, por lo tanto se generaron previo ó al momento del reconocimiento materno de la gestación. Estos resultados son coincidentes con trabajos previos de nuestro grupo donde, con IA vía cervical y semen fresco, sobre estro detectado ó IATF, se observó que intervalos de 10 y 12 días (Dutra da Silveira y Soler, 2013), ó de 7 y 10 días entre dosis de PG (Bonino y Grela, 2014), tuvieron una respuesta reproductiva inferior que intervalos mayores entre dosis. En este último trabajo el grupo PG12 no evidenció diferencias significativas (pero si numéricas) de fertilidad y/o fecundidad respecto a los de mayor intervalo entre dosis. En términos globales estos hallazgos vuelven a confirmar, por un lado, lo hipotetizado acerca de que un ambiente uterino con crecientes, pero aun relativamente bajas concentraciones previas de progesterona durante el desarrollo del/o los FPOs, conllevarían finalmente a una menor calidad ovocitaria y en consecuencia, a una menor sobrevivencia embrionaria y fertilidad final (Folman y col., 1973; Ashworth y col., 1989; Fierro y col., 2011; 2013). Una disminución en la tasa de fertilización cuando el intervalo entre inyecciones de PG se redujo de 14 a 8 ó 9 días (Fairnie y col., 1977; Greyling y van der Westhuysen, 1980), o un aumento de tasa de preñez cuando se adicionó una fuente de P4 externa 8 días antes de la inyección de PG (Loubser y van Niekerk, 1981), reafirman este planteo. Por otro lado, Hawk y Cooper (1977) encontraron que el número de espermatozoides se redujo en el cuello uterino en ovejas tratadas con PG al día 10, pero no al día 16, sugiriendo algún factor asociado con el acortamiento del ciclo estral que inhibiría el transporte de espermatozoides.

Por otra parte, los grupos PG15 y PG16 equipararon reproductivamente al protocolo control de P4-eCG, con resultados biológicamente más que aceptables para una IATF vía cervical con semen fresco (Colas y col., 1974; Le Roux, 1976; Gordon, 1999). La fertilidad de estros inducidos con PG, en comparación con la de P4-eCG, ha sido un tema controvertido en la literatura. Trabajos contemporáneos (Olivera-Muzante y col., 2011a; Viñoles y col., 2011), utilizando un protocolo de IATF con tan solo 7 días de separación entre dosis de PG (protocolo Synchronvine®) obtuvieron, resultados reproductivos siempre inferiores que con el protocolo control de IATF aquí empleado (MAP 60 mg, protocolo largo de 14 días, y 380 UI eCG a su retiro). Contreras-Solís (2009), empleando este mismo protocolo de PG en ovejas de pelo, pero asociado a un “efecto macho”, reporta resultados similares en IATF al protocolo control de P4 (pero no incluyendo eCG en el mismo). En trabajos previos, comparando sobre servicio natural protocolos de 2 PG separadas 9 ó 14 días y protocolo control (MAP), con o sin eCG en ambos tratamientos hormonales (Boland y col. 1978a), se aprecian diferencias numéricas a favor del protocolo control de MAP (no significativas, dado el muy bajo número de animales empleados). Lo mismo ocurrió en servicios de IATF, donde el porcentaje de fertilización fue significativamente superior en ovejas de un grupo control de P4-eCG (67%), en comparación con ovejas sincronizadas con un protocolo de 2 PG separadas 11 días e IATF a 56 h después de la segunda dosis (7%; Boland y col 1978b). Sin embargo, Acritopoulou-Fourcroy y col. (1982), utilizando protocolos de 2 PG separadas 12 ó 14 días e IATF a 56 h, obtuvieron un porcentaje de parición similar o incluso superior al protocolo control de P4-eCG con IATF a 55 h pos retirada de dispositivos. En resumen, es probable que una mayor separación entre las dosis de PG (15 y 16 días) genere, por lo discutido en el párrafo previo, una ovulación más semejante a la fisiológica, con la consecuente mejor concepción al servicio. Además es probable que, dada la amplia separación en días entre dosis de PG en estos protocolos, un porcentaje de las ovejas inseminadas no responda a esta segunda PG y manifieste estro espontáneo (y no inducido) al momento de la IATF, con la consiguiente mejor concepción y supervivencia embrionaria reportada para este tipo de estro (Durán del Campo y Cash Stirling, 1982; Gordon, 1983; Fierro y col., 2011).

Por último y a pesar de existir diferencias iniciales en TO y/o nivel ovulatorio en ovejas múltiparas a favor del protocolo de P4-eCG, no se evidenciaron diferencias

en prolificidad y/o fecundidad al Día 60 en el total de las ovejas entre este protocolo y los protocolos PG15 y PG16. Es visible que todos los protocolos disminuyeron su prolificidad y fecundidad potencial evaluada al Día 8. Algunos autores reportan que, dado el alto peso molecular de eCG (68.000) y por ende su larga vida media en sangre, y/o su elevado ratio y propiedades de FSH/LH (Gordon, 1999; Menchaca y Rubianes, 2004), se puede observar en ovinos y otras especies alteraciones hormonales por un incremento en la estrogenicidad de los folículos de la onda 1 (Barret, 2002), desarrollo de quistes foliculares (Viñoles y col. 2001), y/o en protocolos de superovulación de ovinos y vacunos un mayor porcentaje de estructuras embrionarias no fertilizadas y/o degeneradas (Kelly, 1997; Olivera y col., 2001). Todo esto, sumado a la posibilidad de ovulación de folículos envejecidos por el uso de tratamientos largos (Ungerfeld y Rubianes, 1999; Viñoles y col., 2001), podría dar lugar al desarrollo de ovocitos y embriones de menor calidad, y en consecuencia a la posibilidad de mayores pérdidas o fallas reproductivas con este protocolo. Se descarta en primer instancia, como causa de éstas pérdidas la ocurrencia de episodios de parasitosis gastrointestinales (Fernández Abella y col., 2006), enfermedades podales (Mederos y col., 2001), y/o la ocurrencia de efectos climáticos de relevancia alrededor del servicio (precipitaciones, temperatura, etc.; Gun y Doney, 1973; Fernández Abella y col., 2007).

8. CONCLUSIÓN

Se concluye que una separación de 15 y 16 días entre dosis de PG permitiría resultados reproductivos en IATF superiores a 12 y 13 días de separación, pero similares al protocolo tradicional de P4 y eCG, siendo alternativas de sincronización de estros e IATF vía cervical con semen fresco más “limpias, verdes y éticas”.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Abecia J.A., Forcada F., González-Bulnes A. (2012) Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Anim Reprod Sci* 130:173-179.
2. Abecia J.A., Forcada F., González-Bulnes A. (2011) Pharmaceutical Control of Reproduction in Sheep and Goats. *Vet Clin North Amer: Food Anim Pract* 27(1):67-79.
3. Abecia A., Forcada F. (2010) Manejo Reproductivo en Ganado Ovino. Zaragoza, Servet, 195 p.
4. Abecia J.A., Forcada F., González-Bulnes A. (2002) The effect of progestagen treatment on sheep reproductive performance at different phases of the oestrus cycle. *Anim Res* 51(2):149-155.
5. Acritopoulou-Fourcroy S., Papas V., Peclaris G., Zervas N. (1982) Synchronization of oestrus in ewes with Provera sponges/PMSG, prostaglandin F₂ α or the prostaglandin analogue, ICI80996, and fertility following natural mating or artificial insemination. *Reprod Nut Dev* 22:345-354.
6. Acritopoulou S., Haresign W. (1980) Response of ewes to a single injection of an analogue of PGF₂ α given at different stages of oestrus cycle. *J Reprod Fertil* 58:219-223.
7. Acritopoulou S. (1979) Progesterone and LH concentrations in ewes after ICI 80996, an analogue of prostaglandin F₂ α , at two different stages of the breeding season. *Theriogenology* 11:411–20.
8. Acritopoulou S., Haresign W., Lamming G.E. (1978) Time of ovulation in ewes after treatment with a prostaglandin F₂ α analogue. *J Reprod Fertil* 54:189–91.
9. Acritopoulou S., Haresign W., Foster J.P., Lamming G.E. (1977) Plasma progesterone and LH concentrations in ewe safter injection of an analogue of prostaglandin F₂ α . *J Reprod Fertil* 49:337-340.
10. Adams G.P. (1999) Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants- Review. *J Reprod Fertil* 54(Suppl.):17-32.
11. Aisen E. (2004) Reproducción ovina y caprina. Buenos Aires, Intermédica 206 p.
12. Aké J.R., Heredia M., Alfaro M. (2003) Effect of hormone in the superovulatory response and synchrony of estrus on pregnancy rate in peli buey ewes. *Veterinarian México* 34(3):225-233.

13. Ashworth C.J., Sales D.I., Wilmut I. (1989) Evidence of an association between the survival of embryos and the periovulatory plasma progesterone concentration in the ewe. *J Reprod Fertil* 87(1):23-32.
14. Azzarini M. (2000) Consideraciones y sugerencias para mejorar los procreos ovinos. En: Una propuesta para mejorar los procreos ovinos. Secretariado Uruguayo de la Lana. Montevideo, p 3-35.
15. Baird D.T. (1983) Factors regulating the growth of the preovulatory follicle in the sheep and human. *J Reprod Fétil* 69:343-352.
16. Baird D.T. (1978) Pulsatile secretion of LH and ovarian estradiol during the follicular phase of the sheep estrous cycle. *Biol Reprod* 18:359-364.
17. Baird D.T., Scaramuzzi R.J. (1975) Prostaglandin F₂ α and luteal regression in the ewe: comparison with 16 aryloxy prostaglandin. *Ann Biol Anim Bioch Biophys* 15:161–74.
18. Barret D.M.W. (2002) An investigation of conventional oestrous synchronization techniques in the ewe. Thesis. University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan, Canada. p 151.
19. Barret D.M.W., Bartlewsky P.M., Cook S.J., Rawlings N.C. (2002) Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to PGF₂ given at different stages of the luteal phase in ewes. *Theriogenology* 58:1409-1424.
20. Bartlewsky P.M., Duggavathi R., Aravindakshan J., Barrett D.M.W., Cook S.J., Rawlings N.C. (2003) Effects of a 6-day treatment with medrox- iprogeste- rone acetate after prostaglandin F₂ α induced luteolysis at midcycle on antral follicular development and ovulation rate in no prolific Western White-Faced ewes. *Biol Reprod* 68(4):1403-1412.
21. Bartlewsky P.M., Beard A.P., Cook S.J., Chandolia R.K., Hanoramooz 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 the prolificacy. *J Reprod Fertil* 115:111-124.
22. Binder D., Bowler J., Brown E.D., Crossley N.S., Hutton J., Senior M. (1974) 16- aryloxy prostaglandins: a new class of potent luteolytic agent. *Prostaglandins* 6:87–90.
23. Bindon B.M., Blanc M.R., Pelletier J., Terqui M., Thimonier J. (1979) Preovulatory gonadotrophin and ovarian steroid patterns in sheep of breeds with differing fecundity. *J Reprod Fertil* 55:15–25.

24. Boland M.P., Kelleher D., Gordon I. (1979) Comparison of control oestrus and ovulation in sheep by an ear implant (SC-21009) or by intravaginal sponge (cronolone or map). *Anim Reprod Sci* 1:275-281.
25. Boland M.P., Lemainque F., Gordon I.R. (1978a) Comparison of lambing outcome in ewes after synchronization of oestrus by progestagen or prostaglandin treatment. *J Agric Sci (Cambridge)* 91:756-765.
26. Boland M.P., Lemainque F., Gordon I.R. (1978b) Comparison of lambing outcome in ewes after synchronization of oestrus by progestagens or prostaglandin treatment. *J Agric Sci (Cambridge)* 91:765-766.
27. Bonifacino L.A., Aragunde M. (1981) The synchronization of oestrus in sheep in artificial insemination programmes: effect of dose, single or double injection regime, of three prostaglandin analogues on oestrus response and conception rate. Disponible en: <http://www.laboratoriouniversal.com/biblioteca/glandinex/THE%20SYNCHRONIZATION%20OF%20OESTRUS%20IN%20SHEEP.pdf>. Fecha de consulta: 20 de octubre 2013.
28. Bonino C., Grela S. (2014) Respuesta reproductiva a la IATF en ovejas sincronizadas con dos dosis de un análogo sintético de PGF2 α administrado a diferentes intervalos de tiempo. Tesis de Grado. Facultad de Veterinaria, UdelaR 47 p.
29. Bottaro M. (2009) IATF en ovinos con semen refrigerado por 24 h: comparación biológica y económica de protocolos de sincronización estral. Tesis de Grado. Facultad de Veterinaria, UdelaR 45 p.
30. Camacho J.C., Rodríguez C., Hernández J.E. (2008) Características reproductivas de ovejas peli buey sincronizadas e inducidas a la pubertad. *Arch Latinoam Prod Anim* 16(1):18-24.
31. Campbell B.K., Dobson H., Baird D.T., Sacaramuzzi R.J. (1999) Examination of the relative role of FSH and LH in the mechanism of ovulatory follicle selection in sheep. *J Reprod Fertil* 117:355-367.
32. Campbell B.K., Sacaramuzzi R.J., Webb R. (1995) Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. *J Reprod Fertil* 49 (Suppl.):335-350.
33. Cárdenas H., Wiley T.M., Pope W.F. (2004) Prostaglandin F2 α -induced estrus in ewes exhibiting estrous cycles of different duration. *Theriogenology* 62:123-129.

34. Carson R.S. (1978) Ovarian follicular artesian in the ewe. *Proceedings of the Australian Society for Reproductive Biology* 10:17.
35. Carlson J.C., Barcikowski B., McCracken J.A. (1973) Prostaglandin F₂ α and the release of LH in sheep. *J Reprod Fertil* 34:357-361.
36. Cognie Y., Mariana J.C., Thimonier J. (1970) Etude du moment d'ovulation chez la brebis normale ou traitée par un progestagène associé ou non à une injection de PMSG. *Ann Biol Anim Bioch Biophys* 10:15-24.
37. Colas G., Brice G., Guérin Y. (1974) Acquisitions récentes en matière d'insémination artificielle ovine. *Bull Tech Inf Minist Agric* 294:795-800.
38. Contreras-Solis I., Vásquez B., Díaz T., Letelier C., López Sebastián A., González-Bulnes A. (2009) Efficiency of estrus synchronization in tropical sheep by combining short interval Clorprostenol based protocols and "male effect". *Theriogenology* 71:1018-1025.
39. Correa M.N. (2005) Inseminación a tiempo fijo de ovejas sincronizadas con dos dosis de PGF₂ α separadas 7 días con o sin GnRH. Tesis de Grado. Facultad de Veterinaria, UdelaR 24 p.
40. Das G.K., Naqvi S.M.K., Gulyani R., Joshi A., Mittal J.P. (1999) Effect of two protocols of PGF₂ α treatment for synchronization of estrus in a tropical sheep [Abstract]. *Theriogenology* 51(1):283.
41. Davies K.L., Barlewski P.M., Epp T., Duggavathi R., Barrett D.M.W., Bagu E.T., Cook S.J., Rawlings N.C. (2006) Does injection of prostaglandin F₂ α (PGF₂ α) cause ovulation in anestrous Western White Face ewes? *Theriogenology* 66:251-259.
42. Davis A.J., Fleet I.R., Harrison F.A., Walker F.M.M. (1980) Pulmonary metabolism of prostaglandin F₂ α in the conscious non pregnant ewe and sow. *J Physiol London* 301:86.
43. Deligiannis C., Valasi I., Rekkas C. A., Goulas P., Theodosiadou E., Lainas T., y Amiridis G.S. (2005) Synchronization of Ovulation and Fixed Time Intrauterine Insemination in Ewes. *Reprod Dom Anim* 40(1)6:10.
44. Driancourt M.A., Philipon P., Locatelli A., Jacques E., Webb R. (1988) Are differences in FSH concentration involved in the control of ovulation rate in Romanov and ILe-de- France ewes. *J Reprod Fertil* 83:509-516.

45. Drion P.V., De Roover R., Houtain J.Y., McNamara E.M., Remy B., Sulon J., Beckers J.F. (2001a) Increase of plasma eCG binding rate after administration of repeated high dose of eCG to cows. *Reprod Nutr Dev* 41(3):207-215.
46. Drion P.V., Furtoss V., Baril G., Manfredi E., Bouvier F., Pougard J.L., Bernelas D., Caugnon P., McNamara E.M., Remy B., Sulon J., Beckers J.F., Bodin L., Lebceuf B. (2001b) Four years of induction/synchronization of estrus in dairy goats: effect on the evolution of the eCG binding rate in relation with the parameters of reproduction. *Reprod Nutr Dev* 41:401-412.
47. Duggavathi R., Bartlewsky P.M., Barret D.M.W., Rawlings N.C. (2005) The temporal relationship between patterns of LH and FSH secretion, and development of ovulatory-sized follicles during the mid- to late-luteal phase of sheep. *Theriogenology* 64:393-407.
48. Dukes M., Russell W., Walpole A.L. (1974) Potent luteolytic agents related to prostaglandin F₂alpha. *Nature* 250:330-331.
49. Durán del Campo A. (1993) Inseminación artificial. En: Manual práctico de reproducción e inseminación artificial en ovinos. Montevideo, Hemisferio Sur, 3:43-45.
50. Durán del Campo A., Cash Stirling R.C. (1982) Sincronización de celos en ovinos mediante el uso de prostaglandina. Resúmenes del III Congreso Nacional de Veterinaria, Noviembre, Montevideo, Uruguay p 345-353.
51. Durán del Campo A. (1980) Anatomía, Fisiología de la Reproducción e Inseminación Artificial en Ovinos. Montevideo, Hemisferio Sur, 264 p.
52. Dutra Da Silveira R., Soler D. (2013) Respuesta reproductiva en ovejas sincronizadas con dos dosis de un análogo sintético de prostaglandina F₂α administrada a diferentes intervalos de tiempo. Tesis de Grado. Facultad de Veterinaria, UdelaR 35 p.
53. Espey L.L. (1994) Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biol Rep* 50:233-238.
54. Evans A.C.O. (2003) Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. *Anim Reprod Sci* 78:289-306.
55. Evans A.C.O., Flynn J.D., Quinn K.M., Duffi P., Quinn P., Madgwick S., Crosby T.F., Boland M.P., Beard A.P. (2001) Ovulation of aged follicles does not affect embryo quality or fertility after a 14-day progestagen estrus synchronization protocol in ewes. *Theriogenology* 56:923-936.

56. Evans A.C.O., Duffy P., Hynes N., Boland M.P. (2000) Waves of follicle development during the estrous cycle in the sheep. *Theriogenology* 53:699-715.
57. Evans G., Maxwell W.M.C. (1987) Collection of semen; Handling and examination of semen. En: Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. Sydney, Australia, Butterworth's p 85-104.
58. Fairnie I.J., Wales R.G., Gherardi P.B. (1977) Time of ovulation, fertilization rate, and blastocyst formation in ewes following treatment with a prostaglandin analogue (ICI 80996) *Theriogenology* 8:183. (Abstract).
59. Fernández-Abella D., Formoso D. (2007) Estudio de la Motilidad Embrionaria y Fetal en Ovinos. II. Efecto de la condición corporal y de la dotación sobre las pérdidas embrionarias y fetales. *Producción Ovina* 19:5-13.
60. Fernández-Abella D., Formoso D., Goicoechea I., Locatelli A., Scarlato S., Ibañez W., Irabuena O. (2007) Estudio de la mortalidad embrionaria y fetal en ovinos III. Efecto de la asignación de forraje y de un estrés pluviométrico artificial sobre la tasa ovulatoria y pérdidas reproductivas en ovejas Corriedale. *Producción Ovina* 19:15-23.
61. Fernández-Abella D., Castells D., Piaggio L., Deleón N. (2006a) Estudio de la mortalidad embrionaria y fetal en ovinos I. Efecto de distintas cargas parasitarias y su interacción con la alimentación sobre las pérdidas embrionarias y la fecundidad. *Producción Ovina* 18:25-31.
62. Fernández-Abella D., Hernández Z., Villegas N. (2006b) Effect of gastrointestinal nematodes on ovulation rate of merino Booroola heterozygote ewes (FecB Fec+). *Anim Res* 55:545-550.
63. Fernández-Abella D. (1995) Temas de reproducción ovina e inseminación artificial en bovinos y ovinos. Montevideo. División de publicaciones y ediciones de la Universidad de la República 206 p.
64. Fernández-Abella D. (1993) Principios de la fisiología reproductiva ovina. Hemisferio Sur-Universidad de la República. Montevideo, División Publicaciones y Ediciones 247 p.
65. Fierro S., Gil J., Viñoles C., Soca F., Bancharo G., Olivera-Muzante J. (2014) Protein supplementation during a short-interval prostaglandin-based protocol for timed AI in sheep. *Anim Reprod Sci*. En prensa.
66. Fierro S., Gil J., Viñoles C., Olivera-Muzante. (2013) The use of prostaglandins in controlling estrous cycle of the ewe: a review. *Theriogenology* 79:399-408.

67. Fierro S., Olivera-Muzante J., Gil J., Viñoles C. (2011) Effects of prostaglandin administration on follicular dynamics, conception, prolificacy and fecundity in sheep. *Theriogenology* 76:630-639.
68. Fierro S. (2010) Pérdidas reproductivas en ovejas sincronizadas con prostaglandina. Tesis de Maestría. Facultad de Veterinaria, UdelaR 45 p.
69. Fierro S., Olivera J., Gil J. (2007) Inseminación artificial a tiempo fijo con semen fresco y refrigerado en ovinos con el protocolo Synchrovine®. XXXV Jornadas Uruguayas de Buiatría. 7 al 9 de junio. Paysandú, Uruguay pp 334-335.
70. Folman Y., Rosenber M., Herz Z., Davidson M. (1973) The relationship between plasma progesterone concentration and conception in post-partum dairy cows maintained on two levels of nutrition. *J Reprod Fertil* 34:267–278.
71. Forichi S., Olivera J., Correa M., Gil J., Menchaca A., Rubianes E. (2004) Reproductive response to two different oestrus synchronization protocol using PGF2 α in sheep. *Reprod Fert Dev* 16(4):506.
72. Fossati F., Martincorena M., Regusci R. (2008) IATF en ovinos con semen fresco: comparación biológica y económica de protocolos de sincronización estral. Tesis de Grado. Facultad de Veterinaria, UdelaR 55 p.
73. Gibbons J.R., Wiltbank M.C., Ginther O.J. (1999) Relationship between follicular development and the decline in the follicle-stimulating hormone surge in heifers. *Biol Reprod* 60:72-77.
74. Gibbons J.R., Wiltbank M.C., Ginther O.J. (1997) Functional interrelationships between follicles greater than 4 mm and the follicle stimulating hormone surge in heifers. *Biol Reprod* 57:1066-1073.
75. Gil J., Olivera J., Fierro S., Durán G., Gamarra J., Teixeira V., Araújo A., Stoletniy G. (2006) Inseminación intrauterina con semen congelado en majadas Merino Fino: comparación de protocolos de sincronización estral. INIA Tacuarembó. Serie de Actividades de Difusión 475. Capítulo 3.
76. Gil J., Olivera J., Menchaca A., Rubianes E. (2004) Effect of GnRH associated with the application of Timed Artificial Insemination in ewes. *Reprod Fert Dev* 16(4):507.
77. Gil J. (2003) Inseminación artificial en ovinos. En: Ungerfeld R. Reproducción en los animals domésticos. Montevideo. Melibea. v2, pp 319-338.

78. Ginther O.J., Kot K., Wiltbank M.C. (1995) Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. *Theriogenology* 43:689-703.
79. Ginther O.J., Kot K. (1994) Follicular dynamics during the ovulatory season in the goats. *Theriogenology* 42:987-1001.
80. Godfrey R.W., Gray M.L., Collins J.R. (1997) A comparison of two methods of oestrus synchronisation of hair sheep in the tropic. *Anim Reprod Sci* 47:99–106.
81. González–Bulnes A., Contreras-Solis I. (2012) Estrategias sostenibles para el manejo reproductivo de la oveja. Reunión Bianual sobre Reproducción Animal 2012. Del 4 al 5 de Octubre. Temascaltepec de González, México pp 108-121.
82. González-Bulnes A., Veiga-Lopez A., García P., García-García R.M., Ariznavarreta C., Sánchez M.A., Tresguerres J.A.F., Cocero M.J., Flores J.M. (2005) Effects of progestagen and prostaglandin analogues on ovarian function and embryo viability in sheep. *Theriogenology* 63:2523-2534.
83. Goodman A.; and Hodgen G.D. (1983) The ovarian triad of the primate menstrual cycle. *Recent Prog Horm. Res* 39:1-73.
84. Gordon I. (1999) Fixed-time sheep artificial insemination. En: Gordon I. "Controlled Reproduction in sheeps and goats". Wallingford, CAB, p 86-109.
85. Gordon I. (1983) *Controlled Breeding in Farm Animals* Pergamon Press, Oxford.
86. Greyling J.P.C., Van der Westhuysen J.M. (1980b) The synchronization of oestrus in sheep. The interval between prostaglandin injections in the double injection regime. *S Afr J Anim Sci* 10:73-75.
87. Greyling J.P.C., Erasmus J.A., Taylor G.J., Van der Merwe S. (1997) Synchronization of estrus in sheep using progestagen and inseminating with chilled semen during the breeding season. *Small Rumin Res* 26:137-143.
88. Gunn R.G., Doney J.M. (1973) The effects of nutrition and rainfall at the time of mating on the reproductive performance of ewes. *J Reprod Fert Suppl* 19:253-258.
89. Hackett A.J., Langford G.A., Robertson H.A. (1981) Fertility of ewes after synchronization of estrus with a prostaglandin F2 α and artificial insemination. *Theriogenology* 15(6):599-603.
90. Hafez E.S.E., Jainudeen M.R., Wahid H. (1992) Ovejas y Cabras. En: Hafez E.S.E., Jainudeen M.R. *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. 5a ed, Mexico, Interamericana, p 341-350

91. Hansel W., Convey E.M. (1983) Physiology of the estrous cycle. *J Anim Sci* 57:404-424.
92. Haresign W., Acritopoulou S.A. (1978) Controlled breeding in sheep using the prostaglandin analogue, ICI 80996. *Livest Prod Sci* 5:313–9.
93. Hartman C.G. (1932) Ovulation and the transport and viability of ova and sperm in the female genital tract. En: Allen, E, Baltimore, Williams & Wilkins. p 647-688.
94. Hawk H.W., Conley H.H. (1975) Involvement of the cervix in sperm transport failures in the reproductive tract of the ewe. *Biol Reprod* 13:322-328.
95. Hawk H.W., Cooper B.S. (1977) Sperm transport into the cervix of the ewe after regulation of estrus with prostaglandin or progestagen. *J Anim Sci* 44:638-644.
96. Hearnshaw H., Restall B.J., Nancarrow C.D., Mattner P.E. (1974) Synchronization of oestrus in cattle, sheep and goats using a prostaglandin analogue. *Aust Soc Anim Prod* 10:242-245.
97. Houghton J.A.S., Liberati N., Schrick F.N., Townsend E.C., Dailey R.A., Inskip E.K. (1995) Day of estrous cycle affects follicular dynamics after induced luteolysis in ewes. *J Anim Sci* 73:2094-2101.
98. Hourcade G., Pechi C. (2014) Desarrollo folicular y momento de ovulación en ovejas sincronizadas con dos dosis de un análogo sintético de prostaglandina F2 α administrado a diferentes intervalos de tiempo. Tesis de Grado. Facultad de Veterinaria, UdelaR 54 p.
99. Huesh A. (1984) Hormonal regulation of differentiation of cultured ovarian granulose cells. *Endoc Revi* 5:76-126.
100. Hughes F., Lucas J.M.S., Notman A.B. (1976) The synchronization of oestrus and subsequent fertility in ewes following treatment with a synthetic prostaglandin analogue (ONO 453). *Prostagland* 11:1033-1039.
101. Kelly P., Duffy P., Roche J.F., Boland M.P. (1997) Superovulation in cattle: effect of FSH type and method of administration on follicular growth, ovulatory response and endocrine patterns. *Anim Reprod Sci* 46:1-14.
102. Kleemann D.O., Walker S.K. (2005) Fertility in South Australian commercial Merino flocks: relationships between reproductive traits and environmental cues. *Theriogenology* 63:2416-2433.
103. Langford G.A., Marcus G.J., Batra T.R. (1983) Seasonal effects of PMSG and number of inseminations on fertility of progestagen-treated sheep. *J Anim Sci* 57:307-312.

104. Larson L.L., Ball P.H.J. (1992) Regulation of estrous cycles in dairy cattle: a review. *Theriogenology* 38:255-267.
105. Le Roux P.J. (1976) The conception rate of MAP and MAP-PMSG treated Karakul ewe inseminated with diluted semen. *J Anim Sci* 6:1-5.
106. Letelier C.A., Contreras-Solis I., García-Fernández R.A., Sánchez M.A., García-Palencia P., Sánchez B. (2011) Effects of oestrus induction with progestagen or prostaglandin analogues on ovarian and pituitary function in sheep. *Anim Rep Sci* 126:61–9.
107. Leyva V., Buckrell B.C., Walton J.S. (1999) Regulation of follicular activity and ovulation in ewe by exogenous progestagen. *Theriogenology* 50:395-416.
108. Leyva V., Buckrell B.C., Walton J.S. (1998) Regulation of follicular activity and ovulation in ewes by exogenous progestagen. *Theriogenology* 50:395-416.
109. Light J.E., Silvia W.J., Reid R.C. (1994) Luteolytic effect of prostaglandin F2 alpha and two metabolites in ewes. *J Anim Sci* 72:2718–21.
110. Liu X., Dai Q., Hart E.J., Duggavathi R., Barrett D.M.W., Rawlings N.C., Bartlewski P.M. (2006) Ovarian and endocrine response to prostaglandin F2 α (PGF2 α) given at the expected time of the endogenous FSH peak at mid-cycle in ewe. *Theriogenology* 66:811-21.
111. López-Sebastián A., González de Bulnes A., Santiago Moreno J., Gómez Brunet A., Townsend E.C., Inskoop E.K. (1997) Patterns of follicular development during the estrous cycle in monovular Merino del Pais ewes. *Anim Reprod Sci* 48:279-291.
112. Loubser P.G., Van Niekerk C.H. (1981) Oestrus synchronization in sheep with progesterone-impregnated (MAP) intravaginal sponges and a prostaglandin analogue. *Theriogenology* 15(6):547-552.
113. Lucy M.C., Savio J.D., Badinga L., De la Sota R.L., and Thatcher W.W. (1992) Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J. Anim. Sci* 70:3615-3626.
114. Martin G.B. (2009) The “Clean, Green and Ethical” concept in animal production. *Agrociencia*, 13(3)1-7.
115. Martin G.B., Milton J., Davidson R., Banchemo-Hunzicker G., Lindsay D., Blache D. (2004) Natural methods for increasing reproductive efficiency in small ruminants. *Anim Reprod Sci* 82:231-246.
116. Martin G.B., Thomas G.B. (1990) Roles of communication between the hypothalamus, pituitary gland and ovary in the breeding activity of ewes. En:

- Oldham C.M.; Martin G.B.; Purvis I.W. "Reproductive physiology of Merino sheep. Concepts and Consequences", Nedlands, Perth p 71-84.
117. Maxwell W.M.C. (1986) Artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen at a synchronized oestrus. 1. Effect of time of onset of oestrus, ovulation and insemination on fertility. *Anim Reprod Sci* 10(4):301-308.
118. McCracken J.A., Glew M.E., Scaramuzzi R.J. (1970) Corpus luteum regression induced by prostaglandin F₂ α . *J Clin Endocrinol Metab* 30:544-546.
119. McNeilly A.S., Picton H.M., Campbell B.K., Baird D.T. (1991) Gonadotrophic control of follicle growth in the ewe. *J Reprod Fert Suppl* 43:177-186.
120. Mederos A., Casaretto A., Ferreira G., Bonono J., Scremini P. (2001) Evaluación de pérdidas productivas debidas a footrot en ovinos. *Producción Ovina* 14:65-70.
121. MGAP-DICOSE. (2013) Datos de la declaración jurada de dicose 2013 - Datos generales. (Disponible en: www.mgap.gub.uy/dgsg/DICOSE/dicose.htm. Fecha de consulta: 18 de Septiembre de 2013).
122. MGAP-DICOSE-DIEA. (2013) Anuario Estadístico Agropecuario. (Disponible en: www.mgap.gub.uy/Dieaanterior/Anuario2013/DIEA_Anuario_2013.pdf. Fecha de consulta: 18 de Septiembre de 2013).
123. Meikle A., Sahlin L., Ferraris A., Masironi B., Blanc J.E., Rodríguez-Irazoqui M., Rodríguez-Piñón M., Kindahl H., Forsberg M. (2001) Endometrial mRNA expression of oestrogen receptor α , progesterone receptor and insulin-like growth factor-I (IGF-I) throughout the bovine oestrous cycle. *Anim Reprod Sci* 68(1):45-56.
124. Mejía O., María P. (2010) Características reproductivas de los ovinos. Curso teórico-práctico técnicas de reproducción asistida en ovinos. Guamo, Tolima. Asociación de Ovinocultura p 66-72.
125. Menchaca A., dos Santos Neto P., Vilariño M., García Pintos C., Cuadro F., Pinczak A. (2013) Programa de sincronización de Celos en ovinos y caprinos. Simposio Internacional de Reproducción Animal; IRAC. Córdoba, Argentina. p 199-210.
126. Menchaca A., Rubianes E. (2004) New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reprod Fert Dev* 16(4):403-413.
127. Moller-Holtkamp P. (1980) Conceptual e lliren dos nuevas hormonas para combatir los trastornos de la reproducción en los animales. IV Jornadas

Latinoamericanas y VIII Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay. Sección comunicaciones cortas pp 5-16.

128. Murphy B.D. (2000) Models of luteinization. *Biol Reprod* 63:2-11.
129. Mutiga E.R., Baker A.A. (1982) Ovarian response ova recovery and fertility in merino ewes superovulated either during the luteal phase of their oestrous cycle or after intravaginal progestagen treatment. *Theriogenology* 17:537-544.
130. Nari A., Cardozo H. (1987) Enfermedades causadas por parásitos internos. 1. Nematodos gastrointestinales. En: Bonino Morlán J.; Duran del Campo A.; Mari J.J. Enfermedades de los lanares. Montevideo, Hemisferio Sur, v 1, p 155.
131. Nephew K.P., McClure K.E., Ott T.L., Dubois D.H., Bazer F.W., Pope W.F. (1991) Relationship between variations in conceptus development and differences in estrous cycle duration in ewes. *Biol Reprod* 44:536–539.
132. 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. *Anim Reprod Sci* 138:175-179.
133. Olivera-Muzante J., Fierro S., López V., Gil J. (2011a) Comparison of prostaglandin and progesterone based protocols for timed artificial insemination in sheep. *Theriogenology* 75:1232-1238.
134. Olivera-Muzante J., Gil J., Fierro S., Menchaca A., Rubianes E. (2011b) Alternatives to improve a prostaglandin-based protocol for timed artificial insemination in sheep. *Theriogenology* 76:1501-1507.
135. Olivera J., Gil J., Fierro S., Araujo A., Filliol E., Stoletniy G. (2007) Sincronización de celos en ovinos: efecto del intervalo entre dosis de PGF2 α y del momento de IA a Tiempo Fijo con el protocolo Synchrovine®. 15 Jornadas de Buiatría. 7, 8 y 9 de junio. Paysandú, Uruguay p 330-331.
136. Olivera J., Gil J., Fierro S., Gamarra J., Texeira V. (2006) Sincronización de celos para la IA a tiempo fijo vía cervical en majadas del Proyecto Merino Fino: comparación de protocolos. INIA, Serie de Actividades de Difusión N° 475. Avances obtenidos en el Proyecto Merino fino del Uruguay, Tacuarembó p 10-15.
137. Olivera J., Gil J. (2005) Estudio de diferentes alternativas para la sincronización de celos en ovinos: descripción y valorización económica. 13 Jornadas de Buiatría, 9 al 11 de junio, Paysandú, Uruguay p 195-196.

138. Olivera J., Gil J., Menchaca A., Rubianes E. (2004a) Effect of PGF₂ α dose on their productive response of a Timed Artificial Insemination protocol in sheep. *Reprod Fertil Dev* 16(4):507.
139. Olivera J., Gil J., Menchaca A., Rubianes E. (2004b) Parity effect on results of two insemination protocol after two PGF₂ α treatments 7 days apart. *Reprod Fertil Dev* 16(4):508.
140. Olivera J., Alabart J.L., Alcaide V., Arrese V., Beltrán De Heredia I., Cocero M.J., Fuentes S., Gracia-Cervigón M., Manso A., Mintegi L., Roche A., Folch J. (2001) Efecto de la eCG en la superovulación en ovejas con dosis decrecientes de FSH ovina. *ITEA Revista de la Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario* 22(2):766-768.
141. Oliveira M. E. F., Rodrigues L. F. S., Almeida O. M., Cordeiro M. F., Moura A. C. B., Sousa H. L. L., y Vicente W. R. R. (2009) Eficiência do protocolo ovsynch em ovelhas da raça Santa Inês. *Archivos de zootecnia* 58(222):281-284.
142. Oyediji G.O., Akusu M.O., Egbunike G.N. (1990) Comparative studies on the effectiveness of Sil-estrus implants, Veramix sheep sponges and PGF₂ α in synchronizing estrus in West African Dwarf Sheep. *Theriogenology* 34:613–8.
143. Padmanabhan V., Karsh F.J., Lee J.S. (2002) Hypothalamic, pituitary and gonadal regulation of FSH. *Reproduction* 59:67-82.
144. Paulenz H., Adnoy T., Fossen O.H. (2000) Comparisson f vaginal and cervical insemination with fresh semen in Norwegian ewe using two diferents sperm numbers. *ICAR, Satellite Symposium: Reproduction in Small Ruminants. Sandnes, Noruega, 30 Junio-1 Julio* p 85.
145. Picton H.M., Tsonis C.G., McNeilly A.S. (1990) FSH causes a time-dependent stimulation of preovulatory follicle growth in the absence of pulsatile LH secretion in ewes chronically treated with gonadotrophin-releasing hormone agonist. *J Endocrine* 126:297-307.
146. Pineda M.H. (1989) Sistema reproductor de la hembra. En: L.E. McDonald, *Endocrinología Veterinaria y Reproducción*. 4a. ed., México, Interamericana, p 294-344.
147. Price C.A., Webb R. (1989) Ovarian responses to hCG treatment during the estrous cycle in heifers. *J Reprod Fertil* 86:303-308.

148. Ravindra J.P., Rawlings N.C., Evans A.C.O., Adams G.P. (1994) Ultrasonographic study of ovarian follicular dynamics in ewe during the oestrous cycle. *J Reprod Fertil* 101:501-509.
149. Riet J., Etchenique L., Jaunsolo D. (1938) La inseminación artificial y sus posibilidades en Uruguay. *Bol. Mens. Dir. Gana. MGA (Montevideo)* 22(3):206-225.
150. Roberts E.M., Hafez E.S. (1969) Synchronization of estrus in cyclic merino ewes with vaginal sponges and pregnant mare serum. *Am J Vet Res* 30:207-210.
151. Robinson T.J. (1965) Use of progestagen impregnated sponges inserted intravaginally or subcutaneously for the control of the oestrous cycle in the sheep. Australia. *Nature* 206:39-41.
152. Rubianes E., Menchaca A., Gil J., Olivera J. (2004) Reproductive performance of a new Timed Artificial Insemination protocol (Synchrovine) in sheep. *Reprod Fétil Dev* 16(4):508.
153. Rubianes E., Menchaca A., Carbajal B. (2003) Response of the 1 to 5 Day aged ovine corpus luteum to Prostaglandin F₂ α . *Anim Reprod Sci* 78:47-55.
154. Rubianes E., Ungerfeld R., Viñoles C., Rivero A., Adams G.P. (1997a) Ovarian response to gonadotrop in treatment initiated relative to wave emergence in ultrasonographic ally monitored ewes. *Theriogenology* 47:1479-1488.
155. Rubianes E., Beard A., Dierschke D.J., Bartlewsky P., Adams G.P., Rawlings N.C. (1997b) Endocrine and ultrasound evaluation of the response to PGF₂ α and GnRH given at different stages of the luteal phase in cyclic ewes. *Theriogenology* 48:1093-1104.
156. Rubianes E., De Castro T., Carbajal B. (1996a) Effect of high progesterone levels during the growing phase of the dominant follicle of wave 1 in ultrasonically monitored ewe. *Can J Anim Sci* 76:473-475.
157. Russel A.J.F., Doney J.M., Gunn R.G. (1969). Subjective assessment of body fat in live sheep. *J Agric Sci (Cambridge)* 72:451-454.
158. Scaramuzzi R.J., Adams N.R., Baird D.T., Campbell B.K., Downing J.A., Findlay J.K., Henderson K.M., Martin G.B., McNatty K.P., McNielly A.S., Tsonis C.G. (1993) A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reprod Fertil Dev* 5:459-478.
159. Schiewe M.C., Howard J.G., Goodrowe K.L., Stuart L.D., Wildt D.E. (1990) Human Menopausal Gonadotropin induces ovulation in sheep, but embryo

- recovery after prostaglandin F2a synchronization is compromised by premature luteal regression. *Theriogenology* 34:469-486.
160. Schrick F.N., Surface R.A., Pritchard J.Y., Dailey R.A., Townsend E.C., Inskip E.K. (1993) Ovarian structures during the estrous cycle and early pregnancy in ewe. *Biol Reprod* 49:1133-1140.
161. Sosa C., Abecia J.A., Forcada F., Meikle A. (2008) Undernutrition reduces the oviductal mRNA expression of progesterone and oestrogen receptors in sheep. *Vet J* 175:413-415.
162. Spencer T.E., Johnson G.A., Bazer F.W., Burghardt R.C. (2004a) Implantation mechanisms: insights from the sheep. *Reproduction* 128(6):657-668.
163. Stacey B.D., Gemmel R.R.T., Thorburn G.D. (1976) Morphology of the corpus luteum in the sheep during regression induced by prostaglandin F2 α . *Biol Reprod* 14:280-91.
164. Titi H.H., Kridli R.T. y Alnimer M.A. (2010) Estrus Synchronization in Sheep and Goats Using Combinations of GnRH, Progestagen and Prostaglandin F2a. *Reprod Dom Anim* 45:594-599.
165. Thimonier J. (1979) Hormonal control of oestrouscycle in theewe (a review). *Livest Prod Sci* 6:39-50.
166. Tsonis C.G., Findlay J.K. (1981) Aromatize activity, steroid content and artesian in ovine follicles. *Proceedings Endoc Soc Aust* 24:75.
167. Ungerfeld R. (2002) Control Endocrino del ciclo estral. En: Ungerfeld R. *Reproducción de los animals domésticos*. Montevideo, Melibea. v1, pp 41-55.
168. Ungerfeld R., Menchaca A., de Castro T., Rubianes E. (2002) Tratamientos hormonales para la inducción y sincronización de celos en ovejas y cabras. En: Ungerfeld R. *Reproducción en los animales domésticos*. Montevideo, Melibea. v2, pp 483-493.
169. Ungerfeld R. (2001) Control Endocrino el Ciclo Estral. En: *Fisiología de la Reproducción*. Impreso en Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay. (Sin numeración de páginas).
170. Ungerfeld R., Rubianes E. (1999) Effectiveness of short-term progestagen priming's for the induction of fertile oestrus with eCG in ewes during late seasonal anoestrus. *Anim Sci* 68:349:353.

171. Uribe-Velásquez L.F., Restrepo R., Osorio J.H. (2009b) Respostas foliculares e endócrinas em ovelhas após sincronização do estro usando progesterona, prostaglandinas (PGF 2α) e gonadotropinas. *Vet Zoot* 3(2):14-27.
172. Vilariño M., Rubianes E., Menchaca A. (2013) Ovarian responses and pregnancy rate with previously used intravaginal progesterone releasing devises for fixed-time artificial incemination in sheep. *Theriogenology* 79:206-210.
173. Viñoles C., Paganoni B., Milton J.T.B., Driancourt M.A., Martin G.B. (2011) Pregnancy rate and prolificacy after artificial insemination in ewes following synchronization with prostaglandin, sponges or sponges with bactericide. *Anim Prod Sci* 51:565-569.
174. Viñoles C., González de Bulnes A., Martin G.B., Sales F., Sale S. (2010) Sheep and Goats. En: Colloton, J, Gnemi, G. Atlas of Ruminant and Came lid Reproductive Ultrasonography. Ames, Luc Des Coteau p 181-210.
175. Viñoles C., Paganoni B., Milton M., Martin G.B. (2007) El uso de esponjas y eCG en programas de inseminación a tiempo fijo promueve una mejor fertilidad que la prostaglandina. 15 Jornadas Uruguayas de Buiatría. 7 al 9 de junio. Paysandú, Uruguay p 264-265.
176. Viñoles C., Quadrelli R., Marinho P., Bareille S., Driancourt M.A. (2006) El agregado de antibióticos disminuye la cantidad de mucus y el olor de las esponjas al finalizar el tratamiento. 14 Jornadas Uruguayas de Buiatría. 8 al 10 de junio. Paysandú, Uruguay p 211-212.
177. 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.
178. Viñoles C., Forsberg M., Rubianes E. (2000) Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in the ewe. *Proceedings 14th International Congress on Animal Reproduction, Sweden, Stockholm* 1:26.
179. Viñoles C., Banchemo G., Rubianes E. (1999a) Follicular wave pattern and progesterone concentrations in cycling ewes with high and low body condition score. *Theriogenology* 51:437 (abstract).
180. Viñoles C., Rubianes E. (1998) Origin of the preovulatory follicle after induced luteolysis during the early luteal phase in ewes. *Can J Anim Sci* 78:429-431.
181. Wathes D.C., and Lamming G.E. (1995) The oxytocin receptor, luteolysis and the maintenance of pregnancy. *J Reprod Fertil* 49(Suppl.):53-67.

182. Weems C.W., Weems Y.S., Randel R.D. (2006) Prostaglandins and reproduction in female farm animals. *Vet J* 171:206-228.
183. Weems Y.S., Bridges P.J., Lea Master B.R., Sasser R.G., Vincent D.L., Weems C.W. (1999) Secretion of progesterone, estradiol-17 β , PGE, PGF2 α , and pregnancy-specific protein B by 90-day intact and ovariectomized pregnant ewes. *Prostaglandin other lip med* 58(2):139-148.
184. White L.M., Keisler D.H., Dailey R.A., Inskeep E.K. (1987) Characterization of ovine follicles destined to form subfunctional corpora lutea. *J Anim Sci* 65:1595-1601.
185. Wiley T.M., Cárdenas H., Pope W.F. (1997) Effect of the rate of progesterone decline at luteolysis on the ovulatory follicles and subsequent estrous cycle length in ewes. *Anim Reprod Sci* 46:78-87.
186. Winterberger Torres S., Sevellec C. (1987) Atlas du développement embryonnaire précoce chez les ovins. Paris, INRA, 51 p.