

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE OXITOCINA Y/O PROSTAGLANDINA E2
PARA INDUCIR LA DILATACIÓN CERVICAL EN OVEJAS SOBRE: EL
MOMENTO DE LA OVULACIÓN, EL FOLÍCULO PREEVULATORIO Y EL
CUERPO LÚTEO RECIÉN FORMADO**

por

**GONNET MARIEYHARA, Luisina
LARROSA GARAY, Nadia**

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
2017

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de Grado aprobada por:

Presidente de Mesa:

Dr. Rafael Aragunde

Segundo Miembro (tutor):

Dr. Marcelo Rodríguez

Tercer Miembro:

Dr. Gonzalo Rosés

Cuarto Miembro (co-tutor):

Dr. Danilo Fila

Fecha:

2 de mayo de 2017

Autores:

Br. Luisina Gonnet Marieyhara

Br. Nadia Larrosa Garay

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a nuestro tutor Dr. Marcelo Rodríguez; co-tutor Dr. Danilo Fila y a la Dra. Daniela Casuriaga por brindarnos su apoyo, respaldo, dedicación y paciencia para permitirnos llevar adelante nuestra tesis de grado. También agradecer a todos los compañeros y profesores que formaron parte de este trabajo experimental.

Y un especial agradecimiento a nuestros familiares y amigos por el apoyo incondicional a lo largo de nuestra carrera.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE CUADROS Y GRÁFICOS.....	6
RESUMEN.....	7
SUMMARY	9
INTRODUCCIÓN	11
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA:	12
1. FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA DE LA HEMBRA OVINA.....	12
• <i>Etapas del ciclo estral</i>	12
• <i>Eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario</i>	13
• <i>Ovulación</i>	13
• <i>Formación del CL</i>	14
2. CONTROL HORMONAL DEL CICLO ESTRAL:	14
3. ESTRATEGIAS DE DILATACIÓN DEL CÉRVIX:.....	16
4. OX Y PGE2 – OVULACIÓN, FOLÍCULO PREEVULATORIO Y CUERPO LÚTEO.....	17
5. ULTRASONOGRAFÍA	18
6. INTENSIDAD DE PÍXELES.....	20
HIPÓTESIS	22
OBJETIVOS	22
1. OBJETIVO GENERAL	22
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
MATERIALES Y MÉTODOS	23
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	24
RESULTADOS.....	25
1. MOMENTO DE LA OVULACIÓN	25
2. FOLÍCULOS PREEVULATORIOS.....	26
3. CUERPOS LÚTEOS RECIENTES	26
DISCUSIÓN.....	28
1. MOMENTO DE LA OVULACIÓN	28
2. FOLÍCULOS PREEVULATORIOS.....	29

3. CUERPOS LÚTEOS RECIENTES	30
CONCLUSIÓN	31
RECOMENDACIÓN PARA NUEVOS EXPERIMENTOS	31
BIBLIOGRAFÍA	32

LISTA DE CUADROS Y GRÁFICOS

Página

Tabla 1. Número de ovejas que ovularon en distintos intervalos (h) luego de la administración de eCG.....	25
Tabla 2. Intensidad de pixeles en los CL desarrollados antes y después de la aplicación de los tratamientos (42 hs post-eCG).....	27
Gráfico 1. Número de ovejas que ovularon antes y después de la administración de Cb , Dp, Cb y Dp, y Control a las 42 h post eCG para inducir la dilatación cervical.....	26
Figura 1. Esquema del protocolo de sincronización (MAP-eCG) y aplicación de los tratamientos para inducir la dilatación cervical.....	24

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de la administración de un análogo sintético de Oxitocina (Carbetocina, Cb) y/o Prostaglandina E2 (Dinoprostone, Dp) para inducir la dilatación cervical en ovejas, sobre el momento en que se produce la ovulación; y la ecogenicidad del folículo preovulatorio y del cuerpo lúteo (CL) incipiente. El experimento fue realizado en el mes de abril (época reproductiva en Uruguay) empleando 40 ovejas multíparas de raza Corriedale, sincronizadas con una esponja impregnada con 60 mg de acetato de medroxiprogesterona por 13 días y la administración de 300 UI de eCG i.m. al momento de retirar la esponja. Doce horas antes de la IATF (42 h post-eCG), las ovejas fueron asignadas aleatoriamente en cuatro grupos de tratamientos (Cb, Dp, Cb+Dp y C, n=10 en cada uno). El Grupo Cb fue tratado con 40 µg (2 ml) i.m. de Cb (Decomotón), el Grupo Dp con 10 mg de Dp (Propess®), mediante la inserción de un dispositivo intravaginal de liberación lenta, el grupo Cb+Dp con ambas hormonas y un grupo control (C) placebo de ambos tratamientos.

En todos los animales se realizó el seguimiento ecográfico de los folículos a las 12, 20, 28, 36, 42, 48 y 54 h post eCG, siguiendo el folículo de mayor tamaño (preovulatorio) hasta su posterior desaparición (ovulación) y la aparición del CL recién formado, utilizando un ecógrafo portátil con un transductor trans-rectal lineal de 10MHz. Se midió la intensidad ecográfica del folículo preovulatorio y del CL recién formado, mediante captura de imágenes y video aplicando el software Image J (Software libre). Se calculó el intervalo eCG-ovulación (h) en todos los animales. Para comparar el intervalo eCG-ovulación y la intensidad de píxeles de los CL entre los grupos de tratamiento se utilizó Chi cuadrado. La intensidad de píxeles de los folículos preovulatorios se analizó por ANOVA (MixProc, SAS, 2000), tomando como efectos fijos el grupo y la h post eCG. Los datos fueron presentados como las medias±s.e.m, con diferencias consideradas significativas para $P<0,05$. Todos los animales ovularon antes de las 54 h post eCG y 34 de los 40 lo hicieron antes de las 42 h post-eCG. El intervalo eCG-ovulación fue mayor a 42 h post-eCG en el 30% de los animales tratados con Cb (Cb y Cb+Dp), mientras que en el 100% de los animales no tratados con Cb (Dp y C) fue menor a 42 h ($P<0,04$). No se encontraron efectos de los tratamientos sobre la intensidad de píxeles del folículo pre-ovulatorio,

debido al pequeño número de animales que ovularon luego del tratamiento (42 h post-eCG). Los CL desarrollados antes de los tratamientos de inducción a la dilatación cervical tuvieron menor intensidad de píxeles que los desarrollados después de los tratamientos (52.5 ± 5.4 , $n=20$ y 88.4 ± 9.0 , $n=11$; respectivamente, $P < 0.005$). La intensidad de píxeles de los CL tendió a ser menor en los animales tratados con Cb respecto a los tratados con Cb + Dp (76.8 ± 11.9 , $n=7$ y 137.9 ± 18.9 , $n=2$; respectivamente, $P=0.062$). A partir de éstos resultados se sugiere que la Cb podría retrasar el momento en que se produce la ovulación y el Dp aumentar la intensidad ecográfica del CL.

SUMMARY

The objective of the present study was to determine the effect of Carbetocin (Cb, a synthetic analogue of Oxytocin) and/or Dinoprostone (Dp, prostaglandin E2) administration for induction of cervical dilatation on the time of ovulation, the echogenicity of the preovulatory follicle and the early corpus luteum (CL). The experiment was carried out during the Corriedale breeding season in Uruguay (April) using 40 multiparous Corriedale ewes synchronized with intravaginal sponges impregnated with 60 mg of medroxyprogesterone acetate for 13 days and 300 IU of eCG i.m. at the sponge withdrawal. Twelve hours before AIFT, ewes were randomly assigned to four treatment groups (Cb, Dp, Cb + Dp and C, n = 10 in each group). The Cb group, was treated with 40 µg (2 mL) i.m. of Cb (Decomotón); Dp group with 10 mg of Dp in a slow release intravaginal device (Propess®); the Cb + Dp group, with both hormones and a placebo Control group of both treatments.

Ovarian ultrasonography was performed in all animals at 12, 20, 28, 36, 42, 48 and 54 h post eCG, following the major follicle (pre-ovulatory) until its disappearance (ovulation) and the appearance of newly formed CL, using a portable ultrasound with a 10MHz linear trans-rectal transducer. The ultrasound pixel intensity measurement of the pre-ovulatory follicle and the newly formed CL was performed through the capture of images and video and using Image J (Free software). The eCG-ovulation interval (h) was calculated in all animals. To compare the eCG-ovulation interval and the pixel intensity of the CLs between the treatment groups Chi square was used. The pixel intensity of the preovulatory follicles was analyzed by ANOVA (MixProc, Statistical Analysis Systems SAS Institute, Cary, NC, USA, 2000), considering the group and h post-eCG as a fixed effects. Data was presented as \pm SEM and differences with $P < 0.05$ were considered significant. All animals ovulated before the 54 h post eCG and 34 of 40 ovulated before the 42 h post-eCG. The chi-square test showed significant differences for ovulation time before and after administration of the treatments for induction of cervical dilatation (42 h post-eCG). The eCG-ovulation interval was greater than 42 h in 30% of the Cb treated animals (Cb, Cb + Dp), while it was less than 42h ($P < 0.04$) in all animals that were not treated with Cb. No significant effect of treatments on pre-ovulatory follicle pixel intensity was found, due to the small number of animals that ovulated after treatment (42 h post-eCG). In

contrast, the CL developed before the treatments for induction of cervical dilatation had lower pixel intensity than the CL developed after treatments (52.5 ± 5.4 , $n=20$ and 88.4 ± 9.0 , $n=11$; respectively, $P < 0.005$). Moreover, CL pixel intensity trend to be lower in animals treated with Cb than treated with Dp (76.8 ± 11.9 , $n=7$ y 137.9 ± 18.9 , $n=2$; respectively, $P=0.062$). Data suggest that Cb might delay ovulation and that Dp may affect the echographic intensity of CL.

INTRODUCCIÓN

La producción ovina representa el 9% del producto bruto interno agropecuario del país (M.G.A.P. 2015). Sin embargo, el Uruguay cuenta actualmente con poco más de 6.4 millones de ovinos (DI.CO.SE. 2016), luego de una caída del stock ovino en aproximadamente 16 millones de animales desde los años 90. En este contexto, la utilización de inseminación artificial (IA) es fundamental para el mantenimiento de la eficiencia económica del rubro (I.N.I.A. 2011). Sin embargo, la aplicación de la IA con semen congelado en ovinos es limitada, en parte debido a la dificultad para la canulación transcervical (Salamon y Maxwell, 2000). El cérvix ovino es pequeño, estrecho y posee anillos que restringen la luz del canal cervical (Moré, 1984; Halbert y col. 1990^a; Campbell y col. 1996; Kershaw y col. 2005). Como consecuencia, en la gran mayoría de las ovejas sólo es posible la IA en el orificio cervical caudal, lo que determina índices de concepción que rara vez superan el 50% utilizando semen congelado (Salamon y Maxwell, 2000; King y col. 2004; Fierro y col. 2013). Estos resultados mejoran con la profundidad de la canulación y son máximos utilizando la IA uterina transcervical (Windsor y col. 1994; Salamon y Maxwell, 2000).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA:

1. Fisiología reproductiva de la hembra ovina

La oveja es una especie poliéstrica estacional de día corto, con una estación reproductiva en verano-otoño, donde se desarrollan los ciclos estrales y un período de anestro en invierno-primavera (Duran del Campo, 1980). La estacionalidad reproductiva en la oveja depende principalmente de las variaciones de la duración del día (fotoperíodo), percibiendo los impulsos luminosos por parte de la retina. Esta información es conducida hasta la glándula pineal, la cual sintetiza y secreta melatonina (Chemineau, 1992). El perfil de secreción de melatonina aumenta durante las horas de oscuridad y disminuye durante las horas de luz. De este modo, la melatonina es el mensajero bioquímico que permite al animal medir la duración de la iluminación diaria (Abecia y Miranda, 2000). El papel de la melatonina sobre la reproducción ovina se ejerce a nivel hipotalámico, modificando la frecuencia de liberación de GnRH (hormona liberadora de gonadotropina), con lo que paralelamente implica a la liberación de LH (hormona luteinizante) hipofisaria y por tanto a la actividad gonadal (Abecia y Miranda, 2000).

El ciclo estral es un conjunto de eventos que se suceden entre dos ovulaciones, teniendo una duración promedio en la oveja de 17 días (rango de 14 a 19) (Ungerfeld, 2002). Estos eventos incluyen el estro, ovulación, formación, desarrollo y regresión del cuerpo lúteo (CL) y un nuevo estro (Duran del Campo, 1980).

El estro se caracteriza por la aceptación de la monta y en la oveja tiene una duración de 24 a 36 horas dependiendo de la raza, edad, estación de año y presencia del macho. La ovulación es espontánea y se presenta al final del estro, unas 24 a 27 horas de iniciado éste (Fernández-Abella, 1987; Hafez y Hafez, 2002).

- Etapas del ciclo estral

El ciclo estral se puede dividir en dos fases, según la estructura que predomine en el ovario durante cada una. La fase luteal se caracteriza por la presencia del CL y altos niveles de progesterona (P4) producida por éste, que se extiende desde el día 2-3

(celo=día 0) hasta alrededor del día 13 cuando se produce la luteólisis del cuerpo lúteo. La fase folicular se caracteriza por el desarrollo de una onda folicular ovulatoria, con predominio de uno o dos folículos de mayor tamaño que producen altos niveles de estradiol, y se extiende desde la luteólisis hasta la ovulación de al menos uno de ellos y el comienzo de la formación del nuevo CL (Ungerfeld, 2002; Senger, 2005).

- Eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario

El ciclo estral se encuentra regulado por las hormonas del hipotálamo (GnRH), la hipófisis anterior (hormona folículo estimulante, FSH y LH), el folículo (estrógenos, E2 e inhibina), el CL (progesterona, P4 y oxitocina, Ox) y el útero (prostaglandina F2 α , PGF2 α) (Stevenson, 2007; Viñoles, 2003). Estas hormonas actúan a través de un sistema de retroalimentación positiva y negativa (feedback) para regular el ciclo estral (Stevenson, 2007).

- Ovulación

La ovulación ha sido definida como la desaparición de un folículo preovulatorio de 5 a 7 mm de diámetro en la oveja (Ravindra y col. 1994); seguido por la detección del CL recién formado (Duggavathi y col. 2003). En las especies de ovulación espontánea (vaca, oveja, cabra, yegua) el pico de LH se desencadena a partir de mecanismos endócrinos endógenos, donde la caída de la P4 determina que se produzca una retroalimentación positiva entre GnRH y LH por un lado y los E2 por otro. Es decir, que ante cada pulso de GnRH la hipófisis responde con un pulso de LH; y el folículo responde a la LH secretando E2. Los E2 determinan que se produzca rápidamente un nuevo pulso de LH, el que inducirá un nuevo incremento de E2 (Ungerfeld, 2002). A su vez, el estradiol incrementa la sensibilidad de la hipófisis a la GnRH (Reeves y col. 1971) produciéndose finalmente una descarga masiva de LH (pico). El proceso ovulatorio se desencadena a partir de ésta, determinándose la ruptura del folículo preovulatorio, la liberación del ovocito y posterior luteinización del mismo (Ungerfeld, 2002).

A partir del pico de LH, aun antes de que la ovulación ocurra, las células de la granulosa comienzan a transformarse en tejido luteal. Un efecto importante del pico de LH es inducir a las células de la granulosa a que produzcan sustancias que debilitan la unión intercelular en la propia pared. Se conoce que algunas sustancias, como la $\text{PGF2}\alpha$, prostaglandina E2 (PGE2), los E2 y la relaxina incrementan su concentración en el líquido folicular durante este período. La inhibición experimental del incremento de algunas de estas hormonas impide que se desencadene el proceso ovulatorio (Ungerfeld, 2002).

- **Formación del CL**

El CL es una glándula endocrina transitoria, secretora de P4, la cual posee un rol importante en el establecimiento y mantenimiento de la gestación en mamíferos domésticos (Niswender y col. 1994; Fields y Fields, 1996; Schams y Berisha, 2004). Tiene una actividad funcional de entre 14 y 15 días en la oveja (Hafez y Hafez, 2002) y durante 12 de estos días predominan niveles altos de P4 (Coy Fuster, 1995). Secreta además, en cantidades menores: E2, relaxina, Ox, neurofisina I, inhibina y vasopresina (Uribe-Velásquez y col. 2011).

La función luteal intrínseca es controlada por la interacción de varios factores luteotróficos que incluyen la gonadotropina (LH), prolactina, $\text{PGF2}\alpha$ y E2. Dicha gonadotropina (LH), es esencial para la inducción de la ovulación y el inicio del proceso de luteinización (Uribe-Velásquez y col. 2011). El CL, en ausencia de apropiadas señales embrionarias, sufre luteólisis (Uribe-Velásquez y col. 2011). En rumiantes, la vida media del CL es controlada principalmente por las hormonas luteolíticas como: la $\text{PGF2}\alpha$ y la Ox afectando la duración del ciclo estral (Milvae, 2000).

2. Control hormonal del ciclo estral:

Se han identificado varios factores que reducen la eficiencia reproductiva de los ovinos. La raza, nutrición, edad, estación del año, manejo, lactación y las enfermedades parecen ser los más importantes (Godfrey y col. 1998). La sincronización del ciclo estral en esta especie es una biotecnología reproductiva que,

asociada a esquemas de inseminación artificial, es una herramienta útil para mejorar la eficiencia reproductiva, la productividad de las explotaciones, concentrar partos en épocas preestablecidas, favorecer la difusión de genotipos específicos y mejorar la genética (González-Stagnaro, 1993; Silva y col. 2010).

Los tratamientos hormonales para el control del estro y de la ovulación permiten inducir y sincronizar el estro en las hembras en anestro y sincronizar el momento de aparición del estro en hembras ciclando (Aisen, 2004). Los métodos más utilizados para la inducción y sincronización del estro y estimulación del crecimiento folicular en ovejas incluyen a la P4, los progestágenos y la administración intramuscular de eCG (Noel y col. 1994).

La sincronización del estro puede ser efectivamente alcanzada con una reducción en la duración de la fase luteal del ciclo estral, mediante PGF2 α o sus análogos sintéticos, los cuales producen una luteólisis controlada (Gonzalez-Bulnes y col. 2005) o por el alargamiento artificial de esta fase utilizando esponjas o dispositivos impregnados con progestágenos (Gonzalez-Bulnes y col. 2005; Husein y Kridli, 2003; Maffili y col. 2005). Estudios realizados han constatado que los análogos de P4, como el MAP (medroxiprogesterona), llegan a ser 20 veces más potentes que la P4 natural para suprimir el estro y la ovulación (Hamra y col. 1986), resultando en mejor respuesta reproductiva fuera de la época de apareamiento (Husein y Kridli, 2003).

La eCG, producida por las copas endometriales de yeguas preñadas entre los días 40 y 130 de gestación, en rumiantes posee actividad de FSH principalmente (80%), pero también de LH (20%) (Gordon, 1971; Barrett y col. 2004). Una dosis baja de eCG (350 – 500 UI) comunmente es administrada en ovejas ciclando luego de un pre tratamiento con P4, para sincronizar y acortar el intervalo estro - ovulación (Gordon, 1971 y 1996; Cline y col. 2001). Un tratamiento con dosis bajas de eCG, permite incrementar la tasa de crecimiento y la capacidad esteroidogénica de los folículos antrales (Driancourt y Fry, 1992; Barrett y col. 2004). La eCG debe estar asociada a la P4 para estimular la ovulación, tanto en la estación reproductiva, como fuera de ella (Rubianes y col. 1998; Safdarian y col. 2006). Así, Evans y Robinson (1980) constataron que el uso aislado de eCG, en altas dosis produce una respuesta

menos eficiente que cuando la hormona esta combinada con progestágenos exógenos, observando en este caso una mejor respuesta de fertilidad. Además, los datos obtenidos por Cardwell y col. (1998) en ovejas indicaron que el inicio del estro y de la ovulación se manifestaron más rápido y uniformemente, como resultado de la combinación del progestágeno con la eCG.

Olivera-Muzante y col. (2011), sugieren en un estudio comparando la performance reproductiva de un protocolo tradicional de IATF utilizando P4-eCG con un nuevo protocolo en base a doble dosis de PGF2 α separadas por 7 días, que la performance reproductiva (fertilidad y fecundidad) fue mejor en las ovejas tratadas con P4-eCG en comparación con las tratadas con PGF2 α .

3. Estrategias de dilatación del cérvix:

La dilatación cervical en la oveja al estro es favorecida por la activación estrógeno-dependiente del sistema Ox/PGE2. La activación del sistema Ox/PGE2 induce a la relajación del músculo liso y a la remodelación del colágeno cervical permitiendo la apertura del canal cervical al estro (Rodríguez-Piñon, 2015).

En función de lo anterior, la Ox y la PGE han sido utilizadas para dilatar el cérvix y facilitar su canulación, administradas solas (Stellflug y col. 2001; King y col. 2004; Leethongdee y col. 2010) o combinadas (Leethongdee y col. 2007; De Rossi y col. 2009; Falchi y col. 2012).

Considerando la corta vida media de la Ox (minutos), se desarrolló un análogo sintético, la Carbetocina (Cb), la cual presenta una actividad de unión al receptor de Ox similar al de la Ox natural pero su acción biológica se prolonga por 12 h (Atke y Vilhardt, 1987). Esto podría asegurar un efecto oxitónico lo suficientemente largo para desencadenar los procesos de dilatación cervical sin necesidad de usar administraciones repetidas o altas dosis que posiblemente interfieran en la fertilidad.

Una preparación intravaginal de PGE2 sintética, diseñada para su utilización en humanos, el Dinoprostone (Dp, Cervidil®), ha sido administrada a ovejas en anestro,

para aumentar la penetrabilidad cervical y mejorar la utilización de la IA. Resultando que los 6 animales tratados pudieron ser canulados transcervicalmente hasta el útero, mientras que solo 2 de 6 lo fueron en el grupo no tratado (Candappa y col. 2009).

Hay evidencias respecto a la participación de la PGE y Ox en la dilatación cervical, sin embargo no se ha estudiado el impacto de la administración de estas hormonas sobre el ovario.

4. Ox y PGE2 – Ovulación, folículo preovulatorio y cuerpo lúteo.

A pesar de que las investigaciones utilizando tratamientos con Ox y/o PGE para dilatar el cérvix ovino llevan más de dos décadas, poco se sabe del efecto de éstos tratamientos sobre el desarrollo folicular final, la ovulación y el desarrollo del CL incipiente mediante el seguimiento de su ecogenicidad. Se ha demostrado que los ovarios producen Ox, que es un potente regulador de la función del útero y ovario (Howard y col. 1990; Kotwica y Skarzynski, 1993; Rasch y col. 1996). A nivel ovárico las estructuras capaces de sintetizar la Ox son las células de la granulosa del folículo preovulatorio y el CL, participando dicha hormona en la luteinización del folículo (Saller y col. 2010) y a su vez junto con la acción de la PGF2 α son capaces de desencadenar la luteólisis (Moore y col. 1986). La Ox está asociada secundariamente a la GnRH como factor hipotalámico preovulatorio, estimulando a la liberación de gonadotrofinas (FSH y LH) en la hipófisis anterior (Robinson y Evans 1990). Se ha sugerido que la Ox tiene función fisiológica en la foliculogénesis, modulando el proceso de selección folicular, acelerando la maduración del folículo y la ovulación (Bobowiec y col. 2003). En ése sentido, la administración de Ox de liberación lenta al inicio del estro en ovejas adultas produjo un aumento de la tasa de ovulación respecto a los controles no tratados (179 y 151%, respectivamente) (King y Coetzer, 1997). Un estudio similar, pero administrando Ox de corta acción cada 30 minutos por 24 hs y comenzando al inicio del estro también provocó un aumento de la tasa ovulatoria en las ovejas tratadas (King y Coetzer, 1996).

Por otra parte, es conocido que las PG participan en la ruptura del folículo preovulatorio en mamíferos (Armstrong, 1981). En roedores se determinó que las concentraciones foliculares de PGE₂ y PGF₂ α aumentan durante el proceso ovulatorio (LeMairey col. 1973 y 1975; Espey y col. 1991; Espey y Richards, 2006). La inhibición del incremento de PGE₂ (Ungerfeld, 2002) o de sus receptores (Ok Kim y Duffy, 2016), impide que se desencadene el proceso ovulatorio. Además, la ovulación fue bloqueada en ratones knock-out para receptores de PGE (Davis y col. 1999; Hizakiy col. 1999) y mediante el tratamiento con inhibidores de la síntesis de PG en roedores y rumiantes (Armstrong, 1981; Murdoch y col. 1993; Li y col. 2006). Las evidencias son contundentes respecto a la participación de la PGE en el proceso ovulatorio y sugieren que la utilización de PGE exógena en ovejas podría afectar el tiempo y/o proceso normal de ovulación.

Se ha planteado que las prostaglandinas I (PGI) y PGE son importantes para la función luteal normal. Estas PG se producen en mayores cantidades en la fase luteal temprana y pueden desempeñar un papel importante en el desarrollo luteal, aumentando la síntesis de P₄ (Niswender y col. 2000; Schams y Berisha, 2002).

El estudio del efecto de la administración de Ox y PGE₂ sobre el momento de la ovulación y las primeras etapas de la luteinización del folículo ovulatorio puede aportar información valiosa para el diseño de un protocolo hormonal para inducir la dilatación cervical en ovejas.

5. Ultrasonografía

La ultrasonografía (US) es una técnica no invasiva de obtención de imágenes, ampliamente utilizada para examinar el tracto reproductivo de rumiantes domésticos. En las hembras de estas especies es frecuentemente utilizada para la determinación de la preñez y el estudio de la actividad ovárica (ej. reclutamiento, desarrollo y dominancia folicular; patrones de ondas foliculares; desarrollo del CL), y también para la detección de patologías en el tracto reproductivo de machos y hembras (González-Bulnes y col. 2010; Ungerfeld y Fila, 2011; Brito y col. 2012).

En los años 1990 la US transrectal ovárica fue adaptada para el uso de pequeños rumiantes (Ginther y col. 1995; Ginther y Kot, 1994; Ravindra y col. 1994; Schrick y col. 1993). La US ha permitido la evaluación de los efectos de varias hormonas exógenas sobre los ovarios en la oveja (Barrett y col. 2002 y 2004; Bartlewski y col. 2001, 2003 y 2004; Duggavathi y col. 2004; Liu y col. 2006).

Los ecógrafos más utilizados en Medicina Veterinaria son llamados de modo B y tiempo real, equipados con transductores lineales, sectoriales y convexos que emiten ondas de ultrasonido de 3.5 MHz, 5.0 MHz ó, 7.5 MHz. El término “modo B” se refiere a la modalidad de brillo, donde la imagen que se logra es la correspondiente a un corte bidimensional del órgano en estudio, conformada por pequeños puntos de diferente intensidad, cada punto es definido como “un pixel” (Monina y col. 2000).

La apariencia ultrasonográfica de un tejido es denominada ecotextura, y está asociada a la composición histomorfológica del mismo (ej. agua y contenido macromolecular, densidad celular, etc.) (Pierson y Ginther, 1985; Townson y Ginther, 1989; Griffing y Ginther, 1992; Bergfelt y Ginther, 1996). El líquido no refleja las ondas de ultrasonido y por ello se denomina no ecogénico (como por ejemplo folículos ováricos), viéndose de color negro. Los tejidos densos como el hueso reflejarán las ondas y se los llamará hiperecogénicos tomando color blanco. Las demás estructuras oscilarán en las distintas gamas de grises de acuerdo a su densidad (Monina y col. 2000).

Una imagen ecográfica se compone de una matriz de pixeles, o elementos de imagen, representada en una pantalla de video. Miles de pixeles forman colectivamente la imagen. Cada uno de ellos puede asumir en la imagen obtenida uno de 256 colores diferentes que van desde el negro (0) al blanco (255). Como el ojo humano solamente puede reconocer 18 a 20 diferentes tonos de gris un sistema de análisis de imagen computarizado posibilita mejorar el estudio del patrón de imagen o ecotextura. El estudio computarizado de las imágenes ultrasonográficas ha posibilitado un medio adecuado para evitar la inconsistencia de la evaluación subjetiva visual de las imágenes de US (Singh y col. 2003).

6. Intensidad de píxeles

La intensidad de píxeles está relacionada al contenido celular y macromolecular del tejido, y la heterogeneidad de píxeles refleja la presencia de áreas no ecogénicas (oscuridad ej. vasos sanguíneos) y ecogénicas (brillo ej. densos cúmulos de células) en el tejido (Pierson y Adams, 1995; Duggavathi y col. 2003).

El análisis de intensidad de píxeles de las ecografías podría proveer información acerca del cambio sufrido por los tejidos (Pierson y Adams, 1995; Chandolia y col. 1997). Varios estudios demuestran la utilidad del análisis para demostrar dichos cambios. Un estudio de imágenes foliculares y luteales en vacas y mujeres reflejan cambios discretos en su morfología y función secretora (Pierson y Adams, 1995). Otro ejemplo de ello es un estudio realizado por Liu y col. (2007) para determinar las características ultrasonográficas de folículos ovulatorios en crecimiento de ovejas ciclando sincronizadas con esponjas intravaginales de MAP e inyección de eCG al momento de retirar la esponja; el cual determinó que la intensidad media de píxeles del antro folicular aumentó luego de la administración de eCG. Esto se puede atribuir a la ocurrencia de cambios en la morfología (hipertrofia y proliferación de las células de la glanulosa y la teca) y en la función secretora de los folículos durante su crecimiento (Singh y col. 1998; Singh y Adams, 2000).

La imagen ultrasonográfica es un potencial indicador del estatus fisiológico y funcional del CL en varias especies (Singh y col. 1997; Siqueira y col. 2009) y permite la evaluación secuencial del tamaño (área), forma y consistencia del CL (Pierson y Ginther, 1987; Kastelic y Ginther, 1989). Por lo tanto, es posible monitorear el desarrollo del mismo durante su vida (Pieterse y col. 1990; Hanzen y col. 2000). Un estudio realizado en bovinos (Siqueira y col. 2009) y otro similar en cabras (Arashiro y Brandão, 2008) para evaluar características morfológicas, funcionales y ecotextura del CL comprobó que el desarrollo luteal medido en intensidad de píxeles está altamente relacionado con su funcionalidad (producción de progesterona) durante el ciclo estral.

Según Duggavathi y col. (2003) en un seguimiento de la luteogénesis en ovejas ciclando la intensidad de pixeles y la heterogeneidad disminuyó ($p < 0.05$) desde 12-24 hasta 60-72 horas luego de la ovulación. Esto lo atribuye al incremento de las superficies reflectivas de las paredes del folículo colapsado y a la presencia de coágulos sanguíneos que influyen la ecotextura del CL recién formado. La disminución significativa en la heterogeneidad de pixeles del cuerpo lúteo a las 60-72 hs post ovulación podría deberse al hecho de que el tejido luteal predomina a las 72 horas aproximadamente y los coágulos de sangre fueran menores en número y más difusos, resultando en un patrón de ecogenicidad más homogéneo.

HIPÓTESIS

El tratamiento con Carbetocina o Dinoprostone y la administración conjunta de ambas drogas para inducir la dilatación cervical afecta el momento en que se desencadena la ovulación, el folículo preovulatorio y CL incipiente.

OBJETIVOS

1. Objetivo General

Estudiar si el tratamiento con Carbetocina o Dinoprostone y la administración conjunta de ambas drogas afecta el momento en que se produce la ovulación; y la ecogenicidad del folículo preovulatorio y del CL incipiente.

2. Objetivos específicos

Determinar mediante ecografía ovárica el efecto de la administración de Cb o Dp y de la administración conjunta de ambas drogas en ovejas con ovulación sincronizada con medroxiprogesterona (MAP) y gonadotrofina coriónica equina (eCG) sobre:

- El momento de la ovulación (intervalo eCG-ovulación).
- La ecogenicidad del folículo preovulatorio.
- La ecogenicidad del CL resultante de la ovulación.

MATERIALES Y MÉTODOS

En el campo Experimental N°1 de la Facultad de Veterinaria (Migues, Canelones) cuarenta ovejas Corriedale multíparas provenientes de la misma majada, con un peso homogéneo y un estado corporal de 2.5 a 3.5 en la escala de 0-5 de Russel y col. (1969), desparasitadas y vacunadas (Clostridios) como el resto de la majada general y alimentadas a base de campo natural; fueron tratadas en el mes de abril (época reproductiva en Uruguay) con el protocolo MAP-eCG, diseñado para realizar una IATF a las 54 h post-eCG (Olivera-Muzante y col. 2011). El mismo consistió en la administración intravaginal de una esponja impregnada con 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP, Syntex, Buenos Aires, Argentina) por 13 días y la administración de 300 UI de eCG i.m. (Novormon 5000®, Syntex, Buenos Aires, Argentina) al momento de retirar la esponja. Doce horas antes de la IATF (42 h post-eCG), las ovejas fueron asignadas aleatoriamente a los cuatro Grupos de tratamientos para inducir la dilatación cervical de acuerdo a un arreglo factorial 2 x 2 (Cb, Dp, Cb+Dp y C, n=10 en cada uno) y tratadas correspondientemente. El Grupo Cb fue tratado con 40 µg (2 mL) i.m. de Cb (Decomotón, Laboratorios Callier, Uruguay) y un dispositivo intravaginal (Propess®) sin principio activo, el Grupo Dp con 10 mg de Dp mediante la inserción de un dispositivo intravaginal de liberación lenta (Propess®, Ferring Pharmaceuticals Ltd., West Drayton, Reino Unido) y una inyección i.m. de 2 mL de suero fisiológico, el Cb+Dp con ambas hormonas y al Grupo C se le administró una inyección i.m. de 2 mL de suero fisiológico y un dispositivo intravaginal (Propess®) sin principio activo (Figura 1). Luego de la limpieza y desinfección de la zona perineal, la aplicación de los dispositivos intravaginales se realizó lo más próximo al anillo cervical caudal posible, para lo que se utilizó un vaginoscopio, colocando el animal con el tren posterior elevado.

En todos los animales se siguieron ecográficamente los folículos mayores a 3 mm, a las 12, 20, 28, 36, 42, 48 y 54 h post eCG, identificando retrospectivamente al folículo de mayor tamaño (preovulatorio) hasta su desaparición (ovulación) y la aparición del CL resultante; utilizando un ecógrafo portátil (EsaoteMyLabOne, Genova, Italia) con un transductor trans-rectal lineal de 10MHz. Todos los parámetros del equipo se mantuvieron constantes. Se realizó la medición de la intensidad ecográfica del folículo preovulatorio y del CL recién formado mediante

captura de imágenes y video aplicando el software Image J (Software libre). Se calculó el intervalo eCG-ovulación (h) en todos los animales.



Figura 1. Esquema del protocolo de sincronización (MAP-eCG) y aplicación de los tratamientos para inducir la dilatación cervical.

Análisis estadístico

Para comparar el intervalo eCG-ovulación y la intensidad de pixeles de los CL entre los grupos de tratamiento se utilizó Chi cuadrado. La intensidad de pixeles de los folículos preovulatorios se analizó por ANOVA tomando como factores fijos el tratamiento y la hora post-eCG (MixProc, Statistical Analysis Systems SAS Institute, Cary, NC, EEUU, 2000). Los datos fueron presentados como las medias \pm s.e.m, con diferencias consideradas significativas para $P < 0,05$.

RESULTADOS

1. Momento de la ovulación

Todos los animales ovularon antes de las 54 h post eCG y 34 de los 40 animales (85%) lo hicieron antes de las 42 h post-eCG (Tabla 1).

Intervalo post-eCG (h)	Cb (n=10)	Dp(n=10)	Cb+Dp(n=10)	C(n=10)
12-20			1	2
20-28		6	3	4
28-36	2	1	3	3
36-42	4	3	1	1
42-48			1	
48-54	4		1	

Tabla 1. Número de ovejas que ovularon en distintos intervalos (h) luego de la administración de eCG a ovejas Corriedale sincronizadas con medroxiprogesterona (60 mg, 13 días) y eCG (im, 300 UI) y tratadas con Carbetocina (im, 40 µg, Cb), Dinoprostone (intravaginal, 10 mg, Dp), Cb y Dp (mismas dosis y vías, Cb+Dp) y Control (C) a las 42 h post eCG para inducir la dilatación cervical.

El Test de Chi cuadrado mostró diferencias significativas para el momento de la ovulación antes y luego de la administración de los tratamientos de inducción de la dilatación cervical (42 h post-eCG, $P < 0,04$). Todas las ovejas tratadas con Dp o controles ovularon antes del tratamiento y 6 de los 20 animales (30%) tratados con Cb (sola o combinada) ovularon después del mismo (Gráfico 1).

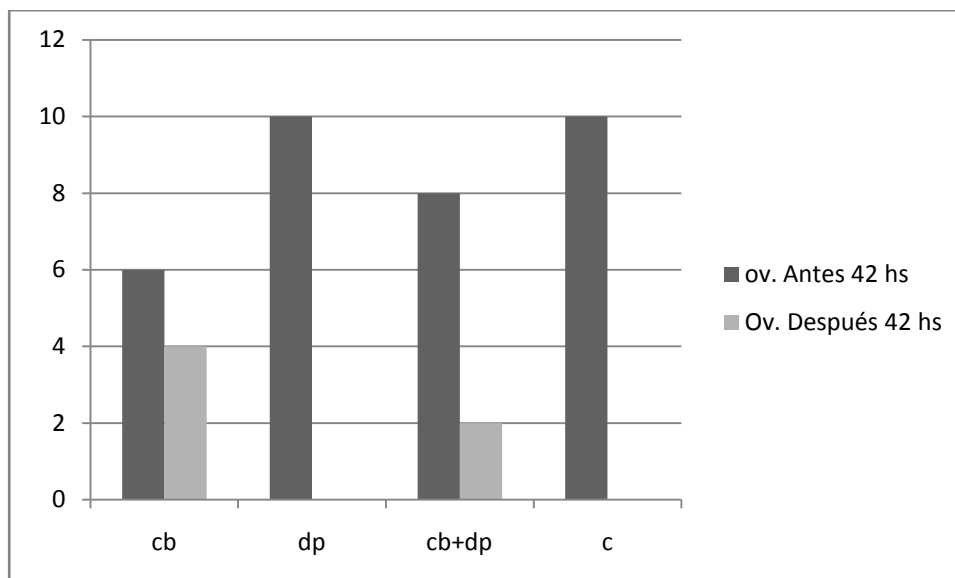


Gráfico 1. Número de ovejas Corriedale sincronizadas con medroxiprogesterona (60 mg, 13 días) y eCG (im, 300 UI) que ovularon antes y después de la administración de Carbetocina (im, 40 µg, Cb), Dinoprostone (intravaginal, 10 mg, Dp), Cb y Dp (mismas dosis y vías, Cb+Dp) y Control (C) a las 42 h post eCG para inducir la dilatación cervical.

2. Folículos preovulatorios

No se detectó un efecto de los tratamientos para inducir la dilatación cervical sobre la intensidad de pixeles del folículo preovulatorio, debido al pequeño número de animales que ovularon luego del tratamiento (42 h post-eCG). Tampoco hubo efecto de la hora post-eCG sobre la intensidad en pixeles del folículo preovulatorio.

3. Cuerpos lúteos recientes

Algunos de los cuerpos lúteos se observaron por primera vez antes de las 42 h post-eCG y otros después. Se analizaron si los que se desarrollaron antes del tratamiento eran distintos que los que lo hicieron después. El test de Chi cuadrado mostró que la intensidad de pixeles fue diferente en aquellos cuerpos lúteos desarrollados antes y después de los tratamientos de inducción a la dilatación cervical (antes de las 42 h) (52.5 ± 5.4 , $n=20$ y 88.4 ± 9.0 , $n=11$; respectivamente, $P < 0.005$). En éste último grupo, 7 correspondían al grupo Cb y 2 al grupo Cb+Dp. El análisis del efecto del tratamiento sobre la intensidad de pixeles del cuerpo lúteo en éstos casos mostró que la intensidad de pixeles de los animales del grupo Cb tendió a ser menor que el

grupo Cb+Dp (76.8 ± 11.9 , $n=7$ y 137.9 ± 18.9 , $n=2$; respectivamente, $P=0.0620$) (Tabla 2).

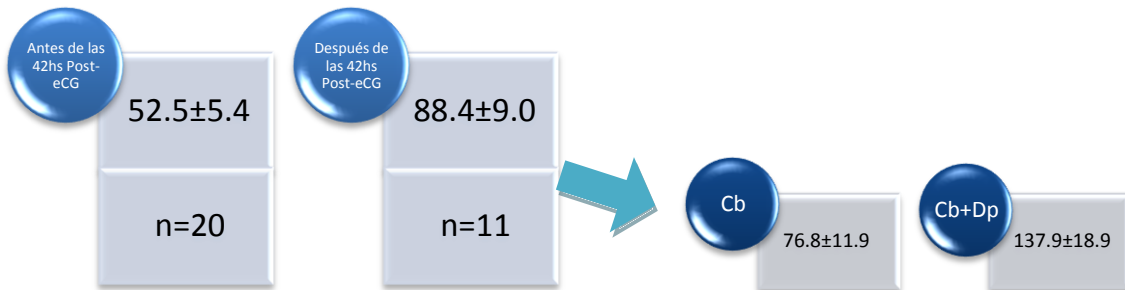


Tabla 2. Intensidad de pixeles en los CL desarrollados antes y después de la aplicación de los tratamientos (42 hs post-eCG).

DISCUSIÓN

1. Momento de la ovulación

En el presente experimento, todos los animales ovularon antes de las 54 h post-eCG y el 85% lo hicieron antes de las 42 h. Coincidentemente, ovejas Polwarth (Ideal) sincronizadas muy similarmente, con un dispositivo intravaginal con MAP por 12 días y 250 UI de eCG al retirarlo, ovularon antes de las 48 hs post-eCG (Viñoles y col. 2001). En ovejas Farafra sincronizadas con un dispositivo intravaginal de silicona impregnado con progesterona natural por 12 días y al retiro 400 UI de eCG, las ovulaciones comenzaron a las 48 h post eCG, pero se extendieron hasta las 72 h (Ali y col. 2009). Similarmente, en ovejas Corriedale sincronizadas con un dispositivo intravaginal también con progesterona natural pero por 6 días y a su retiro 300 UI de eCG, la ovulación ocurrió entre las 62 y 74 h post-eCG (Vilariño y col. 2010, 2013). Las discrepancias en el momento en que ocurre la ovulación en éstos protocolos de sincronización podrían deberse a las diferencias en la actividad biológica de los progestágenos y/o a la duración del tratamiento utilizado, entre otros factores. La potencia biológica de la MAP es mayor que la de la progesterona natural y su vida media más larga (Africandera y col. 2014), por lo cual es de esperar un efecto inductor del recambio folicular (Rubianes y col. 1999; Viñoles y col. 2001) mayor de la MAP respecto a la progesterona natural. Se puede especular que el alto recambio folicular inducido por la MAP favorecería el rápido surgimiento de la onda folicular ovulatoria al retirar la esponja y administrar eCG. El mayor intervalo eCG-ovulación cuando se utilizan tratamientos cortos de MAP respecto a los tratamientos largos va en el mismo sentido (Viñoles y col. 2001). Tampoco se puede descartar que haya un factor racial coadyuvante en la determinación del momento en que se produce la ovulación en éstos protocolos de sincronización.

El hecho de que todas las ovejas hayan ovulado antes de las 54 h post-eCG, momento esperado para la aplicación de la IATF sugerido por Gordon (1996) y utilizado en varios trabajos más recientes (Olivera-Muzante y col. 2011; Abecia y col. 2012; Dos Santos Neto y col. 2015) implica que las ovejas serían inseminadas después de la ovulación. Dado que la vida fecundable de los ovocitos ovinos se ha estimado en 12 - 24 h (Dzuik, 1965) y el tiempo estimado de migración de los

espermatozoides desde la vagina hasta el oviducto es de 8-10 horas (Druart y col. 2009), se recomienda aplicar la IA pocas horas antes de la ovulación, por lo cual el momento en que se produce la ovulación y el momento esperado para la IATF en el presente experimento podrían comprometer la fertilidad.

Debido a lo temprano en que ocurrieron las ovulaciones, muy pocos animales ovularon luego del tratamiento de inducción de la dilatación cervical (42 h post-eCG), comprometiendo el estudio del efecto de éstos tratamientos sobre el momento de la ovulación. El hecho de que los 6 de los 20 animales tratados con Cb ovularon luego de las 42 h post-eCG y ninguno de los no tratados con Cb lo hicieran, sugiere que la Cb podría retrasar el momento en que se produce la ovulación en un tercio de los animales. No encontramos estudios que afirmen algo similar, por el contrario existen trabajos que indican que la administración continua de Ox natural durante el estro en la oveja participa en la foliculogénesis, acelerando la maduración del folículo y adelantando la ovulación (Bobowiec y col. 2003).

2. Folículos preovulatorios

Debido al pequeño número de animales que ovuló luego del tratamiento para inducir la dilatación cervical, no fue posible encontrar un efecto significativo del mismo sobre la intensidad de pixeles de los folículos preovulatorios. Independientemente del tratamiento, no encontramos que la intensidad de pixeles de los folículos preovulatorios fuera afectada por la hora post eCG, probablemente debido al similar estadio de desarrollo de los folículos medidos, independientemente del tiempo en que demoraron en desarrollarse como folículos preovulatorios desde la administración de eCG. Considerando que la intensidad de pixeles en los folículos antrales de ovejas Western White Face tratadas con MAP (60 mg) durante 12 días y eCG (500 UI) fue mayor que las no tratadas con eCG y fue mayor a las 24 h post eCG que a las 0 h, (Liu y col. 2007), también puede ser posible que la dosis de eCG utilizada en nuestro experimento, que fue aproximadamente la mitad de la utilizada por Liu y col. (2007), no haya sido suficiente para producir cambios ecotexturales en el fluido ovárico. Se ha planteado la existencia de una correlación positiva entre la intensidad de pixeles del líquido folicular y el estado funcional de los folículos, en términos de producción de estradiol (Singh y col. 1998; Singh y Adams, 2000). Esto

podría deberse a que durante la fase final de crecimiento del folículo antral, los mismos se vuelven deficientes en células de la granulosa, y el contenido de las mismas se empieza a desprender de la pared y queda disperso en el fluido folicular (Espey, 1999; Singh y Adams, 2000).

3. Cuerpos lúteos recientes

En los cuerpos lúteos visualizados previo al tratamiento de inducción de la dilatación cervical (producto de ovulaciones que no fueron afectadas por el tratamiento), la intensidad fue menor que en aquellos visualizados luego del tratamiento, sugiriendo que hay un efecto de alguno de los tratamientos sobre la intensidad de pixeles del cuerpo lúteo. Un estudio realizado en bovinos (Siqueira y col. 2009) y otro similar en cabras (Arashiro y Brandão, 2008) para evaluar características morfológicas, funcionales y ecotextura del CL, comprobó que el desarrollo luteal medido en intensidad de pixeles está altamente relacionado con su funcionalidad (producción de progesterona) durante el ciclo estral. En este sentido, la mayor intensidad de pixeles en los CL que se formaron luego de los tratamientos de inducción a la dilatación cervical podría estar indicando que estos tratamientos aumentarían la producción de progesterona del CL y favorecerían por lo tanto la supervivencia embrionaria. El rol de la Ox y las PG en el desarrollo luteal inicial estimulando la proliferación de las células luteales ha sido reportado (Uribe-Velásquez y col. 2011); además se sabe que la PGE es fundamental para la función luteal normal (Niswender y col. 2000; Schams y Berisha, 2002; Uribe-Velásquez y col. 2011). En nuestro trabajo, encontramos evidencias de que los animales tratados con Dp y Cb tendieron a tener CL con intensidad de pixeles mayor a la de los tratados sólo con Cb, sugiriendo que la administración de Dp podría aumentar la intensidad ecotextural del CL. Sin embargo no encontramos bibliografía que nos permita comparar el efecto de similares tratamientos sobre la intensidad de pixeles. Se deberían hacer estudios con un número mayor de animales para confirmar esta tendencia. No se encontraron estudios que evalúen el efecto del Dp sobre el CL medido en intensidad de pixeles.

CONCLUSIÓN

Antes de las 54 h post eCG la totalidad de los animales ya habían ovulado, concentrándose la mayoría antes de las 42 h post eCG (85 %), lo que es demasiado temprano para aplicar una IATF a las 54 h post-eCG. Se registró un retraso en el momento de la ovulación en 1/3 de los animales tratados con Cb. No se encontraron efectos de los tratamientos ni de la eCG sobre la intensidad de pixeles del folículo pre-ovulatorio. Sin embargo, el tratamiento con Dp en presencia de Cb tendió a aumentar la intensidad de pixeles de los CL recién formados.

Recomendación para nuevos experimentos

Comenzar antes el tratamiento de inducción a la dilatación cervical y adelantar el momento de la IATF.

Evaluar en un futuro la fertilidad obtenida con la IATF luego de la aplicación de estos tratamientos.

Se podría implementar el uso del eco Doppler para evaluar el flujo sanguíneo de las estructuras ováricas en futuros trabajos.

Sería interesante evaluar en un futuro experimento si el desarrollo luteal medido en intensidad de pixeles está relacionado con la producción de P4; para lo cual habría que realizar un seguimiento, del desarrollo luteal post ovulación mediante ecografía y de la concentración de P4 sérica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abecia FFJ, Miranda FF (2000). Control de la actividad reproductiva del ovino. *Mun ganad.* 63 p.
2. Abecia JA, Forcada F, González-Bulnes A. (2012). Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Anim Reprod Sci.* 130 (3–4):173–179.
3. Africandera DJ, Storbecka KH, Hapgoodb JP. (2014). A comparative study of the androgenic properties of progesterone and the progestins, medroxyprogesterone acetate (MPA) and norethisterone acetate (NET-A). *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* 143: 404–415.
4. Aisen EG. (2004). Reproducción ovina y caprina. Buenos Aires. Ed. Inter-Medica. 193 p.
5. Ali A, Hayder M, Saifelnaser EOH (2009). Ultrasonographic and endocrine evaluation of three regimes for oestrus and ovulation synchronization for sheep in the subtropics. *Reprod Dom Anim.* 44: 873-878.
6. Arashiro EKN, Brandão FZ. (2008) Função luteal em caprinos: características morfológicas, endócrinas e atributos de imagem. *Arq Ciênc Vet Zool Unipar, Umuarama.* 11(2):183-184.
7. Armstrong DT. (1981). Prostaglandins and follicular functions. *J Reprod Fertil.* 62: 283-291.
8. Atke A, Vilhardt H. (1987). Uterotonic activity and myometrial receptor affinity of 1-deamino-1-carba-2-tyrosine (O-methyl)-oxytocin. *Acta Endocrinol (Copenh).* 115: 155-160.
9. Barrett DMW, Bartlewski PM, Batista – Arteaga M, Symington A, Rawlings NC (2004). Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to a single dose of 500 UI of eCG following a 12 –day treatment with progestogen -releasing intravaginal sponges in the breeding and nonbreeding season in ewes. *Theriogenology.* 61: 311-327.
10. Barret DMW, Bartlewski PM, Rawlings NC. (2002). Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to prostaglandin F2 α given at different times during the luteal phase in ewes. *Theriogenology.* 58:1409-1424.
11. Bartlewski PM, Aravindakshan J, Beard AP, Nelson ML, Batista-Arteaga M, Cook SJ. (2004). Effects of medroxyprogesterone acetate (MAP) on ovarian antral follicle development, gonadotrophin secretion and response to ovulation induction with gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) in seasonally anoestrous ewes. *Anim Reprod Sci.* 81:63-75.

12. Bartlewski PM, Beard AP, Chapman CL, Nelson ML, Palmer B, Aravindakshan J. (2001). Ovarian responses in GnRH-treated anoestrous ewes: follicular and endocrine correlates with luteal outcome. *Reprod Fertil Dev.* 13:133-142.
13. Bartlewski PM, Duggavathi R, Aravindakshan J, Barret DMW, Cook SJ, Rawlings NC. (2003). Effects of a 6-day treatment with medroxyprogesterone acetate (MAP) after prostaglandin F₂ α (PgF₂ α) - induced luteolysis at mid-cycle on antral follicular development and ovulation rate in nonprolific Western white faced ewes. *Biol Reprod.* 68:1403-1412.
14. Bergfelt DR, Ginther OJ. (1996). Ovarian, uterine and embryo dynamics in horses versus ponies. *J Equine Vet Sci.* 16:66-72.
15. Bobowiec R, Kosior-Korzecka U, Wójcik M, Martelli F, Sighieri C, Patkowski K. (2003). Stimulation of ovulation rate in ewe by continuous oxytocin administration during oestrus. *ACTA Sci Pol. Med Vet.* 2 (2): 3-10.
16. Brito LFC, Barth AD, Wilde RE, Kastelic JP. (2012). Testicular ultrasonogram pixel intensity during sexual development and its relationship with semen quality, sperm production, and quantitative testicular histology in beef bulls. *Theriogenology.* 78: 69-76.
17. Campbell JW, Harvey TG, McDonald MF, Sparksman RI. (1996). Transcervical insemination in sheep: An anatomical and histological evaluation. *Theriogenology.* 45: 1535-1544.
18. Candappa IB, Bainbridge HC, Price NT, Hourigan KR, Bartlewski PM. (2009). A preliminary study on the suitability of Cervidil to induce cervical dilation for artificial insemination in ewes. *Res Vet Sci* 87: 204-206.
19. Cardwell BE, Fitch GQ, Geisert RD. (1998). Ultrasonic evaluation for the time of ovulation in ewes treated with norgestomet and norgestomet followed by pregnant mare serum gonadotropin. *J Anim Sci* 76:2235-2238.
20. Chandolia RK, Bartlewski PM, Omeke BC, Beard AP, Rawlings NC, Pierson RA. (1997). Ultrasonography of the developing reproductive tract in ram lambs: effects of a GnRH agonist. *Theriogenology* 48:99-117.
21. Chemineau P. (1992). Medio ambiente y reproducción animal. Disponible en: <http://www.fao.org/ag/Aga/AGAP/FRG/FEEDback/War/v1650b/v1650b04.htm>
Fecha de consulta 03-05-2017.
22. Cline MA, Ralston JN, Seals C, Lewis GS. (2001). Intervals from norgestomet withdrawal and injection of equine chorionic gonadotropine or P.G 600 to estrus and ovulation in ewes. *J Anim Sci* 79: 589-594.

23. Coy Fuster P. (1995). Reproducción en ovejas y cabras. En: Garcia Sacristan A, Castejón Montijano F, de la Cruz Palomino LF, González Gallego J, Murillo López de Silanes MD, Salido Ruiz G. Fisiología Veterinaria. Madrid. McGraw. p. 937-950.
24. Davis BJ, Lennard DE, Lee CA, Tiano HF, Morham SG, Wetsel WC, Langenbach R. (1999). Anovulation in cyclooxygenase-2 deficient mice is restored by prostaglandin E2 and interleukin-1b. *Endocrinology* 142: 3187-3197.
25. De Rossi R, Carneiro RPB, Ossuna MR, Zanenga NF, Alves OD, Jorge TP, Costa-e-Silva EV, Vasconcelos J. (2009). Sub-arachnoid ketamine administration combined with or without misoprostol/oxytocin to facilitate cervical dilation in ewes: A case study. *Small Rum Res* 83: 74-78.
26. DI.CO.SE. (2016). Dirección de Contralor de Semovientes. Declaración jurada (2016), Total Nacional. Disponible en: http://www.mgap.gub.uy/sites/default/se_presentaron_datos_preliminares_de_declaracion_jurada_anual_de_vacunos_y_ovinos.pdf. Fecha de consulta: 25-01-17.
27. Dos Santos-Neto PC, García-Pintos C, Pinczak A, Menchaca A. (2015) Fertility obtained with different progestogen intravaginal devices using Short-term protocol for fixed-time artificial insemination (FTAI) in sheep. *Livestock Sci* 182:125–128.
28. Driancourt MA, Fry RC. (1992). Effect of superovulation with pFSH or PMSG on growth and maturation of the ovulatory follicles in sheep. *Anim Reprod Sci* 27: 279-292.
29. Druart X, Cognié J, Baril G, Clement F, Dacheux JL, Gatti JL. (2009). In vivo imaging of in situ motility of fresh and liquid stored ram spermatozoa in the ewe genital tract. *Reproduction* 138 (1): 45-53.
30. Duggavathi R, Bartlewski PM, Barret DMW, Gratton C, Bagu ET, Rawlings NC. (2004). Patterns of antral follicular wave dynamics and accompanying endocrine changes in cyclic and seasonally anestrous ewes treated with exogenous ovine FSH (oFSH) during the inter-wave interval. *Biol Reprod* 70: 821-827.
31. Duggavathi R., Bartlewski PM, Pierson RA, Rawlings NC. (2003). Luteogenesis in Cyclic Ewes: Echotextural, Histological, and Functional Correlates. *Biol Reprod* 69: 634-639.
32. Durán del Campo A. (1980). Anatomía, Fisiología de la Reproducción e Inseminación Artificial en Ovinos. Montevideo. Ed. Hemisferio Sur. 264 p.

33. Dzuik PJ. (1965). Timing of maturation and fertilisation of the sheep egg. *Anat Rec.* 153: 211--224.
34. Espey LL (1999). Ovulation, *Encyclopedia of Reproduction*. San Diego, Academic Press. V 3, p. 605 – 614.
35. Espey LL, Richards JS. (2006). Ovulation. En: Neill, J.D. (Ed.), *Physiology of Reproduction*. St.Louis. Academic Press, V 1, p. 425-474.
36. Espey LL, Tanaka N, Adams RF, Okamura H. (1991). Ovarian hydroxyeicosatetraenoic acids compared with prostanoids and steroids during ovulation in rats. *Am J Physiol* 260: 163-169.
37. Evans G, Robinson TJ. (1980). The control of fertility in sheep: endocrine and ovarian responses to progestagen-PMSG treatment in the breeding season and in anoestrus. *J Agric Sci* 94: 69-88.
38. Falchi L, Taema M, La Clanche S, Scaramuzzi RJ. (2012). The pattern of cervical penetration and the effect of topical treatment with prostaglandin and/or FSH and oxytocin on the depth of cervical penetration in the ewe during the peri-ovulatory period. *Theriogenology* 78: 376-384.
39. Fernández Abella DH. (1987). *Temas de reproducción ovina*. Montevideo. División de Publicaciones y Ediciones de la Universidad de la República. 258 p.
40. Fields MJ, Fields PA. (1996). Morphological characteristic of the bovine corpus luteum during estrous cycle and pregnancy. *Theriogenology* 45:1295-1325.
41. Fierro S, Gil J, Viñoles C, Olivera-Muzante J. (2013). The use of prostaglandins in controlling estrous cycle of the ewe: a review. *Theriogenology* 79: 399-408.
42. Ginther OJ, Kot K. (1994). Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. *Theriogenology* 42:987-1001.
43. Ginther OJ, Kot K, Wiltbank MC. (1995). Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. *Theriogenology* 43:689-703.
44. Godfrey RW, Gray ML, Collins JR. (1998). The effect of ram exposure on uterine involution and luteal function during the postpartum period of hair sheep ewes in the tropics. *J Anim Sci.* 76: 3090-3094.
45. Gonzalez-Bulnes A, Veiga-Lopez A, Garcia P, Garcia-Garcia RM, Ariznavarreta C, Sanchez MA, Tresguerres JAF, Cocero MJ, Flores JM.

- (2005). Effects of progestagens and prostaglandin analogues on ovarian function and embryo viability in sheep. *Theriogenology*. 63: 2523-2534.
46. Gonzalez–Bulnes P, Pallares P, VazquezMI. (2010). Ultrasonographic imaging in small ruminant reproduction. *Reprod Dom Anim*. 45 (2): 9-20.
47. González-Stagnaro C. (1993). Control del ciclo estral en ovejas y cabras en el medio tropical. *Rev Cient. FCV-LUZ* 3: 211-229.
48. Gordon IR. (1971). Induction of early breeding in sheep by standard and modified progestagen-PMSG treatments. *J Agric Sci*. 76: 337-341.
49. Gordon IR. (1996). *Controlled Reproduction in Farm Animals Series*. Wallingford. CAB International (Ed.). V 2, 450 p.
50. Griffing PG, Ginther OJ. (1992). Reserch application of ultrasonic imaging in reproductive biology. *J Anim Sci*. 70:953-972.
51. Hafez ESE, Hafez B. (2002). *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. 7ª ed. South Carolina. McGraw-Hill Interamericana. 519 p.
52. Halbert GW, Dobson H, Walton JS, Buckrell BC. (1990). The structure of the cervical canal of the ewe. *Theriogenology* 33: 977-992.
53. Hamra AH, Massri YG, Marcek JM, Wheaton JE. (1986). Plasma progesterone levels in ewes treated with progesterone-controlled drug release dispenser, implants and sponges. *Anim Reprod Sci*. 11:187-194.
54. Hanzen CH, Pieterse M, Scenczi O, Drost M. (2000). Relative accuracy of the identification of ovarian structures in the cow by ultrasonography and palpation per rectum. *Vet J*. 159: 161-170.
55. Hizaki H, Segi E, Sugimoto Y, Hirose M, Saji T, Ushikubi F, Matsuoka T, Noda Y, Tanaka T, Yoshida N, Narumiya S, Ichikawa A. (1999). Abortive expansion of the cumulus and impaired fertility in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP(2). *Proc Nat Acad Sci USA* 96: 0501-10506.
56. Howard HJ, Morbeck DE, Britt JH. (1990). Extension of oestrous cycle and prolonged secretion of progesterone in non-pregnant cattle infused continuously with oxytocin. *J Reprod Fertil*, 90: 493–502.
57. Husein MQ, Kridli RT. (2003). Effect of progesterone prior to GnRH-PGF2 α treatment on induction of oestrus and pregnancy in anoestrous awassi ewes. *Reprod Dom Anim*. 38:228-232.
58. I.N.I.A. (2011). Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Programa Nacional de Investigación Producción de Carne y Lana. Disponible en: <http://www.inia.org.uy/online/site/31583811.php> Fecha de consulta: 25-01-17.

59. Kastelic JP, Ginther OJ. (1989). Fate of conceptus and corpus luteum after induced embryonic loss in heifers. *J Am Vet Med Assoc.* 194: 922-928.
60. Kershaw CM, Khalid M, McGowan MR, Ingram K, Leethongdee S, Wax G, Scaramuzzi RJ.(2005). The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. *Theriogenology* 64: 1225-1235.
61. King PR, Coetzer WA. (1996). Effect of oxytocin treatment during oestrus on the ovulation rate of Merino ewes. *J South African Vet Assoc* 67: 41 – 43.
62. King PR, Coetzer WA. (1997). The effect of treatment with a slow-releasing oxytocin preparation at the onset of oestrus on the ovulation rate of Merino ewes. *J South African Vet Assoc.* 68 (1): 16 – 17.
63. King ME, McKelvey WA, Dingwall WS, Matthews KP, Gebbie FE, Mylne MJ, Stewart E, Robinson JJ. (2004). Lambing rates and litter sizes following intrauterine or cervical insemination of frozen/thawed semen with or without oxytocin administration. *Theriogenology* 62:1236-1244.
64. Kotwica J, Skarzynski D. (1993). Influence of oxytocin removal from the corpus luteum on secretory function and duration of oestrous cycle in cattle. *J Reprod Fertil*, 97: 411–417.
65. Leethongdee S, Kershaw-Young CM, Scaramuzzi RJ, Khalid M. (2010). Intra-cervical application of Misoprostol at estrus alters the content of cervical hyaluronan and the mRNA expression of follicle stimulating hormone receptor (FSHR), luteinizing hormone receptor (LHR) and cyclooxygenase-2 in the ewe. *Theriogenology* 73: 1257-1266.
66. Leethongdee S, Khalid M, Bhatti A, Ponglowhapan S, Kershaw CM, Scaramuzzi RJ. (2007). The effects of the prostaglandin E analogue Misoprostol and follicle-stimulating hormone on cervical penetrability in ewes during the peri-ovulatory period. *Theriogenology* 67: 767-777.
67. LeMaire WJ, Leidner R, Marsh JM. (1975). Pre and post ovulatory changes in the concentration of prostaglandins in rat graafian follicles. *Prostaglandins* 9: 221–229.
68. LeMaire WJ, Yang NS, Behrman HH, Marsh JM. (1973). Preovulatory changes in the concentration of prostaglandins in rabbit graafian follicles. *Prostaglandins* 3: 367–376.
69. Li Q, Jimenez-Krassel F, Kobayashi Y, Ireland JJ, Smith GW. (2006). Effect of intrafollicular indomethacin injection on gonadotropin surge-induced expression of select extracellular matrix degrading enzymes and their inhibitors in bovine preovulatory follicles. *Reproduction* 131: 53–543.

70. Liu X, Dai Q, Hart EJ, Barrett D, Rawlings N, Pierson R, Bartlewski P. (2007). Ultrasonographic characteristics of ovulatory follicles and associated endocrine changes in cyclic ewes treated with Medroxyprogesterone Acetate (MAP) – releasing intravaginal sponges and Equine Chorionic Gonadotropin (eCG). *Reprod Dom Anim* 42:393-401.
71. Liu X , Dai Q, Hart EJ, Duggavathi R, Barret DMW, Rawlings NC. (2006). Ovarian and endocrine responses to prostaglandin F₂ α (PgF₂ α) given at the expected time of endogenous FSH peak at mid-luteal phase in ewes. *Theriogenology* 66:811-21.
72. M.G.A.P. (2015). Anuario Estadístico Agropecuario; 2015. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/unidad-ejecutora/oficina-de-programacion-y-politicas-agropecuarias/publicaciones/anuariosdiea/anuario2015>. Fecha de consulta: 23-11-16.
73. Maffili VV, Torres CAA, Fonseca JF, Moraes EA, Pontes RAM. (2005). Sincronização de estro em cabras da raça saanem com esponja intravaginal e CIDR-G. *Arq Bras Med Vet Zoot.* 57: 591-598.
74. Milvae RA. (2000). Inter-relationships between endothelin and prostaglandin F₂ α in corpus luteum function. *Rev Reprod.* 5:1-5.
75. Monina MI, Heritier JM, DellaCroce MR, Galetti EJ, Ierace AJM, Juan FM, Olivares MD, Pechin G, Rosseto L, Vera OA, Verna M, VéspoliPucheu MV. (2000). Evaluación ultrasonográfica de las gonadas del toro. *Ciencia veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de la Pampa.* P 91-102. Disponible en: <http://www.biblioteca.unlpam.edu.ar/pubpdf/revet/n02a13monina.pdf> . Fecha de consulta: 20/10/2016.
76. Moore LG, Choy VJ, Elliot RL, Watkins WB. (1986). Evidence for the pulsatile release of PGF-2 alpha inducing the release of ovarian oxytocin during luteolysis in the ewe. *J Reprod Fertil*, 76: 159–166.
77. Moré J. (1984). Anatomy and histology of the cervix uterin of the ewe: new insights. *Acta Anat (Basel)* 120:156-159.
78. Murdoch WJ, Hansen TR, McPherson LA. (1993). A review--role of eicosanoids in vertebrate ovulation. *Prostaglandins* 46:85-115.
79. Niswender GD, Juengel JL, Mcguire WJ, Belfiore CJ, Wiltbank MC. (1994). Luteal function: the estrous cycle and early pregnancy. *Biol Reprod.* 50:239-247.
80. Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK, McIntush EW. (2000). Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev.* 80:1-29.

81. Noel B, Bister JL, Pierquin B. (1994). Effects of FGA and PMSG on follicular growth and LH secretion in Suffolk ewes. *Theriogenology* 41:719-727.
82. Ok Kim S, Duffy D. (2016). Mapping PTGERS to the Ovulatory Follicle: Regional Responses to the Ovulatory PGE2 Signal. *Biol Reprod.* 95 (2): 33, 1-11.
83. Olivera-Muzante J, Fierro S, López V, Gil J. (2011). Comparison of prostaglandin - and progesterone-based protocols for timed artificial insemination in sheep. *Theriogenology* 75:1232-1238.
84. Pierson RA, Adams GP. (1995). Computer-assisted image analysis, diagnostic ultrasonography and ovulation induction: strange bed fellows. *Theriogenology* 43:105-112.
85. Pierson RA, Ginther OJ. (1985). Ultrasonic evaluation of the corpus luteum of the mare. *Theriogenology* 23: 795-806.
86. Pierson RA, Ginther OJ. (1987). Reliability of diagnostic ultrasonography for identification and measurement of follicles and detecting the corpus luteum in heifers. *Theriogenology* 28: 929-936.
87. Pieterse MC, Taverne MAM, Kruip AM, Willemse AH. (1990). Detection of corpora lutea and follicles in cows: a comparison of transvaginal ultrasonography and rectal palpation. *Vet Rec.* 126: 552-554.
88. Rasch K, Schoon HA, Sieme H, Klug A. (1996). Histomorphological endometrial status and influence of oxytocin on the uterine drainage and pregnancy rate in mares. *Equine Vet J.* 28: 445-460.
89. Ravindra JP, Rawlings NC, Evans ACO, Adams GP. (1994). Ultrasonographic study of ovarian follicular dynamics in ewes during the oestrus cycle. *J Reprod Fertil.* 101:501-509.
90. Reeves JJ, Arimura A, Schally AV. (1971). Changes in pituitary responsiveness to luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) in anestrus ewes pretreated with estradiol benzoate. *Biol Reprod* 4:88-92.
91. Robinson G, Evans JJ. (1990). Oxytocin has a role in gonadotrophin regulation in rats. *J Endocrinol.* 125: 425-432.
92. Rodríguez Piñón M. (2015). Estudios endócrinos y moleculares en el Cérnix ovino durante el Ciclo Estral y el Anestro Estacional. Tesis de Doctorado en Producción Animal, Programa de Posgrados de la Facultad de Veterinaria, UdelaR, Montevideo – Uruguay. 66 p.

93. Rubianes E, Castro T, Rubianes RE. (1999). Inducción y sincronización de celo en ovejas y cabras. En Resúmenes. III Simposio Internacional de Reproducción Animal, Villa Carlos Paz. p 109-131.
94. Rubianes E, Castro T, Kmaid S. (1998). Estrus response after a short progesterone priming in seasonally anestrus goats. *Theriogenology*. 49: 356-362.
95. Russel A, Doney J, Gunn R. (1969). Subjective assessment of body fat in the live sheep. *J Agr Sci*. 72: 451-454.
96. Safdarian M, Kafi M, Hashemi M. (2006). Reproductive performance of Karakul ewes following different oestrous synchronization treatment outside the natural breeding season. *South African J Anim Sci*. 36: 229-234.
97. Salamon S, Maxwell W. (2000). Storage of ram semen. *Anim Rep Sci* 62: 77-111.
98. Saller S, Kunz L, Dissen G, Stouffer R, Ojeda S, Berg D, Berg U, Mayerhofer A. (2010). Oxytocin receptors in the primate ovary: molecular identity and link to apoptosis in human granulosa cells. *Hum Reprod*. 25 (4): 969-976.
99. Schams D, Berisha B. (2002). Steroids as local regulators of ovarian activity in domestic animals. *Dom Anim Endocrinol*. 23: 53-65.
100. Schams D, Berisha B. (2004). Regulation of corpus luteum function in cattle - an overview. *Reprod Dom Anim*. 39:241-251.
101. Schrick FN, Surface RA, Prichard JY, Dailey RA, Townsend EC, Inskeep EK. (1993). Ovarian structures during the estrous cycle and early pregnancy in ewes. *Biol Reprod* 49:1133-40.
102. Senger PL. (2005). Pathways to pregnancy and parturition. 2a ed. Washington. Current conceptions 373 p.
103. Silva MBD, Sartori R, Silva TASN, Cardoso DMM, Oliveira MAL, Neves JP. (2010). Estrus synchronization with protagalndin F2a compared to progestogen treatment associated with equine chorionic gonadotropin (eCG) in santa inês breed ewes reared in federal district, Brazil. *Ci Anim Bras* 11: 417-424.
104. Singh J, Adams GP. (2000). Histomorphometry of dominant and subordinate bovine ovarian follicles. *Anat Rec*. 258: 58-70.
105. Singh J, Adams GP, Pierson RA. (2003). Promise of new imaging technologies for assessing ovarian function. *Anim Reprod Sci*. 78 (3): 371-399.

106. Singh J, Pierson R, Adams G. (1997). Ultrasound image attributes of the bovine corpus luteum: structural and functional correlates. *J Reprod Fertil.* 109: 35-44.
107. Singh J, Pierson RA, Adams GP. (1998) Ultrasound image attributes of bovine ovarian follicles and endocrine and functional correlates. *J Reprod Fertil* 112:12-29.
108. Siqueira L, Torres C, Amorim L, Souza E, Camargo L, Fernandes C, Viana J. (2009). Interrelationships among morphology, echotexture, and function of the bovine corpus luteum during the estrous cycle. *Anim Reprod Sci* 115:18 – 28.
109. Stellflug JN, Wulster-Radcliffe MC, Hensley EL, Cowardin EA, Seals RC, Lewis GS. (2001). Oxytocin-induced cervical dilation and cervical manipulation in sheep: effects on laparoscopic artificial insemination. *J Anim Sci.* 79: 568-573.
110. Stevenson JS. (2007). Clinical reproductive physiology. En: Youngquist RS, Threlfall WR (ed). *Large Animal Theriogenology 2.* St. Louis, Missouri: Saunders, p 258-270.
111. Townson DH, Ginther OJ. (1989). Ultrasonic echogenicity of developing corpora lutea in pony mares. *Anim Reprod Sci.* 20: 143-153.
112. Ungerfeld R. (2002). *Reproducción en Animales Domésticos.* Montevideo, Ed. Melibea, V 1, 291 p.
113. Ungerfeld R, Fila D. (2011). Testicular fluid content evaluated by ultrasound image Computer – Assisted analysis increases whit small – dose multiple GnRH injections in rams. *Reprod Dom Anim.* 46: 720 – 723.
114. Uribe-Velásquez LF, Osorio JH, Correa-Orozco A. (2011). El cuerpo lúteo: una visión inmunológica. *Biosalud*, 10 (2): 87 – 100.
115. Vilariño M, Rubianes E, Menchaca A (2013). Ovarian responses and pregnancy rate with previously used intravaginal progesterone releasing devices for fixed-time artificial insemination in sheep. *Theriogenology* 79: 206-210.
116. Vilariño M, Rubianes E, Van Lier E, Menchaca A (2010). Serum progesterone concentrations, follicular development and time of ovulation using a new progesterone releasing device (DICO ®) in sheep. *Small Rum Res.* 91 (2): 219-224.
117. Viñoles C. (2003). Effect of nutrition on follicle development and ovulation rate in the ewe. Tesis of Doctor of Philosophy. Swedish University of Agricultural Sciences. 56 p.

118. Viñoles C, Forsberg M, Banchero G, Rubianes E (2001). Effect of long-term and short term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. *Theriogenology* 55: 993 – 1004.
119. Windsor DP, Széll AZ, Buschbeck C, Edward AY, Milton JTB, Buckrell BC. (1994). Transcervical artificial insemination of Australian Merino ewes with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 42: 147-157.