

**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
DESARROLLO DEL FOLÍCULO OVULATORIO, EL MOMENTO DE LA
OVULACIÓN Y EL CUERPO LÚTEO INCIPIENTE**

por

**María Valentina MOULIA DE LEÓN
Pilar ORTICOCHEA ZORRILLA DE SAN MARTÍN**

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. Jorge Gil

Segundo miembro (Tutor):

Dr. Danilo Fila

Tercer miembro:

Dra. Karina Neimaur

Cuarto miembro (Co-Tutor):

Dr. Marcelo Rodriguez

Fecha:

Autores:

María Valentina Moulia de León

Pilar Orticochea Zorrilla de San Martín

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar queremos agradecer a nuestras familias por el apoyo incondicional a lo largo de la carrera. A nuestros amigos y a la generación 2015 de la E.E.M.A.C por marcar un año importante en nuestras vidas.

En la parte académica, agradecer a los profesores y profesionales que fueron parte de este proceso de aprendizaje, a la Facultad de Veterinaria que nos dio la oportunidad de formarnos como profesionales. A nuestros tutores Danilo y Marcelo por la paciencia y dedicación que nos brindaron y a toda la gente que hizo posible la realización del proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

	Páginas
Página de aprobación.....	2
Agradecimientos.....	3
Lista de tablas y figuras.....	6
Resumen.....	7
Summary.....	9
Introducción.....	11
Revisión bibliográfica:.....	13
1. Anatomía del aparato reproductor de la hembra ovina.....	13
• Morfología del cérvix ovino.....	13
• Cérvix como barrera para inseminación.....	13
2. Fisiología reproductiva de la hembra ovina.....	14
• Regulación hormonal.....	14
• Fases del ciclo estral.....	15
• Fase folicular y ovulación.....	15
• Fase luteal temprana.....	18
3. Inducción de la dilatación cervical en ovinos.....	18
4. Efectos de la inducción hormonal a la dilatación cervical sobre el desarrollo folicular, la ovulación y el cuerpo lúteo.....	21
5. Sincronización de la ovulación.....	22
6. Inseminación artificial a tiempo fijo en ovinos.....	24
7. Ultrasonografía.....	24
8. Intensidad de píxeles.....	26

Hipótesis.....	27
Objetivos.....	27
• Objetivo General.....	27
• Objetivos específicos.....	27
Materiales y métodos.....	28
• Ubicación del departamento de Canelones.....	28
• Ubicación del Campo experimental 1 de Facultad de Veterinaria.....	28
• Trabajo de campo.....	29
• Análisis estadístico.....	31
Resultados.....	32
• Momento de la ovulación.....	32
• Desarrollo folicular.....	33
• Intensidad de pixeles.....	34
• Diámetro de cuerpos lúteos.....	35
Discusión.....	36
• Momento de la ovulación.....	36
• Desarrollo folicular.....	37
• Intensidad de pixeles.....	37
• Diámetro de cuerpos lúteos.....	38
Conclusiones.....	39
Recomendaciones.....	40
Referencias bibliográficas.....	42

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Páginas

Figura 1. - Número de ovejas que ovularon antes o después de los tratamientos de inducción de la dilatación cervical realizado a las 42 horas post-eCG.....32

Tabla 1. - Diámetro del folículo pre-ovulatorio (mm) según la hora post-eCG.....33

Figura 2. - Correlación entre la densidad de píxeles del líquido folicular y el diámetro del folículo preovulatorio.....34

Figura 3. - Diámetro (mm) de los cuerpos lúteos incipientes desarrollados antes o después de los tratamientos para inducir la dilatación cervical.....35

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue estudiar si el efecto de la administración de un análogo de la Oxitocina (Ox), la Carbetocina (Cb) y/o Prostaglandina E2 (PGE2), Dinoprostone (Dp) para inducir la dilatación cervical en ovejas en torno al estro, afecta el momento en que se produce la ovulación, el desarrollo del folículo ovulatorio, y el cuerpo lúteo incipiente. Se utilizaron cuarenta ovejas Corriedale multíparas provenientes de la misma majada, con un peso y un estado corporal homogéneos, durante la estación reproductiva. Fueron sincronizadas con esponjas intravaginales impregnadas con 60 mg de Medroxiprogesterona (MAP) por 13 días y la administración de 300 UI de Gonadotropina Coriónica Equina (eCG) intramuscular al momento de retirar la esponja. A las 42 horas post eCG, doce horas antes del momento que se realizaría la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF, 54 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 Control, n=10 en cada uno) y tratadas correspondientemente. El Grupo Cb fue tratado con 40 µg (0.8 mL) intramuscular de Cb (*Decomotón, Laboratorios Callier*) 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®, Laboratorio Ferring*) y una inyección intramuscular de 0,8 mL de suero fisiológico. El grupo Cb+Dp con ambas hormonas y al grupo Control se le administró una inyección intramuscular de 0,8 mL de suero fisiológico y un dispositivo intravaginal (*Propess®*) sin principio activo. En todos los animales se midió el diámetro del folículo pre-ovulatorio a las 12, 20, 28, 36, 42, 48, 54, 60 horas post-eCG o hasta el momento de la ovulación. El diámetro folicular se determinó mediante ultrasonografía con un ecógrafo portátil con un transductor transrectal lineal de 10 MHz. Se realizó la captura de imágenes y video para ser procesado, midiendo y registrando el diámetro del folículo mayor hasta su desaparición (ovulación) con el software del propio equipo. Además, se midió la intensidad en pixeles del folículo preovulatorio y el diámetro del cuerpo lúteo visto por primera vez después de la ovulación. Se calculó el intervalo eCG-ovulación (horas) en todos los animales. El diámetro folicular se analizó por el Procedimiento Mixto para ANOVA para muestras repetidas, incorporando como efectos fijos el grupo de tratamiento (Cb, Dp, Cb+Dp y Control), las horas post-eCG y las interacciones entre ambos efectos. El intervalo eCG-ovulación se analizó utilizando el mismo modelo,

pero para muestras simples incorporando solo el efecto fijo del grupo experimental. El tamaño de los cuerpos lúteos se analizó por Chi cuadrado. Para correlacionar los datos de diámetro folicular e intensidad en pixeles del folículo preovulatorio se utilizó el test de correlación de Pearson. Los datos están presentados como las medias \pm e.s.m., con diferencias consideradas significativas para $P < 0,05$. La constatación de que 34 de los 40 animales (85%) ovularon antes de las 42 horas post-eCG fue sorprendente, dado que el diseño experimental preveía que las ovulaciones se concentraran pocas horas después de las 54 horas post-eCG, momento previsto para la realización de una IATF luego de la sincronización con MAP y eCG. Esto podría estar relacionado con la actividad biológica de los progestágenos y/o la duración del tratamiento utilizado. Debido a esto, no se pudo evaluar el efecto de cada tratamiento sobre el diámetro folicular. El restante 15% de ovejas ovularon después de las 42 horas y pertenecían a los grupos Cb y Cb+Dp, lo que sugiere que la Cb podría estar involucrada en el retraso de la ovulación de los folículos ovulatorios. El tamaño del folículo preovulatorio aumentó a las 28 horas y fue máximo a las 36 horas, disminuyendo a las 42 horas post-eCG, en acuerdo con el desarrollo de la onda folicular ovulatoria y el momento de la ovulación. Se encontró una correlación positiva entre el diámetro del folículo preovulatorio y la intensidad en pixeles del líquido folicular ($P < 0,04$), lo que podría reflejar el desarrollo funcional de los mismos. El tamaño del cuerpo lúteo recién formado no fue diferente antes o después del tratamiento ($P = 0,3119$), ni hubo diferencias significativas entre grupos en aquellos animales cuyo CL se visualizó luego de los tratamientos ($P = 0,7448$), probablemente debido a que se midieron en un estadio evolutivo muy temprano. Se encontraron indicios de que la Cb podría atrasar el momento de la ovulación, pero no se encontraron evidencias de efectos de los tratamientos sobre el desarrollo folicular ni sobre el diámetro del cuerpo lúteo incipiente.

SUMMARY

The objective of this work was to study whether the effect of administering an oxytocin analogue (Carbetocin, Cb) and / or Prostaglandin E2 (PEG2) (Dinoprostone, Dp), to induce cervical dilatation in sheep during estrus, affects the time of ovulation, the development of the ovulatory follicle, and the incipient corpus luteum. Forty multiparous Corriedale ewes from the same flock with a homogeneous weight and body condition were used during the breeding season. Ewes were synchronized with intravaginal sponges impregnated with 60 mg of Medroxyprogesterone (MAP) for 13 days followed by 300 IU intramuscular of Equine Chorionic Gonadotrophin (eCG) at the sponge withdrawal. 42 hours post eCG, twelve hours before the expected moment of fixed time artificial insemination (FTAI, 54 h post-eCG), sheep were randomly assigned to four treatment groups to induce cervical dilatation according to a 2 x 2 factorial arrangement (Cb, Dp, Cb + Dp and Control, n = 10 in each group) and treated accordingly. Group Cb was treated with 40 µg (0.8 mL) intramuscularly of Cb (Decomoton) and an empty intravaginal device (Propess®) with no active principle. The Dp group was treated with 10 mg of Dp by insertion of a slow-release intravaginal device (Propess®) and an intramuscular injection of 0.8 mL of saline solution. The Cb + Dp group received both hormones and the Control group was given an intramuscular injection of 0.8 mL of saline and an empty intravaginal device (Propess®) with no active principle. In all animals the diameter of the pre-ovulatory follicle was measured at 12, 20, 28, 36, 42, 48, 54, 60 hours post-eCG or until the time of ovulation. The follicular diameter was determined using a US Portable Ultrasound Scanner (Esaote My Lab One, Genova, Italy) using a 10 MHz linear transrectal transducer. Image and video capture was performed and the diameter of the major follicle until its disappearance (ovulation) was measured and recorded. In addition, the pixel intensity of the preovulatory follicle content and the diameter of the first time viewed corpus luteum after ovulation were measured. The eCG-ovulation interval (hours) was calculated in all animals. The follicular diameter was analyzed by the Mixed Procedure for ANOVA for repeated samples (Statistical Analysis Systems SAS Institute, Cary, NC, USA, 2000), incorporating the treatment group (Cb, Dp, Cb + Dp and Control), post-eCG hours and the interactions between them as fixed effects. The eCG-ovulation interval was analyzed using the same model, but for simple samples and incorporating only the fixed effect of the experimental group. The corpus luteum diameter was analyzed

by Chi square. The relationship between preovulatory follicle diameter and pixels intensity was established using the Pearson correlation test. Data are presented as mean \pm s.e.m, with differences considered significant for $P < 0.05$. Finding that 34 of the 40 animals (85%) ovulated before 42 hours post-eCG was surprising, since the experimental design predicted that ovulation would be concentrated a few hours after 54 hours post-eGG, the expected time of FTAI using MAP and eCG protocol of synchronization. This could be related to the biological activity of progestogens and / or the duration of the treatment used. Due to this, it was not possible to evaluate the effect of each treatment on the follicular diameter. The remaining 15% of sheep that ovulated after 42 hours post-eCG were treated with Cb or Cb + Dp, which suggests that Cb might be involved in delaying ovulation of ovulatory follicles. The preovulatory follicle size increased at 28 hours and was maximal at 36 hours, decreasing at 42 hours post-eCG, in agreement with the development of an ovulatory follicular wave and the time of ovulation. A positive correlation between the preovulatory follicle diameter and the pixel density of its content was found ($P < 0.04$), which could reflect their functional development. The corpus luteum diameter was not different before or after treatment ($P = 0.3119$), nor between groups in those animals whose CL was visualized after treatments ($P = 0.7448$), probably due to the very early stage of their development. There were evidences that Cb might delay the time of ovulation, but not the effects of treatments on follicular development or on the diameter of incipient corpus luteum.

INTRODUCCIÓN

En Uruguay la producción ovina representa un pilar importante en la actividad agropecuaria. En el año 2015 el rubro aportó US\$324 millones al PBI, lo que corresponde al 9% del producto bruto interno agropecuario del país (MGAP, 2015), en los cuales el 70 % corresponde a lana y sus productos (SUL, 2016).

Sin embargo, el stock de ovinos de Uruguay, al 30 de junio de 2016, fue de 6.6 millones, esto significa una caída del 1% con respecto al 30 de junio de 2015, luego de una caída del stock ovino en aproximadamente 16 millones de animales desde los años 90 (es equivalente a un 26% menos). Actualmente hay unos 20.500 tenedores de lanares en el país (DICOSE, 2016).

Desde hace algunos años la ganadería, principalmente la ovina, se enfrenta a presiones competitivas por los recursos naturales por parte de otros rubros de mayor conveniencia económica, por lo tanto se hace necesario un incremento de la productividad y calidad mediante la mejora de la eficiencia en el uso de los factores de producción. Se señala la eficiencia reproductiva de la majada nacional como la mayor restricción que enfrenta el rubro para su crecimiento sustentable (INIA, 2001). Los indicadores de producción para la cría, relevados en los últimos 20 años, determinan un porcentaje de señalada que ha oscilado entre el 50 y 70% con una caída del 2% en el año 2015 respecto al 2014 (DICOSE, 2015). En este contexto, la utilización de inseminación artificial (IA) es fundamental para el mantenimiento de la eficiencia económica del rubro (INIA, 2011). Sin embargo, la aplicación de la IA con semen congelado en ovinos es limitada, en gran 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., 1990a; Campbell y col., 1996; Kershaw y col., 2005). Como consecuencia, en la gran mayoría de las ovejas solo 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).

En la presente tesis se realizó un protocolo hormonal para inducir la dilatación cervical, basado en el conocimiento de la fisiología del órgano. Las hormonas utilizadas fueron Carbetocina (Cb), análogo sintético de la Oxitocina (Ox) y Dinoprostone (Dp), un dispositivo intravaginal de liberación controlada de Prostaglandina E2 (PGE2).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Anatomía del aparato reproductor de la hembra ovina

El aparato reproductor de la hembra ovina consta de ovarios, oviductos, útero, cérvix, vagina y vulva. Ya que las dificultades que existen en la IA son causadas por el cérvix ovino se hace énfasis en la anatomía del mismo.

Morfología del cérvix ovino

El cérvix de la oveja es un órgano tubular y fibroso, de 5 a 10 cm de largo dependiendo de la raza, compuesto principalmente de tejido conectivo con predominio de colágeno y músculo liso (Moré, 1984). Su morfología interna se caracteriza por sus seis pliegues internos desalineados con respecto al primer pliegue. Estos parecen conos truncados que están directamente dirigidos hacia la vagina (Rodríguez Gavancho y col., 2015). Hacia la luz, los pliegues de la mucosa forman 5 a 7 anillos excéntricos en forma de embudo con el vértice hacia caudal, que ocluyen la luz del canal cervical (Halbert y col., 1990b; Kershaw y col., 2005; Naqvi y col., 2005; Kaabi y col., 2006).

Existe una gran variabilidad en la morfología cervical entre razas, categorías e individuos, tanto en las dimensiones del órgano, en el número y alineación de los anillos, como en la disposición de pliegues de la mucosa vaginal que obstruyen el orificio cervical externo (Halbert y col., 1990; Naqvi y col., 2005; Kershaw y col., 2005).

Cérvix como barrera para inseminación

La conformación anatómica particular del cérvix ovino constituye una barrera para la canulación transcervical, convirtiéndose en un factor limitante para el desarrollo de biotecnologías reproductivas como la IA (Halbert y col., 1990; Campbell y col., 1996). En el caso de ovinos y caprinos, el semen se deposita a la entrada del canal cervical, y en el mejor de los casos a 1 cm de profundidad. La tasa de parición obtenida después de la IA con semen congelado es baja debido a la incapacidad de los espermatozoides para atravesar la naturaleza tortuosa del canal cervical (Eppleston y Maxwell, 1993). La compleja anatomía del cuello uterino no facilita el paso para un catéter de

inseminación (Naqvi y col., 2005; Rodríguez Gavancho y col., 2015). Además, en la gran mayoría de las ovejas solo es posible la IA en el orificio cervical caudal, resultando en bajos índices de concepción cuando se utiliza semen congelado (Salamon y Maxwell, 2000).

El acceso transcervical al útero se presenta como la alternativa más eficiente y menos costosa, por lo que conseguir la dilatación cervical ha sido objeto de estudio en los últimos años (Robinson y col., 2011; Candappa y Bartlewsky, 2012; Candappa y Bartlewsky, 2014).

Fisiología reproductiva de la hembra ovina

Regulación hormonal

El ciclo estral de la oveja tiene una duración promedio de 17 días. En regiones templadas, las ovejas son poliéstricas estacionales (los ciclos se repiten sucesivamente durante un período del año), de modo que sus crías nacen durante la época más favorable del año, la primavera. Esta estacionalidad es regida por el fotoperíodo; la actividad estral comienza durante la época en que los días se hacen más cortos (Senger, 2003; Goodman, 2006). En nuestro país, las ovejas de raza Corriedale comienzan a ciclar en febrero y si no quedan preñadas continúan haciéndolo hasta junio-julio (Ungerfeld y Rubianes, 2001).

La glándula pineal (epiphysis cerebri) tiene la capacidad de convertir información neural, que proviene de la vista, sobre la duración de la luz del día, en producción de melatonina. La señal de la glándula pineal es endócrina, siendo la hormona melatonina la que juega un rol crítico en la regulación de la actividad hipotálamo-hipofisario-gonadal (Arendt, 1986; Binkley, 1988). La oscuridad promueve la secreción de melatonina mientras que la luz la inhibe, observándose concentraciones altas durante la noche y bajas durante el día. Esta hormona es fundamental para dar inicio al ciclo estacional de la oveja (Ungerfeld, 2011).

El sistema neuro – endócrino - gonadal resulta de la coordinación de cuatro órganos (cerebro, hipófisis, ovarios y útero) que se comunican a través de hormonas. Las

principales hormonas involucradas en el control del ciclo estral son la Hormona liberadora de Gonadotrofinas (GnRH) secretada por el hipotálamo; Hormona Luteinizante (LH) y Hormona Foliculo estimulante (FSH) secretadas por la hipófisis; Estradiol (E2), Inhibina y Progesterona (P4) de origen ovárico; y la Prostaglandina F2 alfa (PGF2alfa) secretada por el útero (Ungerfeld, 2011).

Fases del ciclo estral

El ciclo estral está dividido en fases (Senger, 2003; Goodman, 2006). El proestro, período que precede al estro conductual, se caracteriza por una caída en las concentraciones de P4 como consecuencia de la regresión luteal y la emergencia y crecimiento del folículo ovulatorio que conlleva a un aumento en la concentración de E2 (Senger, 2003; Duggavathi, 2004; Davies, 2005). En el estro, que corresponde al período que prosigue al proestro (Senger, 2003; Davies, 2005), el E2 es la hormona dominante y es la principal responsable de los cambios comportamentales que conllevan a la receptividad sexual y al apareamiento (Davies, 2005). La ovulación en la oveja es un proceso espontáneo que no requiere coito, ocurre entre 24 a 30 horas después del inicio del estro conductual (Senger, 2003; Peter y col., 2009). El metaestro es el período durante el cual los restos del folículo ovulado se transforman en cuerpo lúteo (Duggavathi, 2004). El período del ciclo estral, donde hay una funcionalidad completa del cuerpo lúteo (CL) y una alta secreción de P4, se conoce como diestro.

Otra clasificación del ciclo estral sería dividirlo en una “fase luteal”, que va desde el día 2-3 (celo día cero) hasta alrededor del día 13 del ciclo; lo que coincide con metaestro y diestro; y una “fase folicular”, que va desde la luteólisis (regresión del cuerpo lúteo) produciéndose el día 13-14, hasta el día 2 del ciclo, que comprende proestro y estro (Ungerfeld, 2011).

Fase folicular y ovulación

El desarrollo folicular se presenta en un patrón de ondas durante el ciclo estral. Una onda folicular es caracterizada por el crecimiento sincrónico de un grupo de folículos, uno de ellos continúa creciendo denominándose folículo dominante, mientras los otros regresan por inhibición de su desarrollo denominándose folículos subordinados.

Estudios determinan que el número de ondas oscila entre 2 a 4 ondas hasta 6 (Uribe-Velásquez y col., 2009).

La foliculogénesis es controlada por las relaciones entre los esteroides intrafolículos, factores de crecimiento, y el sistema de feedback del eje hipotálamo–hipófisis–ovario (Campbell y col, 1995). La primera etapa de crecimiento se presenta desde la fase del folículo primordial hasta la fase de folículo preantral, presentando proliferación celular en la granulosa y aparición de receptores para FSH y LH, en la granulosa y en la teca, respectivamente. La segunda etapa es caracterizada por la intensa proliferación y diferenciación celular y por la adquisición de la capacidad esteroideogénica, dando lugar a folículos que dependen absolutamente del aporte gonadotrófico, esta fase se denomina reclutamiento folicular y permite el paso a la fase de selección folicular, donde emergerá un folículo dominante con un diámetro entre 5 a 6 mm destinado a ovular (Picazo y López, 1995).

La secreción de FSH durante el ciclo estral no está claramente determinada, como lo está el mecanismo que explica la liberación de LH. El incremento en los niveles preovulatorios de FSH parece estar gobernado por los mismos mecanismos que determinan el pico de LH, es decir un estímulo de la secreción de la GnRH provocado por un retrocontrol positivo con los E2 ováricos; de todas formas el incremento en los niveles de FSH es anterior al de la LH (Ungerfeld, 2011).

El folículo más grande, que se describe como el folículo dominante, es el responsable de las mayores concentraciones circulantes de E2 durante la fase folicular del ciclo estral (Senger, 2003; Rajkovic y col., 2006; Kinder, 1996). Este incremento en la secreción de E2, es el resultado de una mayor liberación de LH y FSH (Hunzicker-Dunn y col., 2006) y un reflejo de la madurez del folículo preovulatorio, que está asociada a un incremento en el contenido de receptores para LH en las células de la teca y granulosa. Elevados niveles de E2, junto con bajos niveles de P4, inducen profundos cambios comportamentales en la hembra, es sexualmente receptiva y la cópula ocurre (duración celo aproximadamente 22 horas) (Senger, 2003; Pedram y col., 2002).

Durante esta fase folicular, en ausencia de niveles altos de P4, se produce una retroalimentación positiva entre la GnRH y la LH por un lado y los E2 por otro: ante

cada pulso de GnRH la hipófisis responde con un pulso LH y el folículo responde a la LH secretando E2. A su vez el E2 incrementa la sensibilidad de la hipófisis a la GnRH (Reeves y col., 1971) de forma que finalmente se produce una descarga masiva de LH, el pico de LH (este ocurre entre 5 y 12 horas después del inicio del estro). El proceso ovulatorio se desencadena a partir del mismo, determinándose el estallido del folículo preovulatorio y la liberación del ovocito. La ovulación es el proceso biológico por el cual un ovocito maduro y las células somáticas que lo rodean (el complejo cumulus-ovocito), son liberados de la superficie ovárica (debido a la ruptura de la pared folicular) hacia el oviducto para su posterior transporte y fertilización (Senger, 2003; Richards y col., 2008). La ovulación se produce entre 24 a 30 horas luego del inicio del celo (Ungerfeld, 2011).

La ruptura de la pared folicular es resultado de varios cambios provocados por la LH que incluyen: a) cambios vasculares; b) expansión del cumulus; c) expresión de enzimas proteolíticas.

a) Cambios vasculares. Antes de la ovulación hay un aumento en el flujo sanguíneo hacia la zona del folículo ovulatorio (Espey, 2006; Brannstrom y col., 1998; Hernández y Jiménez, 2008). Esta hiperemia es controlada a nivel de tejido por la histamina y la PGE2.

b) Expansión del cumulus. Implica la separación de las células del cumulus del ovocito (Richards y col., 2002; Ohnishi y col., 2005). La descarga preovulatoria de LH induce la expresión de genes específicos, que son necesarios para que ocurra la expansión del cumulus. La alta cantidad de hialurona producida por las células del cumulus desarrolla presión osmótica, lo que promueve la eventual extrusión de las células del cumulus que rodean el ovocito, fuera de la superficie ovárica (Ohnishi y col., 2005; Salustri y col, 1999).

c) Expresión de enzimas proteolíticas. Un gran número de enzimas proteolíticas han sido involucradas en la proteólisis de matriz extracelular, como las metaloproteinasas, colagenasas. Las células de la teca interna sintetizan colagenasa; esta enzima causa la ruptura del colágeno, que es el principal componente del tejido conectivo. La colagenasa digiere las fibras colágenas de la túnica albugínea favoreciendo así la liberación del ovocito (Senger, 2003; Espey y col., 2006).

Fase luteal temprana

El pico preovulatorio de LH lleva a la ovulación del folículo ovárico, como se dijo anteriormente, y a la posterior luteinización de la estructura folicular que quedará remanente, y así se dará la formación del CL. Durante este período de transición se producen ciertos cambios como la hipertrofia de las células de la granulosa y la producción de un pigmento carotenoide, la luteína, que le da el color característico amarillo anaranjado del CL. A medida que el mismo se va desarrollando, la cantidad de P4 secretada por el mismo, va aumentando. La P4 ejerce varios efectos durante el ciclo estral. Es necesaria como "priming" para el comportamiento del celo, es decir, que se necesita un efecto previo de la P4 sobre el cerebro, para que luego, junto con el aumento del E2, se produzca el comportamiento de celo. La P4 produce un retrocontrol negativo sobre la frecuencia de pulsos de GnRH, por lo tanto, inhibiendo la pulsatilidad de la LH. A su vez, la P4 actúa inhibiendo la secreción uterina de PGF2alfa (Ungerfeld, 2011). El crecimiento del tejido luteal depende del crecimiento de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) y del establecimiento de un soporte sanguíneo funcional (Berisha y Schams, 2005). La intensidad de los procesos angiogénicos dentro del CL alcanzan su pico 2 a 3 días después de la ovulación (Acosta y Miyamoto, 2004; Reynolds y col., 2000).

Inducción de la dilatación cervical en ovinos

Las estrategias desarrolladas para dilatar el cérvix ovino y acceder al útero transcervicalmente incluyen la apertura física utilizando instrumental especial (Halbert y col., 1990; Wulster-Radcliffe y Lewis, 2002) y la inducción hormonal a la dilatación cervical (Rodríguez-Piñón 2003 y 2006; Robinson y col., 2011; Candappa y Bartlewski, 2012). La primera ha mostrado producir efectos traumáticos negativos sobre la fertilidad (Campbell y col., 1996; Wulster-Radcliffe y col., 2004). La segunda está basada en el conocimiento de la fisiología de la dilatación del cérvix y se presenta como la opción más eficiente y menos costosa.

Durante el estro, el cérvix se encuentra levemente relajado y edematoso. Con el aumento de los E2 –actuando a través de sus receptores específicos- aumentaría la expresión (transcripción y traducción proteica) de determinadas proteínas, entre ellas,

los receptores de Ox, uno de los receptores de PGE2 y enzimas como hialuronato sintasas y colagenasas. Estas enzimas son responsables de la desagregación y degradación de las fibras de colágeno cervical, es decir, de la remodelación del colágeno cervical. Junto con el aumento de estos receptores, se produce la activación estrógeno-dependiente del sistema Ox/PGE2. En este sistema, la Ox induce la síntesis de la PGE2, y ambas, actuando a través de sus receptores específicos estimularían la acción estrogénica sobre las enzimas mencionadas, aumentando su expresión o induciendo su activación. Así, se induce a la relajación del músculo liso y a la remodelación del colágeno cervical permitiendo la apertura del canal cervical al estro (Rodríguez Piñón, 2015). En función de lo anterior, la Ox y la PGE2 han sido utilizadas para dilatar el cérvix y facilitar su canulación administradas solas (Owiny y Fitzpatrick, 1990; Sayre y Lewis, 1996 y 1997; Stellflug y col., 2001; King y col., 2004; Leethongdee y col., 2010) o combinadas (Barry y col., 1990; Mylne y col., 1992; Khalifa y col., 1992; McKelvey y col., 1997; Flohr y col., 1999; Leethongdee y col., 2007; DeRossi y col., 2009; Falchi y col., 2012).

Si bien la administración de Ox ha aumentado la penetrabilidad cervical se han visto algunos efectos negativos sobre la fertilidad (Stellflug y col., 2001; King y col., 2004; Candappa y Bartlewski, 2012). Estos efectos podrían ser adjudicados a que se utilizaron dosis supra-fisiológicas (10 a 400 UI), considerando que el aumento de Ox en respuesta a la estimulación cérvico-vaginal fue reproducido mediante la administración intravenosa de solo 100 UI de Ox (Houdeau y col., 2002). En este sentido y considerando la corta vida media de la hormona (minutos), King y colaboradores (2004) sugirieron que sería más efectivo administrar una serie de dosis pequeñas que una única dosis, imitando los pulsos de Ox que ocurrirían durante el estro natural (Wathes y col., 1986; Gilbert y col., 1991). Sin embargo, este tipo de administración sería de difícil aplicación en majadas numerosas y quedaría restringida a la aplicación experimental. Khalifa y colaboradores (1992), demostraron que una varilla de acero inoxidable podría pasar a través del cuello del útero en el 77% de ovejas tratadas con Ox exógena inyectada intravenosa. La misma varilla no podía ser pasada transcervicalmente en el útero de ningún animal tratado con solución salina.

Recientemente se desarrolló un análogo sintético de la Ox, la 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 horas (Atke y Vilhardt, 1987). Esto podría asegurar un efecto oxiótico 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.

La dilatación cervical exitosa se ha atribuido directamente a la administración de Ox exógena, pero sin conocer su mecanismo de acción. En cérvix bovino, se ha reportado in vivo e in vitro que la Ox causa una estimulación selectiva de la liberación de PGE2 cervical, la que podría estar involucrada en la dilatación cervical (Fuchs y col., 1996; Shemesh y col., 1997; Fuchs y col., 2002). Por lo tanto, es posible que ambas hormonas participen directa o indirectamente de la dilatación cervical.

Anteriormente ha sido utilizado un análogo sintético de la prostaglandina E1 (Misoprostol) como inductor de la dilatación cervical en ovejas (Leethongdee y col., 2007 y 2010; DeRossi y col., 2009; Falchi y col., 2012).

Aunque ya en 1988, Rickords y White, investigaron el efecto de la PGE2 exógena administrando una única dosis de 10 mg de Dp en ovejas en anestro y el 67% de las ovejas logró la dilatación cervical, el pasaje a través del cérvix fue posible solo en una de las ovejas. Este método tuvo como desventaja el aumento de las contracciones del músculo liso del útero, probablemente por la velocidad de liberación de la hormona.

Recientemente, una preparación intravaginal de liberación controlada de PGE2 sintética (Dp, *Cervidil*®), que libera concentraciones constantes de hormona por 12 horas (0.3 mg/h), ha sido administrada a ovejas en anestro, para aumentar la penetrabilidad cervical y mejorar la utilización de la IA (Candappa y col., 2009). En este estudio se logró canular transcervicalmente los animales tratados y resultó ser un método eficaz para dilatar el cérvix de la oveja y facilitar la IA transcervical.

Efectos de la inducción hormonal a la dilatación cervical sobre el desarrollo folicular, la ovulación y el 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 estos tratamientos sobre el desarrollo folicular y la ovulación.

Los ovarios producen Ox, que es un potente regulador de la función del útero y ovario. La Ox es producida por las células de la granulosa del folículo preovulatorio, participando en la luteinización del mismo luego de la ovulación; y por el CL, que junto con la PGF2alfa generan un feed back positivo que desencadena la luteólisis (Saller y col., 2010). También se ha sugerido que la Ox tiene función fisiológica en la foliculogénesis, modulando el proceso de selección folicular durante la última fase antes de la ovulación (Bobowiec, y col., 2003). Además, la Ox está asociada a la liberación de GnRH como factor hipotalámico preovulatorio, estimulando a la liberación de FSH y LH en la hipófisis anterior, lo que podría acelerar la maduración del folículo y la ovulación (Bobowiec, y col., 2003). Cuando el nivel de Ox se eleva en la fase folicular del ciclo estral, las concentraciones de gonadotrofina tienden a elevarse, lo que a su vez provoca el crecimiento de un nuevo folículo (Wathes y col., 1989; Bobowiec y col., 1999).

Se estudió el efecto de la inyección subcutánea de Ox de liberación lenta al inicio del estro en ovejas adultas con el objetivo de determinar el efecto de la misma sobre la tasa de ovulación. Los resultados obtenidos mostraron que la tasa de ovulación fue de 179.1% y 151.1%, en las ovejas tratadas y controles, respectivamente, indicando que el tratamiento con Ox aumenta la tasa de ovulación (King y Coetzer, 1997). Un estudio similar basado en la administración intravenosa de Ox de corta acción cada 30 minutos en un período de 24 horas, comenzando al inicio del estro, demostró también que aumenta la tasa ovulatoria en las ovejas tratadas (King y Coetzer, 1996).

Por otra parte, es conocido que las prostaglandinas participan en la ruptura del folículo preovulatorio en mamíferos (Armstrong, 1981). El pico de LH preovulatorio regula tanto la síntesis de PGE2, mediante la activación de enzimas como la ciclooxigenasa (Cox2), así como también la expresión de los receptores de dicha prostaglandina

(PGER1, PGER2, PGER3, PGER4). Cada receptor tiene distinto patrón de expresión (Ok Kim y Duff, 2016). Un efecto importante del pico de LH preovulatorio, es inducir a las células de la granulosa a que produzcan sustancias que debilitan la unión intercelular favoreciendo la ruptura en la propia pared de la granulosa. Se conoce que algunas sustancias, como la PGF2alfa, PGE2, E2 y relaxina aumentan su concentración en el líquido folicular durante este período (Edqvist, 1990). En roedores se determinó que las concentraciones foliculares de PGE2 y PGF2alfa aumentan durante el proceso ovulatorio (LeMaire y col., 1973 y 1975; Espey y col., 1991; Espey y Richards, 2006) y que la administración de eCG aumenta la expresión de los receptores de PGE2 en las células de la granulosa (Segi y col., 2003).

La inhibición del incremento de PGE2 (Edqvist, 1990) o de sus receptores (OK Kim y Duff, 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; Hizaki y col., 1999) y mediante el tratamiento con inhibidores de la síntesis de prostaglandinas 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.

Sincronización de la ovulación

Los tratamientos hormonales para el control del estro y de la ovulación permiten sincronizar el momento de aparición del estro en las hembras ciclando (Aisen, 2004). Desde hace un tiempo se han desarrollado distintas técnicas para la sincronización de celo en pequeños rumiantes, las mismas no han tenido la difusión y el impacto a nivel productivo que se preveía. Sin embargo, el actual desarrollo regional de alternativas productivas en el rubro ovino de nuestro país, requiere manejos más intensivos, por lo que es probable que se incremente el uso de dichas técnicas (Menchaca y col., 2006).

Una técnica de sincronización de celos efectiva debe incluir una respuesta estral fértil y altamente sincronizada en un porcentaje importante de las hembras tratadas. Los parámetros para evaluar los resultados de un programa de sincronización de celos

incluyen: respuesta estral, tasa de concepción y tasa de preñez (Menchaca y col., 2006).

Una alternativa para la sincronización del estro es la PGF2 α . Godfrey y colaboradores (1995), evaluando el uso de las esponjas de P4 y de la PGF2 α en ovejas, concluyeron que las hembras tratadas con P4 presentaron el estro más rápido que los animales tratados con la PGF2 α (1,4 \pm 0,4 y 2,9 \pm 0,4 días, respectivamente), en cuanto que las concentraciones séricas de P4 en el décimo día después del estro fueron semejantes para los dos grupos.

Los métodos más utilizados son las esponjas de P4, y la administración intramuscular (I/M) de eCG (Uribe-Velásquez y col., 2008).

Por un lado el uso de P4 se fundamenta en la colocación de esponjas intravaginales de forma de inhibir la actividad del eje hipotálamo hipofisario, retirándolas luego de determinado tiempo. De esta manera se levanta el mecanismo inhibitor de todas las hembras en forma simultánea, sincronizándose el comienzo de la fase folicular, lo que concluirá en estro y ovulación (Menchaca y col., 2006). Existen varias marcas de esponjas en el mercado con diferencias en el progestágeno que poseen, siendo la medroxiprogesterona (MAP) y la fluorogestona (FGA) en dosis de 60 y 30-40 mg respectivamente, las más utilizadas. El uso de esponjas presenta inconvenientes menores de manejo como ser un cierto porcentaje de pérdidas, adherencias y/o vaginitis (Suarez y col., 2001).

La utilización de progestágenos asociados con tratamientos gonadotróficos (eCG), en dosis que varían entre 200 y 500 UI, dependiendo de la raza, edad y peso de los animales, es utilizada también durante la estación reproductiva con el objetivo de estimular la ovulación e incrementar la tasa ovulatoria, en la estación reproductiva, como fuera de ella (Rubianes y col., 1998; Safdarian y col., 2006). Esta hormona fue descrita hace más de 80 años como un factor que se encuentra en la sangre circulante de la yegua preñada durante el primer tercio de la gestación. Tiene la particularidad de provocar un efecto similar tanto al de FSH como al de LH en especies diferentes a los equinos. Los efectos de esta hormona determinan que existan numerosas aplicaciones para la eCG en especies domésticas, incluyendo la inducción de la pubertad, la reducción del anestro posparto, superovulación y más recientemente la mejora de la fertilidad (Nuñez, 2014).

Inseminación artificial a tiempo fijo en ovinos

La inseminación artificial representa una herramienta práctica en los programas de genética, permitiendo inseminaciones sincronizadas y un uso más eficiente de los machos superiores. Hoy en día, la aplicación de estas biotecnologías requiere procedimientos fáciles de implementación y bajo impacto ambiental (Martin y Ferasyi, 2016).

La inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) facilita el procedimiento al evitar la detección de celo, y para esto, son necesarios tratamientos hormonales que aseguren una ovulación sincronizada y tasas aceptables de preñez (Menchaca y Rubianes, 2004).

En los protocolos de sincronización que se utilizan esponjas intravaginales de progestágenos en combinación con eCG, la mayoría de las ovejas presenta celo 48 horas después del retiro de las esponjas, ovulando a las 60 horas. La IATF se realiza alrededor de 12 horas antes de la ovulación, o sea entre las 48 y 54 horas post-eCG (Gibbons y Cueto, 2011).

Técnica de Ultrasonografía

Desde inicio de los años 90, la ultrasonografía (US) transrectal ha tomado un gran auge como herramienta de elección para el estudio de las estructuras ováricas, tales como folículos y cuerpos lúteos en las diferentes especies de hembras domésticas (Griffin y Ginther, 1992.) En comparación con otras técnicas como la laparotomía, la US permite la visualización repetida y en tiempo real, de las estructuras corporales internas, minimizando de esta forma el manejo y el estrés de los animales. Esto último favorece su uso en el estudio de la dinámica de crecimiento folicular y luteal, en ovarios de ovejas y cabras (Schrack y col., 1993; Ginther y Kot, 1994).

El principio del funcionamiento de la US se basa en la emisión de ondas sonoras de alta frecuencia para producir imágenes de los tejidos blandos y órganos internos. Los equipos de ultrasonidos trabajan mediante la aplicación de pulsos eléctricos continuos

a cristales piezoeléctricos ubicados en un transductor, los cuales producen vibraciones características que dan como resultado ondas de presión acústica (sonido) sobre los tejidos contiguos; lo que implica que las imágenes observadas en la pantalla son equivalentes a un corte histológico y casi instantáneas. La proporción del sonido emitido que es reflejada (eco) comprime los cristales piezoeléctricos del transductor, lo que provoca que éstos conviertan el sonido en impulsos eléctricos. Finalmente el resultado es mostrado en la pantalla de la consola con distintos grados de gris que van desde el blanco hasta el negro (Rosell y col., 2008).

Las características del tejido determinan qué proporción del sonido emitido puede ser propagada o reflejada. Los tejidos que contienen líquidos (fluido folicular o fluido del saco gestacional) propagan las ondas sonoras y se denominan anecoicos o no ecogénicos. Estos se observan de color negro en la pantalla. En el otro extremo se encuentran los tejidos densos (huesos del feto, cérvix) que reflejan intensamente las ondas sonoras y se denominan hiperecoicos o hiperecogénicos. Estos se observan de color blanco en la pantalla. Los tejidos de una consistencia intermedia (estroma ovárico, útero) propagan las ondas sonoras de forma intermedia y se denominan ecoicos o ecogénicos (Rosell y col., 2008).

La frecuencia de los ultrasonidos es medida en Megahertz (MHz). Altas frecuencias permiten una mayor resolución de la imagen, y por tanto, mayor nitidez. Bajas frecuencias permiten obtener mayor penetración en los tejidos estudiados, observando mayor cantidad de área, aunque con menor nivel de detalles. Los transductores se clasifican en dos grupos de acuerdo a su capacidad de baja o alta frecuencia, 3.5 MHz o 5 MHz y 7.5 MHz. Se pueden presentar de tres formas: lineales, convexos o sectoriales (Rosell y col., 2008).

La ecogenicidad de los órganos reproductivos puede variar en dependencia del estado en que se encuentren. Por ejemplo, los cambios morfológicos que sufre el útero como consecuencia del patrón de secreción de las hormonas ováricas, son reflejados en su ecotextura (Rosell y col., 2008). La US ha permitido la evaluación de los efectos de varias hormonas exógenas sobre los ovarios en la oveja (Bartlewski y col., 2001 y 2003; Duggavathi y col., 2004).

Intensidad de píxeles

Una imagen ecográfica se compone de una matriz de píxeles representada en una pantalla de video. Miles de píxeles forman colectivamente la imagen. Ésta varía de 0 píxeles (siendo el color negro) hasta 255 píxeles (corresponde al color blanco) La intensidad de píxeles de las imágenes ecográficas se debe al contenido celular y macromolecular de los tejidos y su análisis podría proveer información acerca del cambio que sufren los mismos (Pierson y Adams, 1995; Chandolia y col. 1997). Por otro lado la heterogeneidad de píxeles refleja la presencia de áreas ecogénicas y no ecogénicas en el tejido (Pierson y Adams, 1995; Duggavathi y col. 2003).

Un estudio de imágenes foliculares y luteales realizado por Liu y colaboradores (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, 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 granulosa y la teca) y en la función secretoria de los folículos durante su crecimiento (Singh y col. 1998; Singh y Adams, 2000).

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).

HIPÓTESIS

El tratamiento con Cb y/o Dp para inducir la dilatación cervical afecta el desarrollo del folículo ovulatorio, el momento en que se desencadena la ovulación y el tamaño del cuerpo lúteo incipiente.

OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar si el tratamiento con Cb y/o Dp afecta el tamaño y la ecogenicidad del folículo ovulatorio, el momento en que se produce la ovulación, y el diámetro del cuerpo lúteo incipiente.

Objetivos específicos

Determinar mediante US ovárica, el efecto de la administración de Cb y/o Dp en ovejas con ovulación sincronizada con MAP y eCG sobre:

- a. El momento de la ovulación (intervalo eCG – ovulación).
- b. El desarrollo del folículo preovulatorio en términos de su tamaño (diámetro folicular) desde la administración de eCG hasta la ovulación.
- c. La intensidad de pixeles del contenido folicular antes de la ovulación.
- d. El tamaño del cuerpo lúteo incipiente.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se llevó a cabo en el mes de abril de 2016, durante la estación reproductiva de la raza Corriedale, en el Campo experimental 1 de Facultad de Veterinaria. El predio está ubicado en la Ruta 108, kilómetro 11 cerca del pueblo Migués, departamento de Canelones. Latitud $34^{\circ}22'22.23''\text{S}$ y longitud $55^{\circ}36'10.50''\text{O}$

Ubicación del departamento de Canelones



Fuente: https://es.wikipedia.org/wiki/Departamento_de_Canelones fecha de consulta 11 de Mayo 2017

Ubicación del Campo experimental 1 de Facultad de Veterinaria



Fuente: Google Earth

Trabajo de campo

El ensayo experimental se realizó en cuarenta ovejas Corriedale multíparas (de dos o más partos) provenientes de la misma majada, que fueron alimentadas a campo natural, vacunadas contra Clostridios y desparasitadas con Moxidectina al 0,2% y Closantel al 10% vía oral, como el resto de la majada del establecimiento. Presentaron un peso homogéneo de media de 46 kg \pm 0,9 kg y un estado corporal de 2.5 a 3.5 en la escala de 1-5 (Russel y col., 1969).

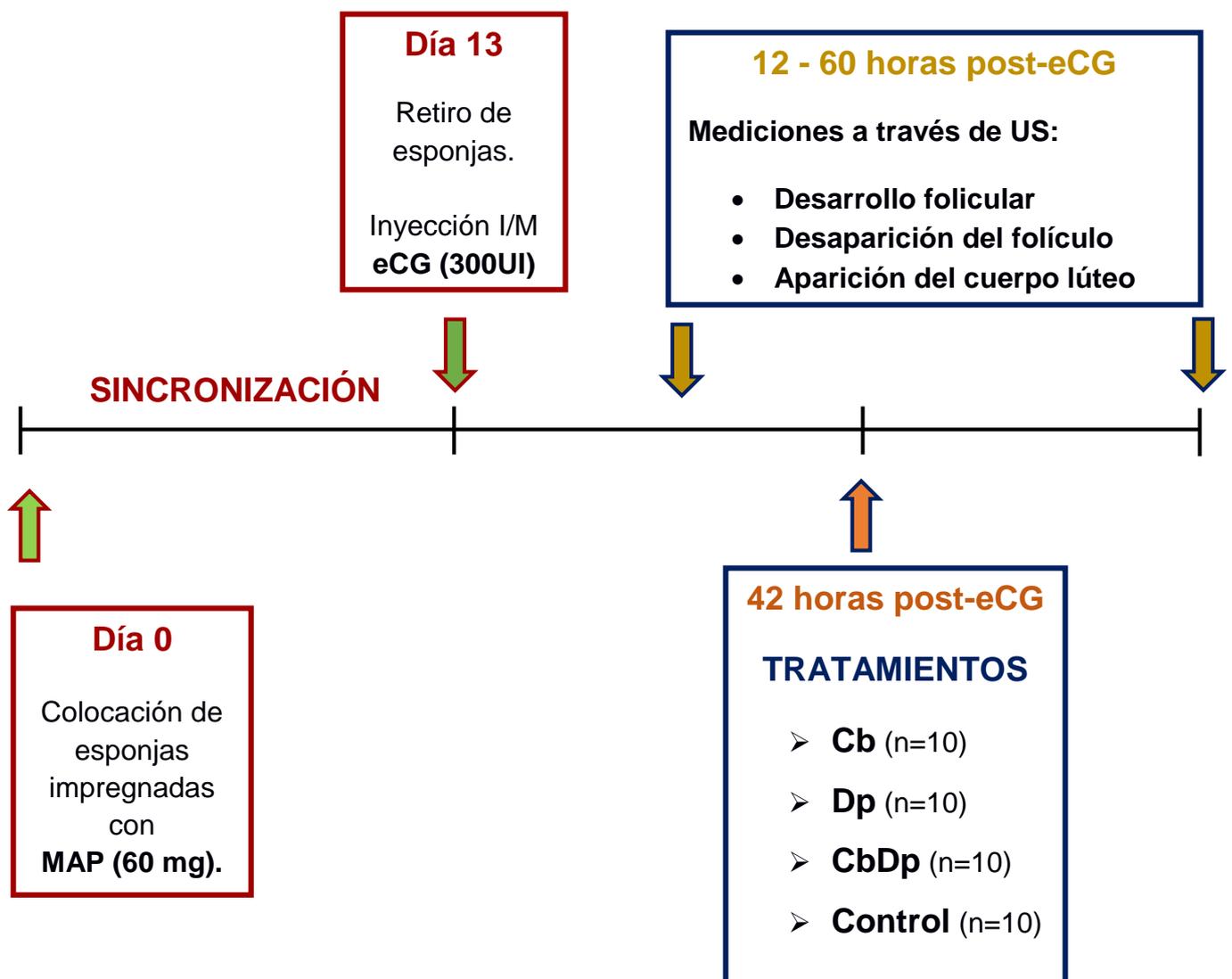
Las ovejas fueron sincronizadas con el protocolo MAP-eCG, diseñado para realizar una IATF a las 54 horas post-eCG (Olivera-Muzante y col., 2011). El mismo consiste en la administración intravaginal de una esponja impregnada con 60 mg de MAP (*Progespon*®, Syntex, Buenos Aires, Argentina) por 13 días y la administración de 300 UI de eCG intramuscular (*Novormon 5000*®, Syntex, Buenos Aires, Argentina) al momento de retirar la esponja.

A las 42 horas del retiro de las esponjas y la administración de 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 Control, n=10 en cada uno) y tratadas correspondientemente.

El Grupo Cb fue tratado con 40 μ g (0.8 mL) intramuscular 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 intramuscular de 0,8 mL de suero fisiológico. El grupo Cb+Dp con ambas hormonas y al grupo Control se le administró una inyección intramuscular de 0,8 mL de suero fisiológico y un dispositivo intravaginal (*Propess*®) sin principio activo.

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 realizó la medición del desarrollo del folículo preovulatorio a las 12, 20, 28, 36, 42, 48, 54, 60 horas post eCG o hasta el momento de la ovulación. El desarrollo del folículo pre-ovulatorio se determinó mediante US con un ecógrafo portátil (Esaote My Lab One, Genova, Italia) con un transductor transrectal lineal de 10 MHz. Se realizó la captura de imágenes y video para ser procesado, midiendo y registrando el diámetro del folículo mayor hasta su desaparición (ovulación) con el software del propio equipo (Schrack y col., 1993; Cardwell y col., 1998). Además, se midió la intensidad en píxeles del folículo preovulatorio, aplicando el software Image J (Software libre). Se calculó el intervalo eCG-ovulación (horas) en todos los animales.



Análisis estadístico

Para comparar los datos de diámetro folicular se utilizó el Procedimiento Mixto para Análisis de Varianza (ANOVA) utilizando muestras repetidas (Statistical Analysis Systems SAS Institute, Cary, NC, EEUU, 2000), e incorporando como efectos fijos el grupo de tratamiento (Cb, Dp, Cb+Dp y Control), las horas post-eCG y las interacciones entre ambos efectos.

El intervalo eCG-ovulación se analizó utilizando el mismo modelo, pero para muestras simples incorporando solo el efecto fijo de los grupos experimentales.

Para analizar el tamaño de los cuerpos lúteos incipientes se utilizó la prueba de Chi cuadrado.

Para correlacionar los datos de diámetro folicular e intensidad en píxeles de los folículos preovulatorios se utilizó el test de correlación de Pearson.

Los datos están presentados como las medias \pm e.s.m. con diferencias consideradas significativas para $P < 0,05$.

RESULTADOS

Momento de la ovulación

De los 40 animales, 6 ovularon luego de las 42 horas post-eCG, o sea luego del tratamiento de inducción de la dilatación cervical (Figura 1). Los 6 animales que ovularon luego de las 42 horas post eCG fueron tratados con Cb: 4/10 del grupo Cb y 2/10 del grupo Cb+Dp. Ningún animal Control o tratado solo con Dp ovuló luego de las 42 horas post eCG, por lo que el efecto de los distintos tratamientos sobre el momento de la ovulación no pudo ser analizado estadísticamente como un factorial 2x2.

Número de ovejas que ovularon antes o después de los tratamientos de inducción a la dilatación cervical realizado a las 42 horas post-eCG

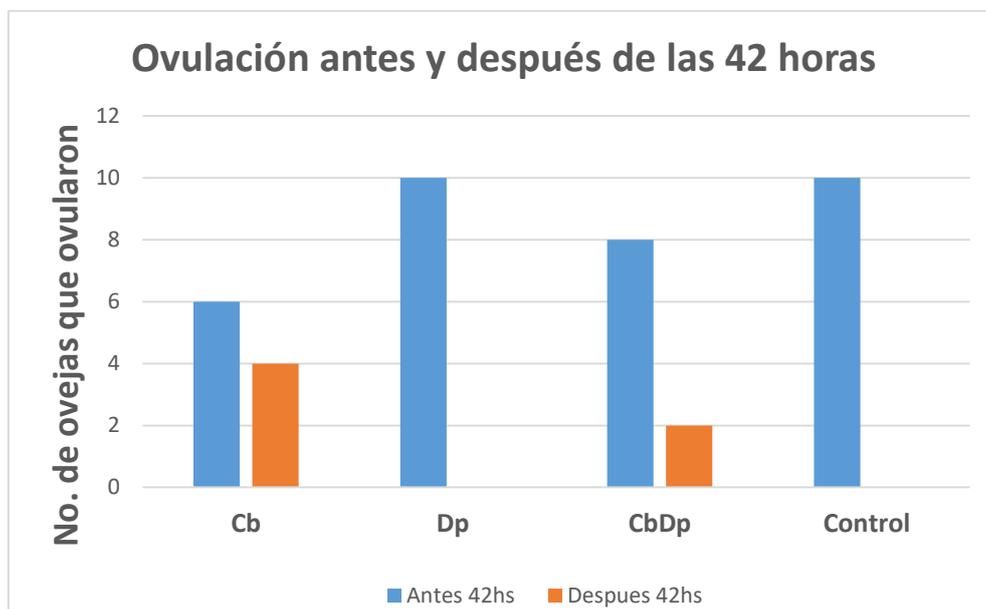


Figura 1. – Número de ovejas sincronizadas con esponjas intravaginales impregnadas con 60 mg de MAP por 13 días y la administración de 300 UI de eCG intramuscular, que ovularon antes o después del tratamiento de inducción a la dilatación cervical realizado a las 42 horas post-eCG. Grupo Cb tratados con 40 µg (0.8 mL) intramuscular y un dispositivo intravaginal sin principio activo (n=10), Grupo Dp con 10 mg mediante la inserción de un dispositivo intravaginal y una inyección intramuscular de 0,8 mL de suero fisiológico (n=10). Grupo Cb+Dp con dichas hormonas respectivamente (n=10) y Grupo Control con una inyección intramuscular de 0,8 mL de suero fisiológico y un dispositivo intravaginal sin principio activo (n=10).

Desarrollo folicular

Se analizó si el tamaño (en mm) de los folículos preovulatorios varió según la hora post-eCG.

El diámetro folicular (mm) fue afectado por las horas post-eCG ($P=0.0002$), aumentando a las 28 horas, alcanzando el máximo a las 36 horas y disminuyendo a las 42 horas (Tabla 1).

Diámetro de los folículos preovulatorios (mm) según la hora post-eCG

Horas post-eCG	Media	E.S.M	
12 (n=40)	4.6571	0.4157	a
20 (n=40)	5.3364	0.3316	a
28 (n=40)	6.9077	0.3051	b
36 (n=40)	7.2667	0.4490	b
42 (n=6)	5.8000	1.0999	a

Tabla 1. – Diámetro de los folículos preovulatorios (mm) de ovejas sincronizadas con esponjas intravaginales impregnadas con 60mg de MAP por 13 días, según las horas post administración de eCG (n=40). Diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.0002$).

Intensidad de pixeles de los folículos preovulatorios

Se encontró una correlación positiva entre el diámetro folicular (mm) y la intensidad en pixeles del líquido folicular de los folículos preovulatorios ($r=0.3292$, $n=39$, $P<0.04$) (Figura 2).

Correlación entre la intensidad de pixeles del líquido folicular y el diámetro de los folículos preovulatorios

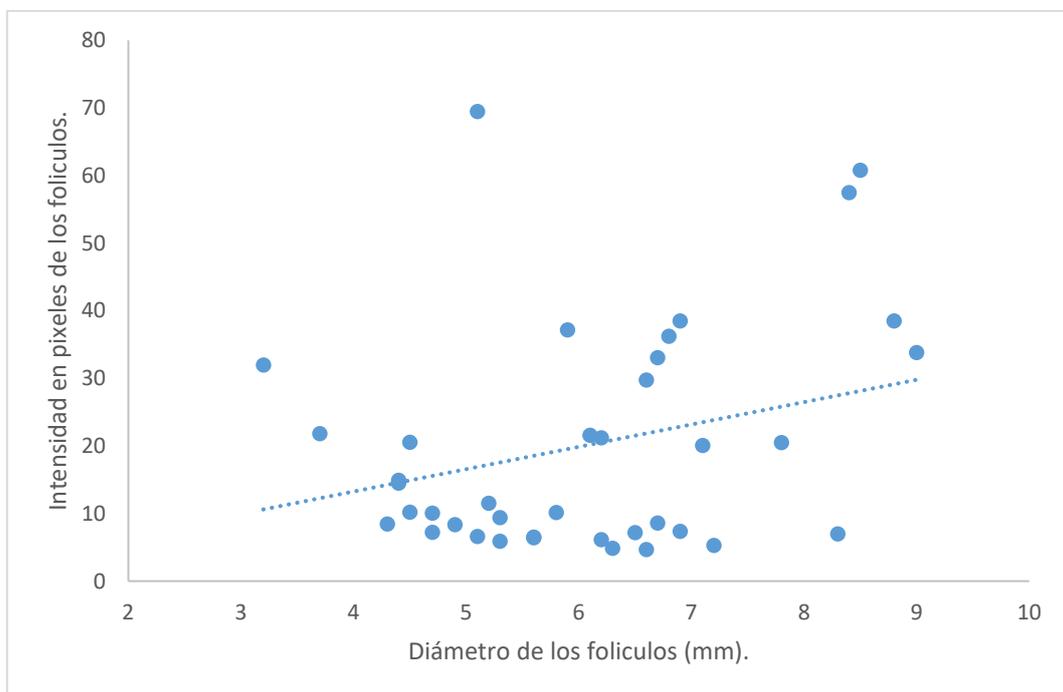


Figura 2. - Correlación entre la intensidad de pixeles del líquido folicular y el diámetro de los folículos preovulatorios en ovejas sincronizadas con esponjas intravaginales impregnadas con 60mg de MAP por 13 días y la administración de 300 UI de eCG intramuscular. Se encontró una correlación positiva, $r=0.3292$, $n=39$, ($P<0.04$).

Diámetro de cuerpos lúteos incipientes

Algunos de los CL fueron vistos por primera vez antes de las 42 horas post-eCG y otros después. Se analizó si los CL que fueron vistos por primera vez antes del tratamiento tenían distinto diámetro de los que fueron vistos después.

El tamaño del CL no fue diferente antes o después de la aplicación de los tratamientos ($P= 0.3119$) y tampoco fue diferente entre grupos (Cb vs Cb+Dp) cuando el CL fue visualizado luego de las 42 horas post- eCG ($P= 0.7448$). (Figura 3)

Diámetro (mm) de los cuerpos lúteos incipientes desarrollados antes o después de los tratamientos para inducir la dilatación cervical

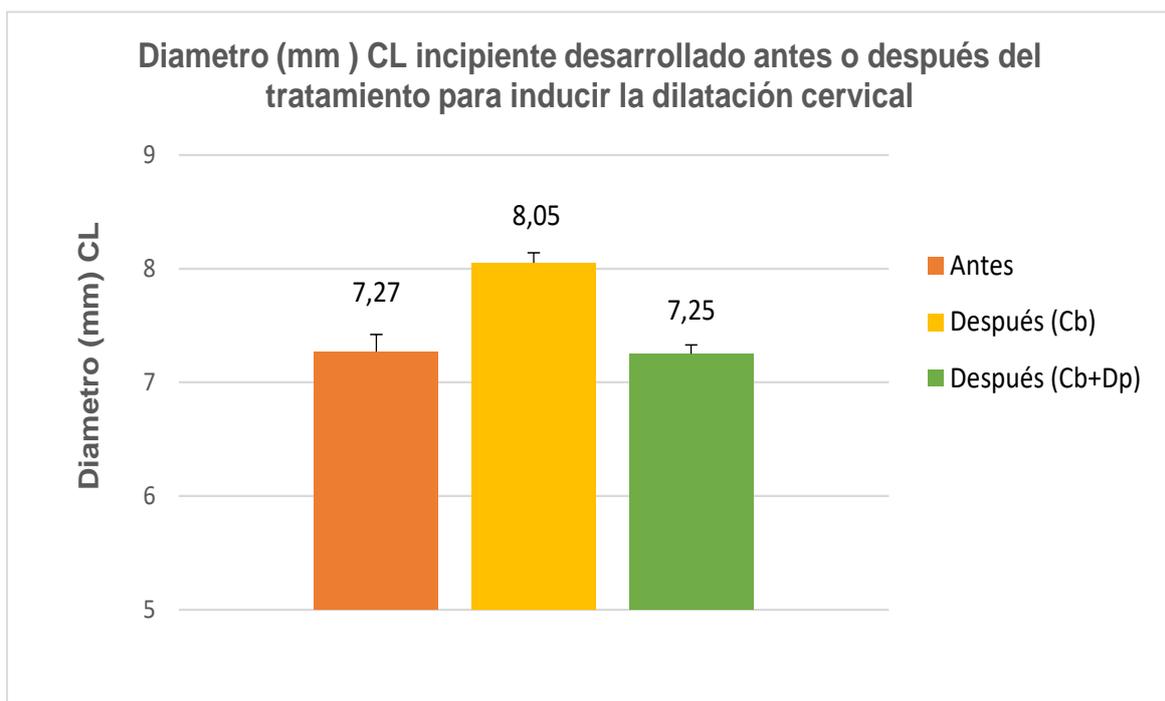


Figura 3. – Diámetro (mm) de los cuerpos lúteos incipientes de ovejas sincronizadas con esponjas intravaginales impregnadas con 60mg de MAP por 13 días y administración de 300 UI de eCG intramuscular y tratadas a las 42 h post-eCG para inducir la dilatación cervical con Cb y Dp (grupos Cb y Cb+Dp). No hubo diferencias significativas ($P= 0.7448$).

DISCUSIÓN

Momento de la ovulación

La constatación de que 34 de los 40 animales (85%) ovularon antes de las 42 horas post-eCG fue sorprendente, dado que el diseño experimental preveía que las ovulaciones se concentraran alrededor de las 60 horas post-eCG, es decir, posterior a las 54 horas -momento previsto para la realización de una IATF- luego de la sincronización con MAP y eCG (Gordon 1996; Olivera-Muzante y col. 2011; Abecia y col. 2012; Dos Santos Neto y col. 2015).

Utilizando ultrasonografía ovárica, Ali y colaboradores (2009), reportaron que ovejas Farafra sincronizadas con un dispositivo intravaginal de silicona impregnado con progesterona natural por 12 días y al retiro 400 UI de eCG, comenzaron a ovular a las 48 horas post- eCG y la misma se extendió hasta las 72 horas. Similarmente, en ovejas Corriedale sincronizadas con un dispositivo intravaginal también con P4 natural pero por 6 días y a su retiro 300 UI de eCG, la ovulación ocurrió entre las 62 y 74 horas post-eCG (Vilariño y col. 2010, 2013). Por el contrario, y coincidiendo con nuestro trabajo, cuando se sincronizaron ovejas Polwarth (Ideal) con un dispositivo intravaginal con MAP por 12 días y 250 UI de eCG al retirarlo, las ovulaciones ocurrieron antes de las 48 hs post-eCG (Viñoles y col. 2001). Considerando que la potencia biológica de la MAP es mayor que la de la P4 natural y su vida media más larga (Africandera y col. 2014), cabe plantearse la hipótesis de que la MAP ejerza un efecto inductor del recambio folicular (Rubianes y col. 1999; Viñoles y col. 2001) mayor respecto a la P4 natural y que esto pueda favorecer el rápido surgimiento de la onda folicular ovulatoria al retirar la esponja y administrar eCG y determinar una ovulación más temprana. Los reportes de intervalo eCG-ovulación mayores cuando se utilizan tratamientos cortos de MAP con respecto a los tratamientos largos van en el mismo sentido (Viñoles y col. 2001).

Por otro lado, las 6 ovejas que ovularon después de las 42 horas post-eCG fueron tratadas con Cb, lo que sugiere que esta hormona podría estar involucrada en el retraso de la ovulación de los folículos ovulatorios. Interesantemente, Bobowiec y colaboradores, (2003) obtuvieron una disminución de las concentraciones circulantes de E2 en respuesta a la administración de Ox natural en ovejas sincronizadas con P4.

Esta acción directa de la Ox sobre la disminución de la esteroidogénesis folicular, podría estar relacionada al retraso de la ovulación en este experimento. Por otro lado, la Ox está asociada a la liberación de GnRH como factor hipotalámico pre ovulatorio, estimulando entonces a la liberación de FSH y LH en la hipófisis anterior (Bobowiec, y col., 2003), por lo cual, una acción de la Ox sobre el eje hipotálamo-hipofisiario, podría comprometer el proceso de dominancia folicular lo que a su vez permite el crecimiento de nuevos folículos (Wathes y col, 1989; Bobowiec y col, 1999). En ése sentido, la administración de Ox natural, en solución acuosa o en una preparación oleosa de liberación lenta, aumentó la tasa ovulatoria en ovejas (King y Coetzer, 1996, 1997).

Desarrollo folicular

Debido al bajo número de ovejas que ovularon luego de la administración de los tratamientos de inducción a la dilatación cervical, no se pudo analizar el efecto de cada tratamiento sobre el diámetro folicular.

Se observó que el desarrollo folicular en términos de diámetro aumentó a las 28 horas post eCG y llegó al máximo a las 36 horas post-eCG, en acuerdo con la ocurrencia de las ovulaciones previas a las 42 horas post-eCG de la mayoría de las ovejas y al efecto estimulante del crecimiento folicular provocado por la eCG (Evans y Robinson 1980; Viñoles y col. 2001).

Intensidad de pixeles de los folículos preovulatorios

Se ha planteado la existencia de una correlación 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). La correlación positiva entre el diámetro folicular y la intensidad de pixeles previo a la ovulación, reflejaría el grado de desarrollo que los folículos ovulatorios alcanzaron momentos antes de la ovulación.

Diámetro de cuerpos lúteos incipientes

En el presente trabajo no se encontraron diferencias significativas en el diámetro de los CL incipientes observados antes o después de los tratamientos de inducción a la dilatación cervical. Tampoco entre los distintos tratamientos en aquellos CL formados luego de las 42 horas post eCG (Cb vs. CbDp).

No se puede descartar que eventuales diferencias en el diámetro de los CL a consecuencia de los tratamientos se manifiesten en la medida que éstos se desarrollen más allá del estadio incipiente. En ese sentido, se ha visto que el área total y el área de vascularización del CL aumentaron días después de la ovulación, en correlación positiva con la producción de progesterona durante la luteogénesis (Arashiro y Brandao 2008; Siqueira y col 2009; Figueira y col. 2015), por lo que sería de gran importancia el seguimiento del CL más allá de su estado incipiente.

CONCLUSIÓN

La hipótesis planteada en este trabajo no pudo ser verificada en el ensayo experimental.

En ovejas Corriedale, sincronizadas con protocolo MAP-eCG durante la estación reproductiva, se observó que el momento de ovulación se adelantó con respecto a lo esperado, habiendo ovulado todas las ovejas antes de las 54 horas post-eCG, momento en el que iban a ser inseminadas. A su vez, el 85% de los animales ovuló antes de las 42 horas post-eCG, por lo tanto no fueron influidos por el tratamiento de inducción a la dilatación cervical. Los 6 animales restantes que ovularon luego del tratamiento fueron administrados con Cb, lo que sugiere que la Cb podría retrasar el momento de la ovulación.

En cuanto al diámetro folicular, debido a que la mayoría de los animales ovularon antes de la aplicación de los tratamientos, no se pudo evaluar si éstos afectan el desarrollo del folículo. Como alternativa, se determinó el crecimiento del folículo según las horas post-eCG, observándose un aumento del diámetro hasta un máximo a las 36 horas post-eCG, coincidiendo con el momento de la ovulación de la mayoría de los animales. Por otro lado se halló una correlación positiva entre el diámetro y la intensidad de pixeles de los folículos preovulatorios.

Con respecto a los CL recién formados, no se vio ninguna diferencia significativa entre los observados antes y después de los tratamientos, ni entre los distintos grupos de tratamientos.

RECOMENDACIONES

En primer lugar, por el motivo de que el 85% de los animales ovularon antes de las 42 horas post-eCG, por lo tanto, antes del momento en que se realizaría la IATF (Gordon, 1996; 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. La vida fecundable de los ovocitos ovinos se ha estimado en 12 - 24 horas (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). Entonces se debería adelantar la hora de inseminación, quedando anterior a la ovulación de la mayoría de las ovejas y de esta forma no comprometer la fertilidad.

Una vez corregida la hora de IATF, ajustar las horas de los tratamientos con Cb y Dp, siendo la administración de las hormonas 12 horas antes de la IATF debido a su acción biológica y vida media en sangre.

Por otro lado se ha visto que la utilización de la dosis de 300 UI de eCG no ha presentado ovulaciones múltiples en las ovejas sincronizadas con esta hormona, por lo tanto promete ser una dosis apta y recomendable para la sincronización de la ovulación de las ovejas en los programas de IATF.

Otra recomendación en cuanto a este experimento, sería la de implementar una sincronización con MAP durante un período más corto. Por ejemplo, 6 días ya que se ha comprobado sus ventajas post inseminación, aumentando los porcentajes de preñez. La tasa de preñez en ovejas sincronizadas con dispositivo intravaginal de P4 durante un corto plazo (6 días) es mayor comparada con la aplicación a largo plazo (12 días), con resultados de 83% y 63%, respectivamente. La menor tasa de preñez observada después del tratamiento a largo plazo con progestágeno está relacionada con un recambio folicular más lento, que estimuló la ovulación de los folículos persistentes dominantes, a diferencia del tratamiento a corto plazo que resultó en una tasa de preñez más alta, probablemente, debido a la ovulación de folículos en crecimiento recién reclutados (Viñoles y col., 2003).

A su vez, comparando los tratamientos con MAP de 6, 9, y 13 días, se observó una tasa de concepción mayor en los animales tratados durante 9 días, con resultados de 75% vs 66,7% para 6 días y 63% para 13 días. (Ungerfeld y Rubianes, 1999).

Se recomendaría también en caso de realizar nuevamente este protocolo, el seguimiento ecográfico luego de la ovulación, para evidenciar el estado y tiempo de vida del CL resultante, más allá de su estado incipiente, -podría complementarse con análisis de P4 sérica- para comprobar la viabilidad de ese CL y que el tratamiento de inducción a la dilatación cervical tanto con Cb como con Dp no interfieren en el desarrollo normal del mismo, esperando buena viabilidad embrionaria y mantenimiento de la preñez.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Abecia JA, Forcada F, González-Bulnes A. (2012). Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Animal Reproduction Science*, 130 (3–4):173–179.
- 2) Acosta TJ, Miyamoto A. (2004). Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Animal Reproduction Science*, 82-83: 127-140.
- 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). Preparación de las hembras. Detección y control del estro y la ovulación. En: Figueiredo V. *Reproducción ovina y caprina*. Buenos Aires. Editorial Inter-Médica, S.A.I.C.I. p. 50-56.
- 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. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*. 11(2):183-184.
- 7) Arendt, J. (1986). Role of the pineal gland and the melatonin in seasonal reproductive function in mammals. *Oxford Reviews Reproduction Biology* 8:266-320.
- 8) Armstrong DT. (1981). Prostaglandins and follicular functions. *Journal Reproduction of Fertility* 62: 283-291.
- 9) Atke A, Vilhardt H. (1987). Uterotonic activity and myometrial receptor affinity of 1-deamino-1-carba-2-tyrosine (O-methyl)-oxytocin. *Acta Endocrinológica (Copenhagen)* 115: 155-160.
- 10) Barry DM, van Niekerk CH, Rust J, van der Walt T. (1990). Cervical embryo collection in sheep after ripening of the cervix with prostaglandin E2 and estradiol. *Theriogenology* 33:190 (Abstr.).

- 11) 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. *Reproduction, Fertility and Development*. 13:133-142.
- 12) 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. *Biology of Reproduction*. 68:1403-1412.
- 13) Berisha B, Schams D. (2005). Ovarian function in ruminants. *Domestic Animal Endocrinology*, 29: 305-317.
- 14) Binkley, S. (1988). *The Pineal: Endocrine and neuroendocrine function*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, p. 242-261.
- 15) Bobowiec R., Kosior-Korzecka U., Patkowski K., Pięta M., (1999). Comparison of plasma steroid hormones status of ewe lambs and ewes with different ovulation rate. *Annales Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska, sectio DD* 54: 99-107.
- 16) 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 Medicina Veterinaria* 2 (2): 3-10.
- 17) Brannstrom M, Zackrisson U, Hagstrom HG, Josefsson B, Hellberg P, (1998). Preovulatory changes of blood in different regions of the human follicle. *Fertility and Sterility*. 69: 435-442.
- 18) Campbell BK, Scaramuzzi RJ, Webb R. (1995). Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. *Journal Reproduction of Fertility*; 49:335 - 350.
- 19) Campbell JW, Harvey TG, McDonald MF, Sparksman RI. (1996). Transcervical insemination in sheep: An anatomical and histological evaluation. *Theriogenology*.
- 20) 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. *Research in Veterinary Science* 87: 204-206.
- 21) Candappa IB, Bartlewski PM. (2012). A review of advances in artificial insemination (AI) and embryo transfer (ET) in sheep, with the special reference

- to hormonal induction of cervical dilation and its implications for controlled animal reproduction and surgical techniques. *The Open Reproductive Science Journal*, 162-175.
- 22) Candappa IB, Bartlewski PM. (2014). Induction of cervical dilation for transcervical embryo transfer in ewes. *Reproductive Biology and Endocrinology* 12: 1-9.
- 23) 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's serum gonadotropin. *Journal Animal Science* 76: 2235-2238.
- 24) 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.
- 25) Davies K. (2005). Ovarian antral follicular dynamics and regulation in sheep. Thesis of Master of Science. University of Saskatchewan. Total de páginas, 153 p.
- 26) 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.
- 27) DeRossi 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 Ruminant Research* 83: 74-78.
- 28) DI.CO.SE. (2015). Dirección de Contralor de Semovientes. Declaración jurada (2015), Total Nacional. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/unidad-ejecutora/direccion-general-de-servicios-ganaderos/sanidadanimal/dicose/declaracion-jurada-ante-dicose/ano-2015>
Fecha de consulta 1/06/2017.
- 29) DI.CO.SE. (2016). Dirección de Contralor de Semovientes. Declaración jurada (2016), Total Nacional. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/indicadores-basados-en-la-declaracion-jurada-anual-de-existencias-dicose-sniq-2016>
Fecha de consulta 1/06/2017.
- 30) 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 Science* 182: 125–128.
- 31) 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.
- 32) Duggavathi R. (2004). Dynamics and regulation of ovarian antral follicular waves in sheep. Thesis of Doctor of Philosophy. University of Saskatchewan, 226p.
- 33) Duggavathi, R.; Bartlewski PM; Pierson AP; Rawlings NC. (2003). Luteogenesis in cyclic ewes: echotextural, histological and functional correlates. *Biology of Reproduction*. 69: 634-639.
- 34) Dzuik PJ. (1965). Timing of maturation and fertilization of the sheep egg. *The Anatomical Record*. 153: 211--224.
- 35) Edqvist, L- E., (1990). "Fundamentals of veterinary reproductive endocrinology", edición del Department of Clinical Chemistry, Swedish University of Agricultural Sciences, Suecia 16: 111-119.
- 36) Ellwood DA, Mitchell MD, Anderson AB, Turnbull AC. (1980). Specific changes in the in vitro production of prostanoids by the ovine cervix at parturition. *Prostaglandins* 19: 479-488.
- 37) Eppleston, J., Salamon, S., Moore, N.W., Evans, G. (1994). The depth of cervical insemination and site of intrauterine insemination and their relationship to the fertility of frozen-thawed ram semen. *Animal Reproduction Science* 36: 211–225.
- 38) Espey LL (1999). Ovulation, Vol. 3, *Encyclopedia of Reproduction*. San Diego, Academic Press, V3, p. 605 – 614.
- 39) Espey LL, Richards JS. (2006). Ovulation. En: Neill, J.D. (Ed.), *Physiology of Reproduction*, vol. 1, tercera editorial, St. Louis, Academic Press, V1, p. 425-474.
- 40) Espey LL, Tanaka N, Adams RF, Okamura H. (1991). Ovarian hydroxyeicosatetraenoic acids compared with prostanoids and steroids during ovulation in rats. *American Journal of Physiology* 260: 163- 169.

- 41) Evans G, TJ Robinson. (1980). The control of fertility in sheep: endocrine and ovarian responses to progestagen-PMSG treatment in the breeding season and in anoestrus. *The Journal of Agriculture Science* 94: 69-88.
- 42) Falchi L., Taema M., La Clanche S., Scaramuzzi R.J. (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.
- 43) 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.
- 44) Figueira LM, Fonseca JF, Arashiro E, Souza-Fabjan J, Ribeiro A, Oba E, Viana J, Brandão FZ. (2015). Colour Doppler Ultrasonography as a Tool to Assess Luteal Function in Santa Inês Ewes. *Reproduction in Domestic Animals* 50: 643-650.
- 45) Flohr SF, Wulster-Radcliffe MC, Lewis GS. (1999). Technical note: development of a transcervical oocyte recovery procedure for sheep. *Journal of Animal Science* 77: 2583-2586.
- 46) Fuchs AR, Graddy LG, Kowalski AA, Fields MJ. (2002). Oxytocin induces PGE2 release from bovine cervical mucosa in vivo. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 70: 119-129.
- 47) Gibbons A, Cueto M (2011). Manual de inseminación artificial en la especie ovina. Reproducción y Genética. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria INTA. Centro Regional Patagonia Norte. P 17-19.
- 48) Gilbert CL1, Jenkins K, Wathes DC. (1991). Pulsatile release of oxytocin into the circulation of the ewe during oestrus, mating and the early luteal phase. *Journal of Reproduction and Fertility* 91:337-346.
- 49) Ginther, O. J., Kot K. (1994). Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. *Theriogenology*. 42: 987-1001.
- 50) Godfrey R W, L Gray, JR Collins. (1995). Estrus synchronization of sheep in the tropics using either controlled internal drug release (CIDR) dispensers or prostaglandin F2 α (PGF). *Journal of Animal Science* 73: 232.
- 51) Goodman RL, Inskeep, EK (2006). Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the sheep. En: Neill J, editor. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Tercera editorial, San Diego: Elsevier; p. 2389-447.

- 52) Gordon IR (1996). Reproduction in Sheep and Goats. Controlled Reproduction in Farm Animals Series. Wallingford, CABI, v2. p 450.
- 53) Griffin, PG, Ginther OJ. (1992). Research application of ultrasonic imaging in reproductive biology. *Journal of Animal Science* 70: 953.
- 54) Halbert GW, Dobson H, Walton JS, Buckrell BC. (1990a). The structure of the cervical canal of the ewe. *Theriogenology* 33: 977-992.
- 55) Halbert GW, Dobson H, Walton JS, Buckrell BC. (1990b). A technique for transcervical intrauterine insemination of the ewes. *Theriogenology* 33: 993-1010.
- 56) Hernández A, Jiménez C. (2008). El ciclo estral. En: Hernández A. *Reproducción en la vaca: fisiología y aplicaciones*. Bogotá: Editorial Universidad Nacional de Colombia. p. 42-86.
- 57) 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). *Proceedings of the National Academy of Science of USA*. 96: 10501-10506.
- 58) Houdeau E, Raynal P, Marnet PG, Germain G, Mormède P, Rossano B, Monnerie R, Prud'homme MJ. (2002). Plasma levels of cortisol and oxytocin, and uterine activity after cervical artificial insemination in the ewe. *Reproduction Nutrition Development* 42: 381-392.
- 59) Hunzicker-Dunn M, Mayo K. (2006). Gonadotropin Signaling in the Ovary. En: Neill J. Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction*. Tercera edición. San Diego: Elsevier; p. 547-592.
- 60) I.N.I.A (2001). Investigación Aplicada a la Cadena Agroindustrial Cárnica: Avances obtenidos: Carne Ovina de Calidad. Montossi, F. (2001). Investigación. I.N.I.A Serie Técnica Nº 126. Total de páginas: 9-25.
- 61) 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: 12/03/2017.
- 62) Kaabi M, Alvarez M, Anel E, Chamorro CA, Boixo JC, Paz P, Anel L. (2006). Influence of breed and age on morphometry and depth of inseminating catheter penetration in the ewe cervix: a postmortem study. *Theriogenology*; 66(8):1876-1883.

- 63)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.
- 64)Khalifa R, Sayre B, Lewis G. (1992). Exogenous oxytocin dilates the cervix in ewes. *Journal of Animal Science* 70: 38-42.
- 65)Kinder JE, Kojima FN, Bergfeld EG, Wehrman ME, Fike KE. (1996). Progestin and estrogen regulation of pulsatile lh release and development of persistent ovarian follicles in cattle. *Journal of Animal Science.*; 74: 1424-1440.
- 66)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.
- 67)King P R, Coetzer W A (1996). Effect of oxytocin treatment during oestrus on the ovulation rate of Merino ewes. *Journal of the South African Veterinary Association* 67: 41 – 43
- 68)King P R, Coetzer W A (1997). The effect of treatment with a slow-releasing oxytocin preparation at the onset of oestrus on the ovulation rate of Merino ewes. *Journal of the South African Veterinary Association* 68 (1): 16 – 17.
- 69)Ledger WL, Ellwood DA, Taylor MJ. (1983). Cervical softening in late pregnant sheep by infusion of prostaglandin E-2 into a cervical artery. *Journal of Reproduction and Fertility* 69: 511-515.
- 70)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.
- 71)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.
- 72)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.

- 73) LeMaire WJ, Yang NS, Behrman HH, Marsh JM. (1973). Preovulatory changes in the concentration of prostaglandins in rabbit graafian follicles. *Prostaglandins* 3: 367–376.
- 74) 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.
- 75) 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). *Reproduction in Domestic Animals* 42:393-401.
- 76) Lopez-Sebastian, A., A. Gonzalez de Bulnes, J. Santiago Moreno, A. Gomez Brunet, E. C. Townsend and E. K. Inskeep, (1997). Patterns of follicular development during the estrous cycle in monovular Merino del País ewes. *Animal Reproduction Science*. 48: 279
- 77) M.G.A.P. (2015). Anuario Estadístico Agropecuario. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/unidad-ejecutora/oficina-deprogramacion-y-politicas-agropecuarias/publicaciones/anuariosdiea/anuario2015>. Fecha de consulta: 23-11-16.
- 78) Martin, G.B., Ferasyi, T.R., (2016). Clean, green, ethical (CGE) management: what research do we really need? *The International Journal of Tropical Veterinary and Biomedical Research*. 1 (1): 1–9.
- 79) McKelvey WAC, McEvoy TG, Dingwall WS, Robinson JJ, Lindsay E, King ME, FitzSimons J, Mylne MJA. (1997). The use of exogenous hormones to facilitate transcervical embryo recovery in sheep and their effect on embryo development. *Theriogenology* 47: 369.
- 80) Menchaca A, Ungerfeld R, De Castro T, Rubianes E (2006). Tratamientos hormonales para la inducción y sincronización de celos en ovejas y cabras. En: Ungerfeld R. *Reproducción en los animales domésticos*. Ediciones MELIBEA. v2, p. 483-493.
- 81) Menchaca, A., Rubianes, E., (2004). New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reproduction and Fertility Development*. 16: 403–413.

- 82)Moré J. (1984). Anatomy and histology of the cervix uteri of the ewe: new insights. *Acta Anatómica (Basel)* 120: 156-159.
- 83)Murdoch WJ, Hansen TR, McPherson LA. (1993). A review--role of eicosanoids in vertebrate ovulation. *Prostaglandins* 46:85-115.
- 84)Mylne MJA, McKelvey WAC, Fernie K, Matthews K (1992). Use of a transcervical technique for embryo recovery in sheep. *Veterinary Record* 130: 450-451.
- 85)Naqvi S, Pandey G, Gautam K, Joshi A, Geethalakshmi V, Mittal J. (2005). Evaluation of gross anatomical features of cervix of tropical sheep using cervical silicone moulds *Animal Reproduction Science*; 85(3–4): 337-344.
- 86)Nuñez Olivera, R (2014). Uso de gonadotrofina coriónica equina en la sincronización de la ovulación y el mantenimiento de la gestación en vacas de carne. Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Escuela para Graduados. Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC). Total de páginas: 1-14.
- 87)Ohnishi J, Ohnishi E, Shibuya H, Takahashi T.(2005). Functions for proteinases in the ovulatory process. *Biochimica et Biophysica Acta.*; 1751: 95-109.
- 88)Ok Kim, S., Duffy, D., (2016). Mapping PTGERs to the Ovulatory Follicle: Regional Responses to the Ovulatory PGE2 Signal. *Biology Reproduction* (2016) 95 (2): 33: 1-11.
- 89)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.
- 90)Owiny JR, Fitzpatrick RJ. (1990). Effect of intravaginal application of prostaglandin E2 gel on the mechanical properties of the ovine cervix uteri at term. *Am J Obstetrics and Gynecology*. 163: 657 -660.
- 91)Pedram A, Razandi M, Aitkenhead M, Hughes, CCW, Levin ER.(2002). Integration of the non-genomic and genomic actions of estrogen. Membrane-initiated signaling by steroid to transcription and cell biology. *The Journal of Biological Chemistry*. 277: 50768-50775.
- 92)Peter AT, Levine H, Drost M, Bergfelt DR. (2009). Compilation of classical and contemporary terminology used to describe morphological aspects of ovarian dynamics in cattle. *Theriogenology*. 71: 1343-57.

- 93) Pierson RA, Adams GP. (1995). Computer-assisted image analysis, diagnostic ultrasonography and ovulation induction: strange bed fellows. *Theriogenology* 43:105-112.
- 94) Picazo RA, López AS. (1995). Desarrollo folicular en el ovario de la especie ovina. *Investigación Agraria: Producción Sanidad Animal*; 10:77-93.
- 95) Rajkovic A, Pangas SP, Matzuk MM (2006). Follicular Development: Mouse, Sheep, and Human Models. En: Neill J. Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction*. Tercera edición. San Diego: Elsevier. p. 383-423.
- 96) 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. *Biology of Reproduction*. 4: 88-92.
- 97) Reynolds L, Grazul-Bilska A, Redmer D (2000). Angiogenesis in the corpus luteum. *Endocrine*; 12: 1-9.
- 98) Richards JS, Liu Z, Shimada M. (2008). Immune-like mechanisms in ovulation. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 19: 191-196.
- 99) Richards JS, Russell DL, Ochsner S, Espey LL (2002). Ovulation: new dimensions and new regulators of the inflammatory like response. *Annual Review Physiology*. 64: 69-92.
- 100) Rickords L, White K. (1988). Dinoprostone induced cervical dilation in the ewe. *Theriogenology*. 29: 296.
- 101) Robinson JJ, McKelvey WA, King ME, Mitchell SE, Mylne MJ, McEvoy TG, Dingwall WS, Williams LM. (2011). Traversing the ovine cervix - a challenge for cryopreserved semen and creative science. *Animal* 5: 1791-1804.
- 102) Rodríguez Gavancho F, Muscari J, Sacsara R, (2015). Características morfológicas del cuello uterino de la oveja Corriedale. *Spermova* 5 (1): 71-74.
- 103) Rodríguez-Piñón M. (2003). Importancia del cervix ovino como barrera para la Inseminación Artificial. En: Ungerfeld, R. *Reproducción de los Animales Domésticos*. Montevideo, MELIBEA Ediciones, v2, p. 353-364.
- 104) Rodríguez-Piñón M. (2006). Receptores de las hormonas esteroideas sexuales en cervix ovino. Estudios en corderas pre-púberes y en ovejas adultas durante el ciclo estral natural e inducido. Tesis de Maestría. Programa de Postgrados, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República. Montevideo-Uruguay p. 59.

- 105) Rodríguez-Piñón M. (2015). Estudios endócrino-moleculares, histológicos y bioquímicos en el Cérnix ovino durante el Ciclo Estral y el Anestro Estacional. Tesis de Doctorado, Facultad de Veterinaria, Universidad de la Republica. Montevideo-Uruguay.
- 106) Rosell Pardo R, Llorente Villa R., Ramírez Rubio A., Verdecia Rondon M., Hernández Torres E. (2008). Ultrasonografía y su uso en la producción animal. Disponible en: www.produccionanimal.com.ar Fecha de consulta: 19/02/2017
- 107) 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.
- 108) Rubianes E, T Castro, S Kmaid. (1998). Estrus response after a short progesterone priming in seasonally anestrus goats. *Theriogenology* 49: 356-362.
- 109) Russel A, Doney J, Gunn R. (1969). Subjective assessment of body fat in the live sheep. *The Journal of Agriculture and Science*. 72: 451-454.
- 110) Safdarian M, M Kafi, M Hashemi, (2006). Reproductive performance of Karakul ewes following different oestrous synchronization treatment outside the natural breeding season. *South African Journal of Animal Science*. 36: 229-234.
- 111) Salamon S, Maxwell W. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science* 62: 77-111.
- 112) 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. *Human Reproduction*, 25 (4): 969-976.
- 113) Salustri A, Camaioni A, Giacomo MD, Fulop C, Hascall VC. (1999). Hyaluronan and proteoglycans in ovarian follicles. *Human Reproduction Update*. 5: 293-301.
- 114) Sayre BL, Lewis GS. (1996). Cervical dilation with exogenous oxytocin does not affect sperm movement into the oviducts in ewes. *Theriogenology* 45:1523-1533.
- 115) Sayre BL, Lewis GS. (1997). Fertility and ovum fertilization rate after laparoscopic or transcervical intrauterine artificial insemination of oxytocin-treated ewes. *Theriogenology* 48: 267-275.

- 116) Schrick FN, Surface RA, Pritchard JY, Dailey RA, Townsend EC, Inskip EK. (1993). Ovarian structures during the estrous cycle and early pregnancy in ewes. *Biology of Reproduction* 49: 1133-1140.
- 117) Segi E, Haraguchi K, Sugimoto Y, Tsuji M, Tsunekawa H, Tamba S, Tsuboi K, Tanaka S, Ichikawa A. (2003). Expression of messenger RNA for prostaglandin E receptor subtypes EP4/EP2 and cyclooxygenase isozymes in mouse periovulatory follicles and oviducts during superovulation. *Biology of Reproduction* 68: 804-811.
- 118) Senger PL. (2003). Pathways to pregnancy and parturition. Segunda editorial Pullman Current Conceptions. P.1-373.
- 119) Shemesh M, Dombrovski L, Gurevich M, Shore LS, Fuchs AR, Fields MJ. (1997). Regulation of bovine cervical secretion of prostaglandins and synthesis of cyclooxygenase by oxytocin. *Reproduction and Fertility Development*. 9: 525-530.
- 120) Singh J, Adams GP (2000). Histomorphometry of dominant and subordinate bovine ovarian follicles. *The Anatomical Record*. 258: 58-70.
- 121) Singh J, Pierson RA, Adams GP. (1998). Ultrasound image attributes of bovine ovarian follicles and endocrine and functional correlates. *Journal of Reproduction and Fertility*. 112:12-29.
- 122) Singh J, Adams GP, Pierson RA. (2003). Promise of new imaging technologies for assessing ovarian function. *Animal Reproduction Science*.78 (3): 371-399.
- 123) 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. *Animal Reproduction Science* 115: 18 -28.
- 124) Spencer TE, Burghardt RC, Johnson GA, Bazer FW. (2004). Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Animal Reproduction Science*. 82-83: 537-550.
- 125) 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. *Journal of Animal Science* 79: 568-573.

- 126) Suarez G, Zunino P, Carol H, Ungerfeld R, (2001). Evolución de la flora microbiana y caracterización físico-química del flujo generado por el uso de esponjas intravaginales en ovinos. Séptimo congreso Nacional de Veterinaria, noviembre, Montevideo. P. 10-15
- 127) SUL (2016). www.sul.org.uy/descargas/revistas/Ovinos_SUL-nro.174-Noviembre-2016.pdf Fecha de consulta: 05/03/2017.
- 128) Trejo González AA., Toledo Fiallo D., (2007). Efecto de la melatonina y la hormona de crecimiento sobre la actividad gonadal en corderas prepúberes. Vº Congreso de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos, Mendoza, Argentina. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Total de páginas 1-3.
- 129) Ungerfeld, R, Rubianes, E, (1999). Effectiveness of short-term progestogen priming for the induction of fertile oestrus with eCG in ewes during late seasonal anoestrus. *Animal Science* 68:349-353.
- 130) Ungerfeld, R, Rubianes, E, (2001). Corderos tempranos: Estrategia reproductiva que genera nuevas alternativas productivas. *Revista del Plan Agropecuario* 98 p. 19-22.
- 131) Ungerfeld, R (2011). Reproducción en los animales domésticos. Montevideo, MELIBEA Ediciones, v1 p: 43-57.
- 132) Uribe-Velásquez LF, Correa-Orozco A, Osorio JH. (2009). Características del crecimiento folicular ovárico durante el ciclo estral en ovejas. P. 117 – 131.
- 133) Uribe-Velásquez LF, Obab E, MIL Souzac (2008). Población folicular y concentraciones plasmáticas de progesterona (P4) en ovejas sometidas a diferentes protocolos de sincronización, p. 83-87.
- 134) 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.
- 135) 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 Ruminant Research*. 91 (2): 219-224.

- 136) 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.
- 137) 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. P 56.
- 138) Wathes D. C., Ayad V. J., McGoff S. A., Morgan K. L., (1989). Effect of active immunization against oxytocin on gonadatrophin secretion and the establishment of pregnancy in the ewe. *Journal of Reproduction and Fertility*. 86: 653–664.
- 139) Wathes DC, Guldenaar SE, Swann RW, Webb R, Porter DG, Pickering BT. (1986). A combined radioimmunoassay and immunocytochemical study of ovarian oxytocin production during the periovulatory period in the ewe. *Journal of Reproduction and Fertility* 78: 167-183.
- 140) 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.
- 141) Wu WX, Coksaygan T, Chakrabarty K, Collins V, Rose JC, Nathanielsz PW. (2005). Sufficient progesterone-priming prior to estradiol stimulation is required for optimal induction of the cervical prostaglandin system in pregnant sheep at 0.7 gestations. *Biology of Reproduction* 73: 343-350.
- 142) Wulster-Radcliffe MC, Lewis GS. (2002). Development of a new transcervical artificial insemination method for sheep: effects of a new transcervical artificial insemination catheter and traversing the cervix on semen quality and fertility. *Theriogenology* 58: 1361-1371.
- 143) Wulster-Radcliffe MC, Wang S, Lewis GS. (2004). Transcervical artificial insemination in sheep: effects of a new transcervical artificial insemination instrument and traversing the cervix on pregnancy and lambing rates. *Theriogenology* 62: 990-1002.