



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**SUPLEMENTACIÓN PROTEICA-ENERGÉTICA CORTA  
POSTERIOR A UN SERVICIO DE INSEMINACIÓN  
ARTIFICIAL A TIEMPO FIJO EN OVEJAS MERINO**

**Efecto Sobre Pérdidas Reproductivas y Prolificidad del  
Servicio de Repaso**

**MAURO MINTEGUIAGA**

**TESIS DE MAESTRÍA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL**

**URUGUAY  
AÑO 2019**



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**SUPLEMENTACIÓN PROTEICA-ENERGÉTICA CORTA  
POSTERIOR A UN SERVICIO DE INSEMINACIÓN  
ARTIFICIAL A TIEMPO FIJO EN OVEJAS MERINO**

**Efecto Sobre Pérdidas Reproductivas y Prolificidad del  
Servicio de Repaso**

**MAURO MINTEGUIAGA**

**Dr. Julio Olivera DMV PhD.**

**Georgett Banchemo DMV. PhD.**

**Director de Tesis**

**Co-director**

**AÑO 2019**

**INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE  
DEFENSA DE TESIS**

**Presidente: Dra. Raquel Pérez Clariget**

**Segundo miembro: Dra. Carolina Viñoles**

**Tercer miembro: Dra. Gretel Ruprechter**

**AÑO 2019**



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



Facultad de Veterinaria  
Universidad de la República  
Uruguay

Programa de Posgrados

## ACTA DE EXAMEN

**CURSO:** Defensa de Tesis de Maestría

**LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA:** Paysandú, 26 de setiembre de 2019

**TRIBUNAL:** Dra. Raquel Pérez (Presidente), Dra. Carolina Viñoles, Dra. Gretel Ruprechter

CI ESTUDIANTE	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
4.673.043-7	MINTEGUIAGA CARBAJAL, Mauro Andrés	S S S	12

PRESENTADOS	NO PRESENTADOS	APROBADOS	APLAZADOS	INSCRIPTOS
1	0	1	0	1

### TRIBUNAL

Dra. Raquel Pérez (Presidente)

Dra. Carolina Viñoles

Dra. Gretel Ruprechter

### FIRMA

**NOTA:** Las calificaciones de aprobación de la Tesis de Maestría pueden ser:  
B.B.B. - 6 , o S.S.S. - 12

## Agradecimientos

- A la CAMD de Facultad de Veterinaria, por la oportunidad de la realización de un posgrado.
- A Julio, mi tutor, por aceptar el desafío de la realización de este y otros proyectos, por la motivación constante a lograr metas trazadas, su perseverancia y receptibilidad a la hora de generar nuevas ideas y líneas de investigación.
- A Georgett, mi co-tutora, por sus aportes en mi formación, presente y futura.
- A los miembros del tribunal y especialmente a Raquel Pérez Clariget, por su dedicación y considerable aporte en la finalización del presente libro.
- A Sergio Fierro, por su invaluable contribución el presente trabajo. Y por haberme integrado, en aquel lejano 2013 al grupo de trabajo que ahora pertenezco.
- A Jujo Gil, por su presencia y participación en el trabajo de campo.
- A Nicolas Errandonea por su aportes y voluntad en este y tantos otros trabajos.
- A Lourdes Adrien por su colaboración en la realización de los trabajos de laboratorio.
- Al Ing. Martin Claramunt por la colaboración en los muestreos y análisis de pastura.
- A los tesisistas de grado, en especial a Juan Pablo Arbiza quien junto con Luis Alvarenga “aguantaron el temporal” en la suplementación y el trabajo de campo.
- A la Facultad de Veterinaria, mi casa de estudios, lugar de trabajo y formación académica y humana.
- A la familia Errandonea- López por su gran contribución a éste y otras instancias de investigación y formación de profesionales.
- A los compañeros docentes del Departamento de Salud en los Sistemas Pecuarios, en especial a los que formamos el Laboratorio de Reproducción “Dr. Alfredo Ferraris”.
- A Felipe, Dorita y Cecilia.

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES ESPECÍFICOS .....	2
Desarrollo folicular durante el ciclo estral en la oveja .....	2
Inseminación Artificial a Tiempo Fijo (IATF) en ovinos .....	3
Protocolos de IATF en base al uso de PG .....	3
Protocolos de IATF en base al uso de P4 y gonadotrofinas .....	4
Relación entre la reproducción y la nutrición en ovinos .....	4
Suplementación focalizada.....	6
Desarrollo embrionario temprano.....	8
Mortalidad embrionaria en ovinos.....	8
Efecto de la nutrición en el desarrollo embrionario temprano: subnutrición y sobre nutrición.....	9
Producción ovina y estrés .....	10
Estatus metabólico de la oveja durante las primeras etapas de la preñez.....	12
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	15
Hipótesis .....	15
Objetivo general .....	16
Objetivos específicos.....	16
ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN .....	16
MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
Base forrajera.....	17
Animales y manejo sanitario .....	17
Sincronización de estros, servicios de IATF y repaso.....	17
Suplementación preservicio de IATF .....	18
Tratamientos y diseño experimental.....	18
Muestras, registros y determinaciones .....	19
Determinaciones en animales .....	19
Determinaciones en pasturas y suplementos, aporte nutricional.....	19
Determinaciones ambientales .....	20
Determinaciones bioquímicas .....	20
Análisis estadístico .....	21
RESULTADOS .....	23
CONCLUSIONES.....	30
REFERENCIAS .....	31

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
1	Duración de la suplementación, tasa ovulatoria (TO) y cambios en el peso vivo (PV).	6
2	Descripción del mecanismo por el cual el estrés nutricional afecta la reproducción.	11
3	Efecto de los niveles de urea plasmáticos sobre la calidad de los ovocitos y su fertilización	14
4	Cronograma experimental.	21
5	Evolución en la concentración plasmática (medias $\pm$ desvío estándar) de AGNE (Ácidos Grasos No Esterificados), BHB (Betahidroxibutirato), Urea, Albúmina, Proteínas Totales, Albúmina y Colesterol en ovejas multíparas Merino Australiano servidas por IATF vía cervical con semen fresco, pastoreando solo campo natural, o suplementadas con harina de soja entre los Días 8 al 14 respecto a la IATF.	27

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro</b>	<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
I	Distribución de ovejas por grupos y subgrupos a lo largo del experimento.	18
II	Valores de Tasa Ovulatoria (TO) al Día 8, por tratamiento y por tipo de servicio y número de ovejas por TO en ovejas multíparas Merino Australiano pastoreando solo campo natural, o suplementadas con harina de soja los Días 8 a 14 respecto al servicio de IATF.	23
III	Resultados reproductivos en ovejas multíparas Merino Australiano pastoreando solo campo natural, o suplementadas con harina de soja los Días 8 a 14 respecto al servicio de IATF.	24
IV	Resultados reproductivos del servicio de repaso con carneros en ovejas multíparas Merino Australiano pastoreando solo campo natural, o suplementadas con harina de soja los Días 8 a 14 respecto al servicio de IATF.	24
V	Pérdidas reproductivas parciales, totales o retención total de embriones (% de ovejas) hasta el día 60 en ovejas multíparas Merino Australiano servidas por IATF pastoreando sólo campo natural, o suplementadas con harina de soja entre los Días 8 al 14 respecto al servicio de IATF.	25
VI	Tabla de efectos fijos incluidos en el modelo para variables metabólicas	26

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar en ovinos el impacto de una suplementación proteica-energética focalizada aplicada los días posteriores a un servicio de inseminación artificial a tiempo fijo -IATF- (Día= 0), sobre el no retorno al servicio al Día 21 (NR-D21), fertilidad, prolificidad y fecundidad de ambos servicios (IATF y siguiente servicio o de “repaso”). Se seleccionaron 312 ovejas multíparas Merino Australiano en un establecimiento comercial (30° 4'S; 57 °4'O), sobre campo natural (asignación de forraje de 4 kg MS/kg de peso vivo -PV-; PC: 8,2%; FDA: 42,7%; FDN: 71,2%, Cenizas 9,9%), y agua *ad libitum*. Las ovejas fueron sincronizadas con esponjas vaginales impregnadas en medroxiprogesterona aplicadas durante 12 días y eCG a su retiro, suplementadas entre los Días -9 y -3 con harina de soja al 1,2 % del PV (PC: 50,6%; FDA: 11,8%; FDN: 20,2%; Cenizas 5,2), e IATF vía cervical. Al Día 7 se evaluó la tasa ovulatoria (TO) mediante ultrasonografía transrectal. Se conformaron dos grupos en función de la TO, estado corporal (EC) y PV: Control (C; n= 157) y Suplementado (S; n= 155), y dentro de ellos, según retorno o no retorno al servicio dos subgrupos: Suplementado o Control con No Retorno al servicio (C-NR, n=100; S-NR, n=102), y Suplementado o Control con Retorno al servicio (C-R, n=57; S-R, n=53). El grupo S se suplementó nuevamente entre los Días 8 y 14. De 25 ovejas representativas de cada grupo experimental se obtuvieron muestras de plasma sanguíneo los Días 8, 12, 14 y 17 para evaluar el estatus metabólico en cada subgrupo (BHB, AGNE, urea, proteínas totales, albúmina y colesterol). El servicio de repaso se realizó entre los Días 14 y 21 con carneros marcados con tierra de color (NR-D21). Al Día 26 se evaluó TO en las ovejas que tuvieron servicio de repaso, confirmándose fertilidad, prolificidad y fecundidad en ambos servicios al Día 60, mediante ultrasonografía transabdominal. No se observaron variaciones significativas en PV o EC entre grupos o a lo largo del experimento. No se observaron diferencias significativas en el NR-D21 (63,7 vs. 65,8%), fertilidad (62,4 vs. 64,5%), prolificidad ( $1,33 \pm 0,76$  vs.  $1,32 \pm 0,75$  fetos), fecundidad (82,8 vs. 85,2%), o pérdidas embrionarias parciales (18,5 vs. 18,1%) y totales (37,6 vs. 35,5%) al servicio de IATF; o TO ( $1,16 \pm 0,37$  vs.  $1,15 \pm 0,36$  ovulaciones), fertilidad (87,7 vs. 92,4), prolificidad ( $1,00 \pm 0,0$  vs.  $1,02 \pm 0,14$ ) o fecundidad (87,7 vs. 90,6) al servicio de repaso, para grupos C-NR y S-NR, C-R y S-R respectivamente. Los niveles de AGNE estaban incrementados en todas las ovejas al Día 8, la suplementación generó niveles de urea por encima de valores fisiológicos, entre el Día 12 y 14 ( $P > 0,05$ ). Los niveles de los demás parámetros metabólicos no variaron en forma significativa entre grupos y subgrupos ( $P > 0,05$ ). Se concluye que, la suplementación proteica-energética focalizada con harina de soja aplicada posteriormente a un servicio de IATF no ocasiona un incremento en las pérdidas embrionarias de este servicio, pero tampoco incrementa la TO, prolificidad o fecundidad del servicio de repaso.

## SUMMARY

The aim of this experiment was to evaluate the impact of a focus feeding supplementation (protein-energy) applied days prior to the second service of timed artificially inseminated ewes -TAI- (Day=0), the no- return to service to Day 21 (NR-D21), fertility, prolificacy and fecundity of two services. 312 multiparous Merino ewes grazing native pastures (4 kg DM/kg of body weight -BW-; CP: 8.2%, ADF: 42.7%, NDF: 71.2%, Ashes 9.9%), and water *ad libitum* were selected on a commercial farm (-30°44`S; -57.39`W). Ewes were synchronized with progestogens vaginal sponges for 12 days and eCG at withdrawal, supplemented between Days -9 and -3 with soybean meal at 1.2 % of BW (CP 50.6%, ADF: 11.8%, NDF: 20.2%, Ashes 5.2), and cervical TAI (Day 0). At Day 7 post TAI the ovulatory rate (OR) was evaluated by transrectal ultrasonography. Two group was formed based on OR, body condition score (BCS) and BW: Supplement (S; n=155) and Control (C; n=157). Inside group according return to second service or not, two sub-group was formed: Supplement or Control No return to service (C-NR, n=100; S-NR, n=102) or second service pregnant (C-R, n=57; S-R, n=53). The S group was supplemented again between Days 8 and 14 after the TAI. Blood samples were obtained from 25 ewes of each group on Days 8, 12, 14 and 17 to evaluate the sub-group metabolic status (BHB, NEFA, urea, total proteins, albumin and cholesterol). The second service was carried out between Days 14 and 21 with rams marked estimating NR-D21. At Day 26 OR was evaluated in ewes that had second service, confirming fertility, prolificacy and fecundity of TAI and second service on Day 60, by transabdominal ultrasonography. No variations were observed in BW or BC between groups or throughout the experiment. No significant differences were observed in NR-D21 (63.7 vs. 65.8%), fertility (62.4 vs. 64.5%), prolificacy ( $1.33 \pm 0.76$  vs.  $1.32 \pm 0.75$ ), fecundity (82.8 vs. 85.2%), partial (18.5 vs. 18.1%) or total embryo wastage (37.6 vs. 35.5%) at TAI service; or OR ( $1.16 \pm 0.37$  vs.  $1.15 \pm 0.36$ ), fertility (87.7 vs. 92.4), prolificacy ( $1.00 \pm 0.0$  vs.  $1.02 \pm 0.14$ ) or fecundity (87.7 vs. 90.6) to the second service for C and S groups respectively. All NEFA levels were increased at Day 8, in S group the urea level in plasm was increased significantly ( $P > 0.05$ ) between Day 12 and 14. The other metabolic parameters do not variate significantly ( $P > 0.05$ ). We concluded that supplementation with soybean meal before the second service does not cause an increase in the embryonic wastage of the TAI service, but neither increase the prolificacy or fecundity of the second service.

## INTRODUCCIÓN

Desde principios de los años 90, la cantidad de ovinos en Uruguay cayó drásticamente hasta ubicarse en la actualidad en los 6,4 millones de cabezas (DICOSE, 2018). Esta disminución del stock se vio acompañado con una concentración de la producción ovina en suelos de menor aptitud pastoril, como son los de las regiones de Areniscas de Tacuarembó, Cristalino y Basalto (MGAP, 2018). Según encuestas recientes, dos tercios de los productores asentados en esas regiones tienen una tasa de procreo o señalada (corderos señalados/ovejas puestas en servicio) menor al 70% (Gómez Miller, 2017), estos valores se encuentran muy por debajo del potencial de gestaciones múltiples de esta especie (Azzarini, 2000).

Se ha identificado como principales problemas de la cadena agroindustrial ovina uruguaya los bajos índices de producción como ser el porcentaje de destete y la tasa de extracción (Montossi, 2003). En un escenario de competencia del rubro ovino con otras producciones (ganadería bovina y agricultura), es necesario que estos sistemas productivos sean más eficientes y rentables, para ello se deben maximizar los productos de esta especie (carne y lana). Es crucial entonces incrementar el número de corderos que se obtiene por oveja servida, siendo decisivo para ello un mayor número de ovejas gestando mellizos. La mayor disponibilidad de corderos determina mayores ingresos económicos por venta de animales, mayor cantidad de hembras de reemplazo, por ende, una mayor presión de selección, y un aumento en la tasa de extracción (Azzarini, 2000).

Existen diferentes caminos para llegar a un incremento en el número de corderos nacidos por oveja parida. A través de la vía genética (incorporación de cruzamientos prolíficos o maternos; Banchero et al., 2006; Ganzábal et al., 2011) o, sin cambiar de raza, mejorando las condiciones ambientales, en particular la nutrición y el acceso a alimento de superior calidad, lo que llevará al incremento en el peso vivo -PV- o estado corporal -EC- (flushing tradicional), o sin este incremento (suplementación corta o “focalizada”; Martin et al., 2004).

La aplicación “precisa” de suplementaciones cortas o focalizadas durante protocolos de sincronización de estros e inseminación artificial a tiempo fijo (IATF), ha demostrado ser efectiva en incrementar la prolificidad de ese servicio (Errandonea et al., 2018; Olivera- Muzante et al., 2019). Sin embargo, esta importante mejora en la prolificidad del primer servicio termina no teniendo un gran impacto en la prolificidad final (servicio de IATF + servicio de repaso), ya que en el repaso (segundo servicio) la prolificidad volvería a ser la natural de la raza (Errandonea, 2018). Parece de sumo interés entonces, evaluar nuevas alternativas que permitan la obtención de un mayor número de corderos luego de dos servicios. Una de las posibles opciones a explorar sería implementar una nueva suplementación focalizada previa al servicio de repaso, como forma de aumentar también el número de ovejas con carga fetal múltiple en este segundo servicio. Sin embargo, no se conoce si esta suplementación será efectiva en incrementar la prolificidad del servicio de repaso, sin afectar los resultados reproductivos del primer servicio.

## **ANTECEDENTES ESPECÍFICOS**

### **Desarrollo folicular durante el ciclo estral en la oveja**

La oveja es un rumiante poliéstrico estacional, cuyo estímulo para el inicio de la actividad cíclica son cambios ambientales, en particular la disminución de las horas de luz del día, de tal manera que los partos ocurran en estación favorable para la supervivencia de las crías (Ungerfeld, 2002). Durante la estación de cría los ciclos estrales se repiten cada  $17 \pm 3$  días (Durán del Campo, 1980; Senger, 2005). De acuerdo con el tipo de estructuras predominantes en el ovario, el ciclo se divide en dos fases, una luteal (desde el Día 2 o 3 hasta el Día 13; Día 0 = estro), en la cual hay presencia de al menos un cuerpo lúteo (CL), y una fase folicular (desde el Día 13 o 14 hasta el Día 2), en la cual las estructuras predominantes son los folículos (Senger, 2005).

En cada ciclo estral se observan diferentes patrones de crecimiento de los folículos, a estos patrones se les denomina ondas foliculares, el número de ondas foliculares durante el ciclo estral varía entre 2 a 4 (Evans, 2003). Son varios los factores que pueden influir en el número de ondas, dentro de ellos, se destacan la raza (Evans, 2003) y el EC (Viñoles, 2003; Menchaca & Rubianes, 2004). El EC tendría influencia en el número de ondas foliculares (Viñoles et al., 2002), con EC ( $>3$ ) tienden a tener tres ondas, mientras que ovejas en menor condición ( $<3$ ) varía el número de ondas entre dos y tres. A cada onda folicular la precede un aumento en la concentración de hormona folículo estimulante (FSH) que estimula el desarrollo y crecimiento de varios folículos pequeños, este es el origen del reclutamiento y emergencia de la onda. De la nueva onda, uno o más folículos alcanzarán un diámetro  $\geq 5$  mm, a una tasa de crecimiento de 1 mm/día (Evans et al., 2002; Viñoles et al., 2002).

El mecanismo por el cual ocurre la selección folicular se basa en la respuesta diferencial de los folículos dentro de una misma onda a la hormona luteinizante (LH) y FSH (Adam, 1999), uno de los folículos se volverá independiente de la FSH y será capaz de continuar su crecimiento con LH (folículo dominante). A medida que aumenta el tamaño, se incrementa la secreción de estradiol, androstenediona e inhibina, esto originará una caída en los niveles de FSH circulante (Souza et al., 1998), lo que finalmente limita el número de folículos que ovularán (Baird, 1983).

La cantidad de ovocitos ovulados puede estimarse mediante el conteo indirecto de CL por ecografía (Viñoles et al., 2010), determinándose lo que se conoce como tasa ovulatoria (TO). El número de ovocitos liberados en cada ciclo estral está relacionado a factores intrínsecos de la oveja (raza, biotipo, edad, PV, EC), así como también a condiciones ambientales (nutrición, estación reproductiva). En el caso de ovulaciones múltiples, los ovocitos liberados pueden provenir de la última y penúltima ondas de desarrollo folicular (Noakes, 2009).

## **Inseminación Artificial a Tiempo Fijo (IATF) en ovinos**

A pesar de las múltiples bondades de la técnica de inseminación artificial (IA) en ovinos (Faigl et al., 2012; Gibbons et al., 2019), y del amplio conocimiento de ésta por parte de los productores (Gómez Miller, 2017), sólo el 4,1% de los productores dedicados a la cría comercial en Uruguay la utilizan (MGAP, 2018). De esta manera, el nivel de aplicación actual en el país no sobrepasa el 6 - 7% de las hembras ovinas en servicio (Fernández Abella & Villegas, 2015). De las ovejas inseminadas en nuestro país, la amplia mayoría (85%) se insemina con semen fresco, mientras que el resto (15%) se insemina con semen congelado (Fernández Abella & Villegas, 2015).

La IA tradicional de 35 días de duración (dos ciclos estrales), trae aparejado una potencial disminución del estatus sanitario y nutricional, y en consecuencia de la fertilidad de los animales, básicamente por un incremento en los movimientos y manejos de la majada (Menchaca & Rubianes, 2004; Olivera & Gil, 2005). Para disminuir los frecuentes manejos, se han generado dos alternativas: 1) La presincronización de estros por aplicación de prostaglandina F<sub>2α</sub> o sus análogos sintéticos (PG) y posterior monta natural o IA a estro natural detectado (Viñoles et al., 2005; Banchemo et al., 2012) o, 2) La utilización de la IATF, que consiste en realizar la IA sin necesidad de detección de estro. Esta biotecnología presenta ventajas de manejo (menor movimiento de animales), sanitarias (menor probabilidad de transmisión de enfermedades infectocontagiosas), y económicas (costo en genética, necesidad de personal y costos implícitos; Menchaca & Rubianes, 2004; Olivera-Muzante, 2018; Gibbons et al., 2019). Para que un programa de IATF tenga éxito, se deben agrupar las ovulaciones de manera que al momento de realizar la inseminación la mayoría de las ovejas estén próximas a ovular. Se identifican dos grandes tipos de protocolos de sincronización hormonal de estros y ovulación en la hembra ovina para realizar IATF: el uso de progesterona o progestágenos sintéticos (P4) asociados a gonadotrofinas, o el uso de PG (González- Bulnes et al., 2020).

### **Protocolos de IATF en base al uso de PG**

Desde hace mucho tiempo se conoce el efecto luteolítico de la PG (McCracken et al., 1970). Teniendo en cuenta este efecto, y la temprana sensibilidad del CL a la PG en la oveja (Rubianes et al., 2003), se generó en el país un protocolo denominado Synchronvine®, con la administración de dos dosis de PG separadas tan solo siete días (Menchaca & Rubianes, 2004). Este protocolo, a pesar de causar gran sincronía de estros y ovulaciones, posee escasa fertilidad (Olivera- Muzante et al., 2011; Viñoles et al., 2011), lo que disminuyó su aplicación. La fertilidad y/o la prolificidad no aumentó ni con suplementaciones cortas (Fierro et al., 2014). Para incrementar la fertilidad cuando se usan protocolos a base de PG, se planteó incrementar el intervalo entre las dos dosis (entre 14 y 16 días), con lo que se lograron resultados aceptables de fertilidad (Fierro et al., 2016; Fierro et al., 2017). A pesar de ser más económico, práctico y generar menos residuos biológicos, que las alternativas tradicionales disponibles (P4 + gonadotrofinas) (Olivera- Muzante, 2018), esta alternativa es aun escasamente implementada (González- Bulnes et al., 2020).

## **Protocolos de IATF en base al uso de P4 y gonadotrofinas**

Este método es el más utilizado a nivel comercial para la sincronización de estros e IATF y tiene como fundamento simular una fase luteal de duración normal (Gordon, 1983; Fernández Abella & Villegas, 2015; González- Bulnes et al., 2020). Posee la ventaja de poder ser usado tanto en anestro como en la estación reproductiva (Menchaca & Rubianes, 2004). La forma de aplicación más frecuente es con dispositivos intravaginales con P4, asociados a tratamientos con gonadotrofinas al momento de retirar los mismos, con el fin de obtener una sincronía entre la ovulación y la IA. La gonadotrofina más utilizada es la coriónica equina (eCG), cuya dosis varía entre 200 y 500 UI dependiendo del momento del año y la raza (Abecia et al., 2012). El tiempo de permanencia del dispositivo en la oveja puede variar, según se trate de protocolos “largos” (12 a 14 días) o “cortos” (5 a 7 días). Si bien no se observan diferencias en fertilidad ni prolificidad entre ambos protocolos, los cortos son más adaptables a eventuales cambios, pero requieren una dosis de PG para la lisis de CL aún presentes (Menchaca et al., 2009). La IA se debe realizar entre 48 a 60 horas luego de retirado el dispositivo liberador de P4, dependiendo de la vía de IA utilizada (cervical o intrauterina), y del tipo de preservación del semen utilizada (Cognie et al. 1970; Colas et al. 1973; Colas et al. 1974).

## **Relación entre la reproducción y la nutrición en ovinos**

El número de corderos por oveja parida es lo que se denomina “prolificidad”, y es dependiente del número de ovulaciones al momento del servicio (Bancharo & Quintans, 2005). La TO está determinada genéticamente, existiendo biotipos que en forma pura o cruza poseen mayor TO, la expresión de este potencial genético está limitada por varios factores, siendo los principales el fotoperiodo, la nutrición y el estrés (Lindsay et al., 1993; Viñoles, 2003; Viñoles et al., 2009; Scaramuzzi et al., 2011).

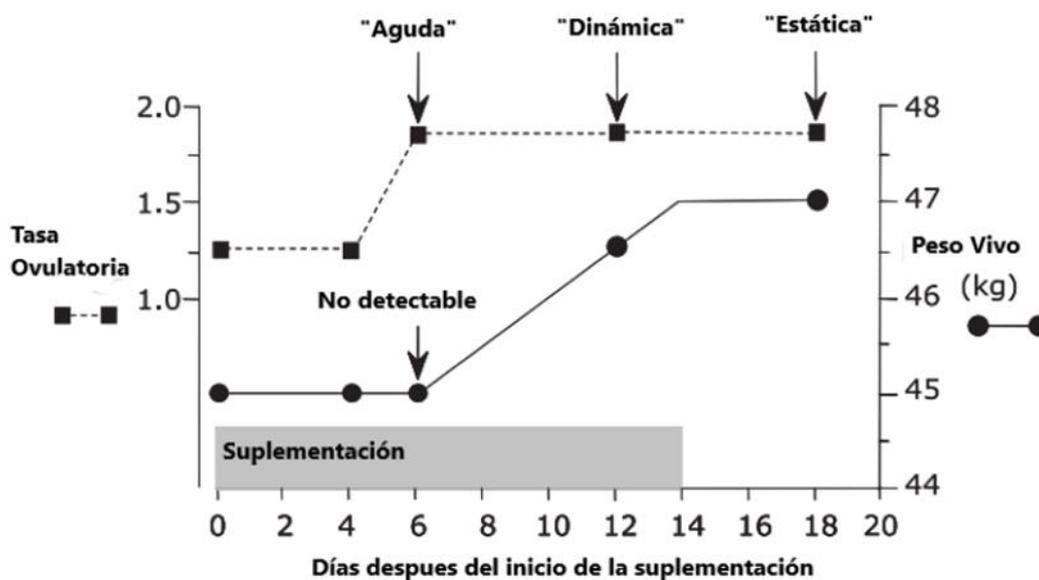
La nutrición se relaciona con la reproducción a través del balance energético (relación entre la energía consumida y la energía requerida). Cuando el balance energético resulta positivo (saldo positivo entre consumo y requerimientos), las concentraciones de insulina, leptina, glucosa, IGF-I y triacilglicéridos se incrementan, estimulando la foliculogénesis por acción directa sobre el ovario (Scaramuzzi et al., 2006; Scaramuzzi et al., 2011; Viñoles et al., 2012). Por otra parte, en situaciones de subnutrición, cuando el balance energético es negativo parte de la energía necesaria para el mantenimiento del animal se obtiene a partir de sus reservas corporales, disminuyendo el EC y se incrementan las concentraciones sanguíneas de ácidos grasos no esterificados (AGNE; Sosa et. al, 2006) y de GH (hormona del crecimiento, Scaramuzzi et al., 2010).

Según la información nacional e internacional, la nutrición puede incidir en la reproducción por tres caminos diferentes de acuerdo si se asocian o no a cambios en el PV y/o EC de la hembra. Es lo que se denomina efecto “estático”, “dinámico” e “inmediato” de la nutrición (Figura 1). Es así como, al momento del servicio ovejas con mayor PV, y que lo mantienen constante tendrán mayores TO comparado con ovejas de menor PV, en lo que se denomina “efecto estático” del PV (Downing &

Scaramuzzi, 1991). Se estiman incrementos en la TO del orden de 1,1 a 1,7% por cada kg de PV adicional al peso crítico al servicio en animales de la misma raza (Kelly & Croker, 1990; Ganzábal et al., 2003).

En condiciones nutricionales donde el PV y el EC aumenten en las semanas previas al servicio se observan también incrementos en la TO y/o prolificidad (efecto dinámico o “flushing”; Uriarte et al., 1988; Smith & Stewart, 1990). Reportes nacionales indican que es posible utilizar este mecanismo tanto con pasturas sembradas de buena calidad (principalmente leguminosas; Uriarte et al., 1988; Fernández Abella et al., 2005; Viñoles et al., 2009) como con concentrados. La suplementación diaria de ovejas pastoreando campo natural con niveles de inclusión de 125 gr de proteína digestible (400 gr de harina de soja por oveja y por día), durante tres semanas (dos antes del inicio del servicio y una posterior) generó incrementos de la prolificidad del entorno del 12%, con relación a ovejas no suplementadas (Esponda, Itzaina y Ramos, 2016). En síntesis, el flushing por al menos tres semanas, genera un incremento en la prolificidad final obtenida. A nivel metabólico, tanto la suplementación energético-proteica con ingredientes ricos en carbohidratos, lípidos y proteína (semilla de algodón, grano de soja), al 0,5% del PV durante tres semanas, o el acceso a pasturas mejoradas por al menos 30 días, repercute en los niveles séricos de metabolitos energéticos y/o proteicos, y eleva el EC, mejorando los indicadores reproductivos (Uriarte et al., 1988; Macedo et al., 2018). Ese incremento en la TO conseguida se debe a que se incrementan las concentraciones de FSH circulante (que estimula el crecimiento de los folículos), como también un incremento en el número de folículos que responden, y que son dependientes de esta hormona (Scaramuzzi et al., 2011).

Finalmente se identifica un tercer efecto de la nutrición denominado “inmediato” o “agudo”, que consiste en el incremento significativo del plano nutricional durante pocos días previo al servicio, sin modificación del PV ni EC de las ovejas, lográndose también un incremento en la TO. Esto ha sido denominado suplementación corta o “focalizada” (Viñoles et al., 2005).



**Figura 1.** Duración de la suplementación, tasa ovulatoria (TO) y cambios en el peso vivo (PV). Existen tres alternativas nutricionales para aumentar la TO: 1) la suplementación focalizada con efecto “agudo o inmediato”, generada por un alimento de muy buena calidad durante pocos días, y sin modificación del PV; 2) la suplementación “dinámica”: más prolongada en el tiempo, y con aumento del PV; y 3) la “estática”: sin suplementación, observada en ovejas que llegan al servicio con mayor PV, pero sin cambios en este. Modificado de Scaramuzzi et al., 2006.

### Suplementación focalizada

La suplementación focalizada consiste en generar incrementos significativos en TO suplementando por tan solo 4 a 6 días, sin alterar el PV o EC (Stewart & Oldham, 1986; Downing et al. 1995; Viñoles, 2003). Requiere el uso de alimentos con buenos aportes de energía y proteína (Smith, 1985; Teleni et al. 1989; Scaramuzzi et al., 2010, Dupont et al., 2014). No hay consenso si es la proteína o la energía la que explica la respuesta en TO o si es la sinergia de ambos (Scaramuzzi et al., 2010; Dupont et al., 2014). El incremento en la TO no se debería a estímulos hormonales sino al efecto de los nutrientes sobre el ovario, en particular la glucosa (Downing et al., 1995).

El período de suplementación necesario dependerá del tipo de alimento que se considere. Para pasturas de buena calidad se necesitan al menos 12 días de pastoreo para incrementar el tamaño de camada (Viñoles et al., 2009). El acceso de ovejas de raza Corriedale de dos variedades (prolíficas y no prolíficas), por 20 días a un mejoramiento con lotus *Maku*, produjo un incremento en la TO y en el porcentaje de ovejas con gestaciones múltiples. Tal incremento se generó por la ingestión de aproximadamente 246 gr de proteína cruda (PC) /día, sin incrementos significativos en el EC (Fernández Abella et al., 2005). De manera similar, Robertson et al. (2014), permitiendo el acceso de ovejas no sincronizadas a pasturas de buena calidad (alfalfa), desde una semana antes del ingreso de carneros al servicio, hasta una semana después, reporta incrementos del número de corderos obtenidos del orden de 21 puntos

porcentuales, con relación al grupo que consume pasturas de menor calidad (pastura fibrosa). En síntesis, para realizar una suplementación focalizada usando pasturas, se requiere al menos de 12 días, mientras que, con la administración de concentrados energéticos (grano de maíz) o energético-proteicos (harina de soja, grano de lupino), se observan efectos en la TO a partir de los 4-6 días (Scaramuzzi et al., 2006; Banchemo et al., 2006; Viñoles et al., 2009; Habibizad et al., 2015). Dentro de este tipo de concentrados la harina de soja, con su elevado nivel de PC (mínimo 45% del peso seco) y energía metabolizable (EM; 3,0 Mcal/kg; Mieres, 2004) es de las opciones más eficaces en elevar la TO (Banchemo et al., 2006; Viñoles et al., 2009; Banchemo et al., 2012). A esa calidad nutricional, hay que agregar que es un producto seguro, que no genera acidosis, siendo de fácil acceso comercial a los productores, de allí su elección.

Al tratarse de una suplementación tan corta, el momento en la que se realiza es clave para lograr el efecto deseado. Si la suplementación se efectúa a comienzos del ciclo estral, desde el Día 1 al 4 (fase folicular y fase luteal temprana), aun con niveles de energía por encima de los requerimientos de mantenimiento (1,25 veces), no se logra mejorar la TO (Senosy et al., 2013). Para lograr este efecto, el suplemento debe de ser suministrado hacia el final del ciclo estral, previo a la luteólisis y emergencia de la última onda folicular (Smith & Stewarth, 1990; Downing et al., 1995). Suplementaciones en este momento consiguen incrementos en TO de hasta un 37%, con mayor proporción de ovulaciones dobles (Nottle et al., 1988).

Esta suplementación ejerce su efecto a través de hormonas metabólicas a nivel ovárico (sin modificación de los niveles de FSH a diferencia del flushing tradicional), la magnitud de la respuesta será en función del número de folículos disponibles. En tal sentido, ovejas con alto EC tienen un mayor número de folículos capaces de responder (dependientes de gonadotrofinas) que ovejas bajas en EC (Rhind & McNeilly, 1986; Rhind et al., 1989; Xu et al., 1989, Viñoles et al., 2002). A pesar de todas estas consideraciones, sólo responden a la suplementación focalizada e incrementan la TO y/o prolificidad entre el 30 y 50% de las ovejas tratadas (Scaramuzzi et al., 2011).

Por otra parte, para que una suplementación focalizada sea efectiva en el mayor número de ovejas es necesario sincronizar los ciclos estrales, lo que permitiría una mayor "precisión" en la aplicación del estímulo nutricional (Robinson et al., 2006). Esto sería posible a través de una presincronización de los estros (usando una o dos dosis de PG), o mediante la sincronización de los estros (usando protocolos en base a PG o P4+eCG). La asociación de la sincronización de estros con doble dosis de PG separadas 15 días, y una suplementación focalizada con harina de soja aplicada entre los Días -7 y -3 (Día 0= IATF), ha demostrado ser eficaz en incrementar la prolificidad y fecundidad al servicio de IATF (Errandonea et al., 2018). Sin embargo, la adición de harina de soja a protocolos de P4 + eCG parece ser más efectiva en incrementar la prolificidad, que la alcanzada con el protocolo de doble dosis de PG separadas 15 o 16 días (Olivera- Muzante et al., 2019), contrarrestando quizás con suplementación las mayores pérdidas reproductivas observadas con el protocolo de P4+eCG (Fierro & Olivera- Muzante, 2017). Con el interés de generar una mayor respuesta en

prolificidad a través de la suplementación focalizada, este protocolo sería el de elección.

### **Desarrollo embrionario temprano**

Una vez ocurrida la fertilización del ovocito en el oviducto, se produce la fusión de los pronúcleos del macho y hembra, formándose el cigoto (Senger, 2005). Al cuarto día de la fecundación el embrión arriba al útero en estado de mórula (16 a 32 células; Spencer et al., 2004). La nutrición del embrión a partir de este momento depende de las secreciones de las glándulas uterinas (Noakes, 2009). Al día seis se genera el blastocito, que desde el día 11 se elonga (por estímulo de la progesterona), en un proceso fundamental para el reconocimiento maternal de la gestación y la producción de interferón tau (IFN- $\tau$ ; Spencer et al., 2004). La secreción de IFN- $\tau$  actúa de forma paracrina impidiendo la luteólisis al inhibir la producción de PG en el endometrio (Senger, 2005). En ovejas que hayan reconocido la gestación, a partir del día 12 se triplica la afluencia de glucosa y nutrientes hacia la luz uterina (Gao et al., 2009). Desde el día 16, el trofoblasto se adhiere al endometrio comenzando la implantación (Spencer et al., 2004).

### **Mortalidad embrionaria en ovinos**

La mortalidad embrionaria puede causar una disminución significativa de la performance reproductiva de las ovejas (Wilkins & Croker, 1990). Conceptualmente se define como la pérdida de los embriones generados entre la concepción y el fin de la diferenciación embrionaria (35 a 40 días de gestación). En base al momento en el que ocurran, se puede clasificar las pérdidas embrionarias en tempranas (entre la concepción y el día 20), y las tardías (entre el día 21 y el día 40 de gestación; Fernández Abella & Villegas, 2015).

Edey (1969), sugiere que en promedio entre el 20 y el 30% de los embriones se pierden en el primer mes de gestación, y que las pérdidas posteriores a este período son relativamente pequeñas. Willingham et al. (1986), en un estudio llevado a cabo en zonas ovejeras de los Estados Unidos de Norteamérica a lo largo de diez años, concluye que la magnitud de las pérdidas entre la ovulación y la implantación puede ser hasta el 33,5% de los embriones potenciales, observándose mayor proporción de pérdidas en ovejas que tienen una TO mayor a dos. En resumen, la mayoría de las pérdidas ocurrirían antes del día 20 de gestación (Wilkins & Croker, 1990). El momento de la pérdida incidirá en el desempeño reproductivo de la hembra. Si la muerte embrionaria acontece antes del inicio del reconocimiento materno de la gestación, la duración del ciclo estral no se verá afectada, sin embargo, si la muerte es posterior, habrá un aumento en el intervalo entre estros (Fernández Abella & Villegas, 2015).

Varios factores pueden disminuir la supervivencia de los embriones, incluyendo defectos cromosómicos, defectos de los gametos, el genotipo, TO de las ovejas, consumo de plantas tóxicas, desequilibrios y deficiencias hormonales, niveles nutricionales, localización del embrión, fotoperiodo, estrés, parasitosis gastrointestinales, enfermedades infecciosas y el manejo de la majada durante el

servicio (apartes, encierres frecuentes, movimientos en horas de calor; Wilkins & Croker, 1990; Fernández Abella & Villegas, 2015).

### **Efecto de la nutrición en el desarrollo embrionario temprano: subnutrición y sobre nutrición**

Durante este período, tanto la subnutrición como la sobre nutrición puede tener efectos sobre el desarrollo de los embriones. Abecia et al. (1997), trabajando con ovejas Rasa Aragonesa con tres niveles nutricionales (restricción, restricción más proteína, y sin restricción) desde el Día -14 al día 7 respecto a la ovulación, concluyen que el nivel nutricional no tuvo efecto en la tasa de preñez. Sin embargo, en el mismo estudio encuentra que los embriones de ovejas sometidas a un régimen de restricción nutricional tuvieron un retraso en el desarrollo con respecto a embriones de ovejas sin restricción. En el mismo sentido Rhind et al. (1989), concluyen que niveles nutricionales por debajo de los requerimientos después del servicio comprometen la tasa de crecimiento embrionario, e inducen a una mayor tasa de pérdidas embrionarias. Abecia et al. (1999), reportan que embriones de ovejas subnutridas tienen menor producción de IFN- $\tau$ , lo que generaría un incremento en la concentración de PG endometrial y por ende una menor fertilidad. En síntesis, hay evidencias de que las pérdidas por subnutrición pueden estar relacionadas con la alteración en los niveles de hormonas metabólicas, con el crecimiento e implantación del embrión o con modificaciones en el ambiente uterino (Viñoles et al., 2005; Sosa et al., 2006).

Por otra parte, la sobrealimentación también puede tener efectos perjudiciales para la preñez. Parr et al. (1987) evidencian que una sobrealimentación al doble de los requerimientos energéticos y proteicos entre el día 2 al 14 después de la monta afectó el porcentaje de ovejas que quedaban preñadas, mientras que los niveles de alimentación bajos y medios no generaron disminución en la preñez. Sin embargo, la suplementación no generó alteraciones en la prolificidad de las ovejas, independientemente del nivel de alimentación implementado. Se plantea que la sobrealimentación produciría una disminución de las concentraciones de progesterona en sangre periférica. El *clearance* (metabolización) de la progesterona se produce a nivel hepático e intestinal, donde se remueve el 96% de la progesterona que llega. Asimismo, el flujo de sangre que llega al hígado está relacionado con el nivel de alimentación, es así como dietas al doble de mantenimiento incrementan la perfusión, acelerando el metabolismo de la progesterona (Parr et al., 1993). De esta manera, un incremento en el plano nutricional podría significar una disminución de la concentración de progesterona y una menor tasa de preñez.

El incremento en el plano nutricional durante la primera semana después del servicio no parece generar un incremento en las pérdidas embrionarias. Esponda, Itzaina y Ramos (2016), suplementando ovejas Corriedale diariamente con harina de soja a razón de 400 gr diarios, desde dos semanas antes al inicio de la monta hasta una semana después, no observaron incrementos en las pérdidas embrionarias. En el mismo sentido, Robertson et al. (2015a), alimentando “*ad libitum*” ovejas Merino con alfalfa, hasta siete días posteriores a la inseminación, observan que no se reduce la proporción de ovejas con preñeces múltiples. Sin embargo, la prolongación del plano alimenticio elevado hasta el día 17 pos-servicio, redujo la proporción de ovejas con

preñeces múltiples, en comparación con ovejas alimentadas a mantenimiento (Robertson et al., 2015b).

El porcentaje de inclusión de proteína en la dieta podría estar relacionado con las pérdidas embrionarias en las primeras etapas de la gestación. Niveles de suplementación del 44% de PC en la dieta por 45 días (30 antes y 15 posteriores al inicio del servicio), generarían una menor tasa de concepción, menor número de embriones por un menor pH uterino, en comparación a ovejas suplementadas con el 24% de PC (Meza- Herrera et al., 2010).

### **Producción ovina y estrés**

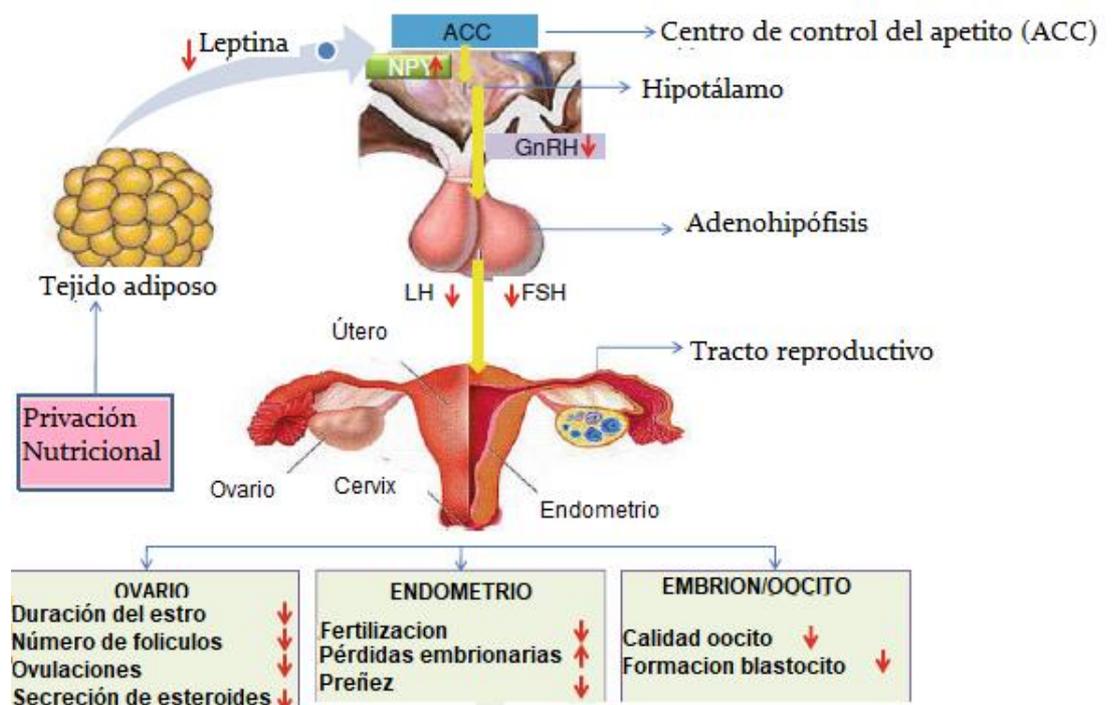
La producción ovina uruguaya se desarrolla a cielo abierto, los ovinos están expuestos a condiciones ambientales adversas (viento, lluvias y variaciones de la temperatura ambiente), lo que provoca diferentes respuestas del animal frente a estos estímulos nocivos (Saravia & Cruz, 2003). El estrés ambiental no se limita a las condiciones climáticas, ya que cualquier situación que obligue al animal a adaptarse supone un factor de estrés, por ejemplo, la nutrición, el encierro, largas caminatas, manejos prolongados (Naqvi et al., 2012).

Todas las especies de mamíferos poseen una zona térmica de confort en la cual no es necesaria una alteración del metabolismo para mantener la temperatura interna constante, en el ovino adulto con vellón varía entre 7 a 20°C, superada la misma se ponen en marcha diferentes mecanismos de adaptación (aumento de frecuencia respiratoria, vasodilatación periférica, sudoración y jadeo). La redistribución del flujo sanguíneo reduce el volumen de sangre hacia el tracto reproductor, llegando a generar disturbios endócrinos (Saravia y Cruz, 2003). En un reporte sobre IA en ovejas lecheras de España, se demostró que la temperatura ambiental puede afectar la fertilidad, teniendo un efecto diferente según se trate de verano o invierno, en verano son las altas temperaturas las que causan este efecto, mientras que en invierno (ovejas servidas a contra estación) son las bajas (Palacios & Abecia, 2015). Esta disminución de la fertilidad podría explicarse por embriones de pobre calidad comparada con otras ovejas sin estrés (Naqvi et al., 2012). No es claro si esta situación puede darse en las ovejas en Uruguay. Se ha reportado en nuestro país que temperaturas ambientales por encima de los 32°C causan bajas tasas de concepción (Fernández Abella, 1993).

Las precipitaciones elevadas también pueden afectar la reproducción dependiendo del momento en el que ocurran. Las lluvias intensas en los cinco o seis días previos al servicio reducen considerablemente la TO (Doney et al., 1973). La ocurrencia de lluvias abundantes (mayores a 100 mm) inhibe el comportamiento de estro, así como también aumentaría la mortalidad embrionaria cuando las mismas ocurren tres días luego del servicio (Doney et al., 1973). Es posible que las precipitaciones induzcan una respuesta de estrés en la oveja. Más allá de que pueda haber múltiples causas de estrés, la respuesta de la oveja es similar, las neuronas productoras de GABA (ácido gama aminobutírico) del hipotálamo se activan (ver Figura 2), inhibiendo la secreción de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), pudiendo llegar a bloquear el pico preovulatorio y por ende la ovulación (Sliwowska et al., 2006; Dobson et al., 2012). En condiciones de estrés, se elevan las

concentraciones de cortisol que entre otros efectos estimula la neoglucogénesis hepática a partir de precursores no carbohidratos (entre ellos betahidroxibutirato –BHB–), pero no se producirían alteraciones en las concentraciones de proteínas séricas, colesterol y urea (Maurya et al., 2012).

El estrés nutricional es otro de tipo de estrés a los que están sometidos los rumiantes en pastoreo. Puede deberse a situaciones de carencia forrajera (sequías, heladas, sobrepastoreo, sobrecarga, variaciones de la producción estacional), o imposibilidad de las ovejas a acceder al alimento (Navqui et al., 2012). La hormona proteica leptina es la encargada de realizar el “diálogo” entre el tejido adiposo y el aparato reproductor, indicándole si hay suficientes recursos disponibles para encarar la función reproductiva. Existen receptores a esta hormona en el hipotálamo, adenohipófisis, células de la granulosa, células de la teca y células intersticiales del ovario, en el endometrio y en células de Leydig (Moschos et al., 2002). La disminución del nivel de leptina en sangre genera apetito a la oveja, que incrementa la búsqueda de alimento (Chilliard et al., 2005). La presencia de los receptores cambiaría de acuerdo con el estatus nutricional, ya que restricciones cortas previas a la encarnada altera los niveles de receptores en las células de la granulosa y ovocito (Pisani et al., 2008).



**Figura 2.** Descripción del mecanismo por el cual un estrés nutricional afecta la reproducción. El factor de estrés actúa a nivel del hipotálamo, disminuyendo los pulsos de GnRH y también en la glándula adrenal estimulando la liberación de cortisol (que puede llevar a detener la ovulación o impedir la implantación del embrión en hembras o reducir la producción de testosterona y afectar la libido en machos). Baja la pulsatilidad de LH y FSH, que reduce el número de folículos en desarrollo, mientras que también afecta el endometrio, haciendo el ambiente más hostil para los embriones, los cuales disminuyen la calidad y demora su desarrollo. La privación nutricional (imposibilidad de acceso o poca cantidad de alimento)

*disminuye la secreción de leptina, lo que induce a la oveja a buscar alimento. Modificado de Navqui et al., 2012.*

### **Estatus metabólico de la oveja durante las primeras etapas de la preñez**

En condiciones de manejo extensivo, durante la gestación temprana puede ocurrir un desmejoramiento en el estado nutricional evidenciable a través de pérdidas de PV o EC, pero es importante que éstas ocurran de forma gradual y no excedan el 3 a 4% del PV al momento del servicio, o alrededor de 0,25 puntos de EC (Russel, 1984).

El principal indicador del estatus energético de un animal es la concentración de glucosa. Sin embargo, en los rumiantes existen mecanismos para el mantenimiento de este metabolito dentro del rango fisiológico, de esta manera, la disminución de la glucosa en rumiantes solo se vería en condiciones graves. Para evitar esa limitante, se utilizan como indicadores del metabolismo energético a los AGNE y al BHB (Contreras et al., 2000). Durante las etapas temprana y media de la gestación las concentraciones de AGNE son más representativas del estatus metabólico, mientras que en la preñez tardía los cuerpos cetónicos son los más representativos (Russel, 1984).

La movilización de las reservas corporales que se producen como consecuencia de un balance energético negativo en rumiantes (demanda no compensada con la ingesta), se asocia a disminución de las concentraciones sanguíneas de glucosa e insulina y elevación de metabolitos como los AGNE provenientes del tejido adiposo, que se usan como fuente de energía en la  $\beta$ - oxidación. También se activan vías hepáticas secundarias, formándose cuerpos cetónicos como BHB, y la formación y almacenamiento hepático de colesterol (Abdelli et al., 2017).

### **Ácidos Grasos No Esterificados**

En rumiantes los AGNE son sintetizados principalmente en el tejido adiposo (Bruss, 2008). En animales sanos se encuentran bajos niveles de AGNE en sangre. Cuando las concentraciones de AGNE comienzan a aumentar es indicativo de lipólisis, la que ocurre en respuesta a un incremento en las demandas energéticas no compensado (Farman et al., 2016). En respuesta a este balance energético negativo, los animales hidrolizan tejido adiposo desde sus reservas corporales en forma de AGNE, mediante la intervención de una lipasa sensible a hormonas. El principal estímulo para la movilización de reservas corporales es la baja concentración de glucosa e insulina en sangre (Herdt & Emert, 1992; Farman et al., 2016). Sin embargo, se ha reportado que, en situaciones de estrés, la liberación de catecolaminas induciría también a un aumento en los AGNE (González, 2000). El aumento de los niveles de AGNE podría actuar directamente sobre los ovocitos y los embriones (Farman et al., 2016). Debido a la insolubilidad en agua, estos compuestos deben unirse a proteínas para ser transportados por sangre, su principal transportador es la albúmina (Farman et al., 2016). El valor de referencia en plasma de AGNE en ovejas es de menos de 0,8 mmol/l, valores superiores indican movilización de las reservas (Contreras et al., 2000).

## Betahidroxibutirato

En la mayoría de los animales, existen compuestos denominados cuerpos cetónicos (acetona, acetoacetato y BHB), este último en particular en rumiantes tiene dos orígenes, se genera en la mucosa del rumen a partir del ácido butírico, uno de los tres ácidos grasos volátiles producidos durante la fermentación ruminal (propiónico, acético y butírico; Ramírez Lozano, 2017). Si bien el ácido butírico puede ser usado como combustible por casi cualquier célula del organismo, no ocurre lo mismo con el BHB, que sólo puede ser usado por células musculares (Nelson & Cox, 2008).

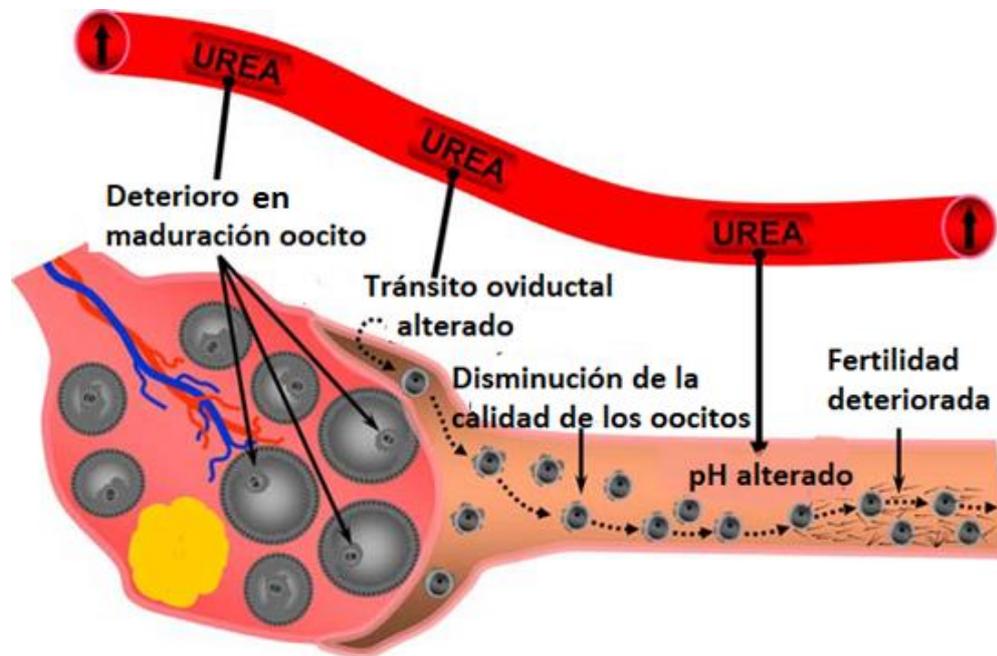
El valor de referencia en plasma de este metabolito en ovejas es de menos de 0,6 mmol/l. Valores superiores indican movilización de las reservas corporales (Contreras et al., 2000). En el mismo sentido, Merck (2011) menciona que ovejas normales tienen concentraciones de BHB menores a 0,8 mmol/l, ovejas con cetosis subclínica entre 0,8 y 3 mmol/l, y ovejas con cetosis clínica mayores a 3 mmol/l. Por consiguiente, el límite normal inferior del metabolito se encontraría entre los 0,6 y 0,8 mmol/l. El incremento de los niveles plasmáticos de BHB en consecuencia a un estrés metabólico tiene un impacto negativo tanto en ovario como en útero, disminuyendo la fertilidad (Farman et al., 2016).

## Urea

Las fuentes de nitrógeno (N) en los rumiantes incluyen ácidos nucleicos, aminoácidos, proteínas, péptidos, aminos, nitratos, urea y amoníaco (Huntington & Archibeque, 1999). En el rumen gran parte de las proteínas rápidamente degradables son transformadas durante la fermentación microbiana en amonio y amoníaco. Luego de la ingestión de alimento rico en N, rápidamente se elevan las concentraciones de amonio en sangre por su capacidad de ser absorbido por la pared ruminal. El rumen tiene la capacidad de transformar hasta el 98% del N ingerido en amonio (Noro & Wittwer, 2012), y una vez que llega al hígado es transformado en urea como parte del proceso de detoxificación del amonio y amoníaco (Huntington & Archibeque, 1999).

El valor de referencia de urea plasmática es de entre 4,0 y 10,0 mmol/l. Valores inferiores indican déficit de proteína en la dieta, mientras que la elevación de los niveles de urea en plasma se produce por una mayor ingestión de proteína que los requerimientos (el doble o más de las necesidades), por ingestión de urea adicionada a los suplementos, o proveniente de la saliva (Contreras et al., 2000). Luego de la ingestión de grandes cantidades de proteína, la urea plasmática se eleva dentro de las 48 horas siguientes a casi el doble de los niveles basales (Berardinelli et al., 2001). La suplementación de ovejas con urea no provoca cambios a nivel de la TO, independiente del nivel de urea incorporado en la dieta (24 o 48 gr por día), pero genera mayores niveles de urea y amoníaco en plasma y en útero (Bishonga et al., 1996; McEvoy et al., 1997). Este tipo de dietas acelerarían el tránsito del cigoto, lo que hace que ingrese en el útero antes, con un ambiente progesterónico no adecuado, y con un pH alterado por el nivel de amonio en útero (Berardinelli et al., 2001). De esta forma, las pérdidas embrionarias reportadas por Bishonga et al. (1996), McEvoy et al. (1997) y Robertson et al. (2015), serían ocasionadas por la acción directa de los metabolitos del catabolismo proteico (urea y amoníaco) sobre los ovocitos y los

embriones (McEvoy et al., 1997; Farman et al., 2016; Velázquez, 2011; ver Figura 2 y 3). Los embriones más sensibles a la acción de estos metabolitos son aquellos provenientes de ovejas que reciben además un bajo aporte energético (Papadopoulos et al., 2001).



**Figura 3.** Efecto de los niveles de urea plasmática sobre la calidad de los ovocitos y su fertilización. Se describen tres efectos del incremento en los niveles de urea plasmática con consecuencias en la calidad y/o en la fertilización: alteración de la maduración de los ovocitos durante las etapas finales de la foliculogénesis, alteración del tránsito oviductal, y alteración del pH oviductal. Modificado de Velázquez, 2011.

#### Proteínas plasmáticas

Uno de los indicadores del estatus proteico en los animales son las proteínas totales. El valor de referencia para las proteínas totales se encuentra entre los 66 y 90 g/l (Contreras et al., 2000). La disminución de las proteínas totales en plasma está relacionada con deficiencias proteicas de la alimentación, esto ocurre en dietas con menos del 10% de PC (Kaneko et al., 2008). Dentro de las proteínas séricas, la más importante de ellas es la albúmina, que participa en el transporte de metabolitos. Para ovejas en las condiciones del Uruguay, se han establecido como niveles normales valores de entre 33 y 38 g/l (Uriarte et al., 1988).

#### Colesterol

El colesterol es un lípido que se encuentra únicamente en los animales, como constituyente de las membranas celulares y los tejidos. Es sintetizado a partir de Acetil-coA, un precursor sencillo (Nelson & Cox, 2008) y es precursor de hormonas esteroideas (a través de la pregnenolona), vitamina D y ácidos biliares (Bruss, 2008). En la gestación de la oveja, el colesterol actúa como sustrato para los esteroides producidos primero por el CL y después por la placenta (Zywicki et al., 2018).

Las dietas energéticas en ovejas son capaces de alterar la concentración de colesterol en sangre, así lo demuestra Habibizad et al. (2015), que evaluando dos tipos de suplementaciones (cortas de 6 días o largas de 16 días; energética o proteico-energética) observó elevaciones en las concentraciones plasmáticas de colesterol en las ovejas alimentadas *ad libitum* con dieta de alta energía (3 Mcal/kg). Los valores de referencia para la especie son entre 1,40 y 2,40 mmol/l (Zywicki et al., 2018). El colesterol se incrementa debido a ingestas de grandes cantidades de grasas, enfermedad hepática o biliar (Merck, 2011).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

La mejora en el nivel nutricional a través de la suplementación focalizada es una de las alternativas más naturales para incrementar la prolificidad en ovejas (sin uso de hormonas), menor costo y alto impacto (Martin et al., 2004). Para aumentar la eficiencia y disminuir los costos de la suplementación es necesario la sincronización de estros en las ovejas. La asociación de suplementación focalizada e IATF logra incrementar la TO y prolificidad en ovinos (Errandonea et al., 2018; Olivera- Muzante et al., 2019). Sin embargo, se observa que la mejora en la prolificidad no se mantiene hasta el servicio de repaso (segundo servicio dado a las ovejas), en donde se vuelve a los valores medios de prolificidad de la raza utilizada (Errandonea, 2018). En consecuencia, el impacto se restringe a aquellas ovejas que se preñen en el primer servicio.

Con el objetivo final de tener el mayor número de ovejas gestantes con carga fetal múltiple y aprovechando la sincronización de estros espontáneos que ocurre durante el servicio de repaso posterior a una IATF, parece interesante suplementar las ovejas en forma focalizada también previo a este servicio. Sin embargo, y como ya se revisó, debería de tenerse en cuenta que altos niveles de proteína y/o energía administrados con la suplementación focalizada los días previos al comienzo del servicio de repaso (días 8 a 14 posteriores al servicio de IATF), en momentos claves del reconocimiento materno de la gestación, podrían ser perjudiciales para el mantenimiento de la preñez en ovejas gestantes (principalmente a través de la acción de metabolitos del catabolismo proteico). En resumen, no se conoce si una suplementación proteica-energética focalizada previo al servicio de repaso (por ejemplo, con harina de soja), logra incrementar su prolificidad, sin generar pérdidas de los embriones ya generados en el primer servicio, por variación en los niveles plasmáticos de urea u otros metabolitos.

### **Hipótesis**

La hipótesis de trabajo fue que una suplementación proteica-energética focalizada en ovinos aplicada los días posteriores a un servicio de IATF disminuye la supervivencia de los embriones generados en este servicio por incremento en los niveles plasmáticos de urea, pero aumenta la prolificidad del servicio de repaso.

### **Objetivo general**

El objetivo general de este trabajo fue aumentar los resultados de prolificidad del servicio de repaso de un servicio de IATF en ovejas, mediante el uso de una suplementación proteica-energética focalizada aplicada los días previos a este.

### **Objetivos específicos**

Evaluar el impacto de esta suplementación sobre:

a) La tasa de no retorno al estro al día 21 (NR-D21), la prolificidad, fertilidad, fecundidad y pérdidas reproductivas hasta el día 60 del servicio de IATF.

b) La TO, prolificidad, preñez, fecundidad y pérdidas reproductivas del servicio de repaso.

c) Los niveles plasmáticos de metabolitos: NEFA, BHB, urea, proteínas totales, albúmina y colesterol.

## **ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN**

A los efectos de dar respuesta a los objetivos generales y específicos del proyecto se realizó un experimento en que se utilizaron ovejas a las que se les aplicó suplementación focalizada, sincronización de la ovulación e IATF, y posteriormente se suplementó en forma similar, o no, antes del servicio de repaso sin conocer el estatus reproductivo que tenían (gestantes o no). Se realizaron determinaciones de variables reproductivas, y se determinó la concentración de metabolitos en sangre en una muestra representativa de ovejas.

El experimento se desarrolló en un establecimiento comercial, departamento de Artigas, Uruguay (30,4° S - 57,4° O), durante la estación reproductiva (marzo-junio). Todos los procedimientos experimentales empleados fueron aprobados por la Comisión de Ética en el Uso de Animales de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la Republica, Uruguay (CEUA-FVet-UdelaR, protocolo N° 329).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Base forrajera

Se dispuso de un potrero de campo natural de 16,5 ha sobre suelos de basalto medio. Restringido al pastoreo ovino por tres meses. Las ovejas pastorearon como un único lote durante todo el experimento a excepción de los días de nutrición diferencial, donde el potrero fue dividido en dos. Se ofreció libre acceso al agua mediante bebederos.

### Animales y manejo sanitario

Se utilizaron un total de 328 ovejas multíparas de raza Merino Australiano, de 2,5 a 5,5 años de edad, acostumbradas al consumo de suplementos, con un EC de  $2,9 \pm 0,2$  (escala de 1 a 5; Russel et al., 1969), y  $40,9 \pm 4,9$  kg de PV (media  $\pm$  desvío estándar) al inicio del experimento. El cronograma del experimento se presenta en la Figura 4.

Las ovejas fueron destetadas dos meses antes del inicio del experimento, evaluadas reproductivamente, y calificadas como clínicamente aptas. Un mes previo al inicio del tratamiento de sincronización de la ovulación, todas las ovejas recibieron tratamiento preventivo contra ectoparásitos (balneación), fueron dosificadas contra nemátodos gastrointestinales, inmunizadas contra enfermedades clostridiales. Durante todo el experimento las ovejas fueron monitoreadas sanitariamente (conteo de huevos de parásito por gramo de materia fecal -HPG- y visualización de mucosas).

Se emplearon 10 carneros adultos raza Merino Dohne para los servicios de IATF y el repaso, evaluados reproductivamente, calificados como clínicamente aptos con serología negativa a *Brucella ovis*, adiestrados a la extracción de semen mediante la técnica de vagina artificial (Evans & Maxwell, 1990). El manejo sanitario fue similar al de las ovejas.

### Sincronización de estros, servicios de IATF y repaso

A todas las ovejas se les sincronizó el estro utilizando pesarios intravaginales (esponjas) conteniendo 60 mg de medroxiprogesterona (Progespon®, Laboratorio Syntex, Uruguay) rociadas previo a su colocación con Oxitetraciclina líquida para disminuir ocurrencia de adherencias y/o vaginitis (50 mg/pesario aproximadamente; Terramicina 100®; Laboratorio Zoetis, Uruguay). Las esponjas permanecieron *in situ* por 12 días (Días -14 a -2; Día 0= IATF), y a su retiro se inyectó eCG (380 UI/oveja im; Novormon 5000®; Syntex, Uruguay), y una dosis de PG (DL-Cloprostenol, 125 µg/oveja im; Estrumate®, Laboratorio Schering-Plough, Alemania), para asegurar luteólisis de CL remanentes.

La IATF se realizó a las  $52 \pm 2$  horas de retiradas las esponjas. Se utilizó semen heteroespérmico fresco de los 10 carneros, diluido en leche descremada UHT +

antibiótico (Enrofloxacin 10% Baytril® Laboratorio Bayer; 250 mg por L). Se utilizó un volumen de inseminación de 0,15 ml/oveja (semen más diluyente), y una dosis aproximada de 130 millones espermatozoides vivos, evaluada por medio de microscopio óptico (Wild Heerbrugg M11®, Suiza) y fotómetro (Photometer SDM 1®, Minitube, Alemania), según Evans & Maxwell (1990). La IATF fue realizada por vía cervical según Durán del Campo (1980), por dos técnicos entrenados usando vaginoscopio y pistola de inseminar (Walmur®, Montevideo, Uruguay).

El servicio de repaso se realizó entre los Días 14 y 21, por monta natural a campo de los mismos carneros (2,5 carneros/100 ovejas), pintados con tierra de color y grasa, que ingresaron de forma progresiva en respuesta al incremento de ovejas que repetían estro, registrándose diariamente las ovejas que tuvieron un servicio de repaso y apartándose del grupo.

### **Suplementación preservicio de IATF**

Se suplementó a todas las ovejas con harina de soja durante cinco días (al 1,2% del PV promedio/oveja/día; Días -7 a -3 inclusive) previos al servicio de IATF para aumentar su respuesta ovulatoria (Olivera-Muzante et al., 2019). Se hizo una fase de adaptación incremental al suplemento durante dos días (0,5 y 1,0 % del PV promedio/oveja/día, Días -9 y -8 respectivamente). La suplementación fue ofrecida en horas de la mañana, en comederos colectivos lineales ubicados dentro del potrero, con 0,4 m de frente de ataque por animal, permitiendo el acceso simultáneo de todas las ovejas. Se midió rechazo del suplemento, no registrándose remanentes en ningún momento.

### **Tratamientos y diseño experimental**

Las ovejas fueron asignadas al azar (sin conocimiento de su estatus reproductivo resultante del servicio de IATF), teniendo en cuenta su TO su EC y PV, a dos tratamientos: a) Grupo Suplementado (S; n= 155): ovejas que reciben una suplementación con harina de soja (1,2% del PV promedio/oveja/día) durante 6 días comenzando el Día 8 pos IATF (Días 8 al 14 inclusive), con una readaptación a su consumo el día previo (1,0 % del PV promedio/oveja/día). La forma de aportar el suplemento fue similar a la descrita antes; b) Grupo Control (C; n= 157): ovejas que se mantuvieron sin suplemento antes del servicio de repaso. Una vez finalizado el repaso, se pudo identificar ovejas con y sin retorno al servicio dentro de cada grupo. De esta forma se conformaron cuatro subgrupos (ver Cuadro I).

Cuadro I. Distribución de ovejas por grupos y subgrupos a lo largo del experimento.

<b>Grupo</b>	<b>Subgrupo</b>	<b>Sigla</b>	<b>n</b>
Control (C)	Ovejas que No retornan al servicio	C-NR	100
	Ovejas que Retornan al servicio	C-R	57
Suplementado (S)	Ovejas que No retornan al servicio	S-NR	102
	Ovejas que Retornan al servicio	S-R	53

*n: número de ovejas*

Dentro de cada grupo original (C y S) se seleccionaron 25 ovejas representativas, a las cuales se les extrajo una muestra de sangre sin ayuno previo por punción de la vena yugular los Días 8, 12, 14 y 17, para evaluar su estatus metabólico a través de la evolución de parámetros bioquímicos. La sangre fue dispuesta en tubos con heparina sódica y centrifugados a 3000 rpm por 10 m para la obtención de plasma. La muestra fue congelada a -20°C y almacenada en el Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal (LEMA) de Facultad de Veterinaria-UdelaR (sede Paysandú) hasta su procesamiento.

## **Muestreos, registros y determinaciones**

### Determinaciones en animales

El PV se evaluó en dos momentos, inicio y fin del experimento (Día -26 y 21, respectivamente), con ayuno nocturno, utilizando balanza electrónica (NQ&F® monitor AD-4406, Japón). Se determinó EC los Días -26, -2 y 21 por un operador entrenado, según técnica descrita por Russel et al. (1969). Se determinó TO en dos momentos, al Día 7 en todas las ovejas y al Día 26 en ovejas que tuvieron servicio de repaso, mediante ultrasonografía transrectal (ecógrafo Pro Sound Aloka® y transductor lineal 7,5 MHz, Japón; según Viñoles et al., 2010). El diagnóstico de gestación fue realizado al Día 60, mediante ecografía transabdominal (ecógrafo Pro Sound Aloka® y transductor convexo 3,5 MHz, Japón).

Se evaluó en cada grupo (S y C) el porcentaje de no retorno al servicio desde el Día 14 al 21 post IATF (ovejas que no retornan al servicio/ovejas inseminadas \*100; NR-D21). Se determinó en cada grupo la fertilidad (ovejas gestantes/total de ovejas servidas \*100), prolificidad (fetos/ovejas gestantes) y fecundidad (fetos/total de ovejas servidas \*100), para el servicio de IATF y de repaso respectivamente.

Se asume que todos los CL visualizados de forma indirecta con la ecografía al Día 7 tuvieron origen en un ovocito que fue fertilizado en el servicio de IATF, según Viñoles et al. (2012). Se asume que las ovejas que no repiten estro al Día 21 (no marcadas por los carneros) estaban gestantes a ese momento, y que las ovejas que repiten estro antes del Día 21 estaban vacías, y sobre ellas se realizó la ecografía de TO el Día 26. Las diferencias que pudieran ocurrir entre la última TO de la oveja y el número de fetos observados a la ecografía al Día 60 son reflejo de las pérdidas de embriones-fetos ocurridas entre el reconocimiento materno de la gestación y la ecografía. Se define que una retención “total” de fetos ocurre cuando la TO es igual a la carga fetal, una pérdida “parcial” cuando la TO es mayor a la carga fetal, y una pérdida “total” cuando no se observa ningún feto a la ecografía.

### Determinaciones en pasturas y suplementos, aporte nutricional

La disponibilidad del campo natural fue evaluada los Días -14 y 26 según la técnica de “doble muestreo” (Haydock & Shaw, 1975). La calidad del campo natural y el suplemento proporcionado (MS, PC, FDA y FDN) fue analizada según el porcentaje de MS, en el Laboratorio de Nutrición Animal de INIA “La Estanzuela”.

El contenido de EM se estimó según el método de AOAC (1984). La asignación de forraje fue de 4 kg de MS/100 kg de PV (disponibilidad inicial de 3092 kg/ha de MS; PC: 8,2%; FDA: 42,7%; FDN: 71,2%, Cenizas 9,9%). El aporte de la pastura estimado por oveja fue 111 gr PC y 2,45 Mcal EM. La calidad del suplemento fue evaluada en el mismo laboratorio y con la misma metodología (PC: 50,6%; FDA: 11,8%; FDN: 20,2%; Cenizas 5,2%). Se estimó que durante los días de suplementación las ovejas consumieron una dieta con 240 gr de PC y 2,83 Mcal/oveja/día de EM.

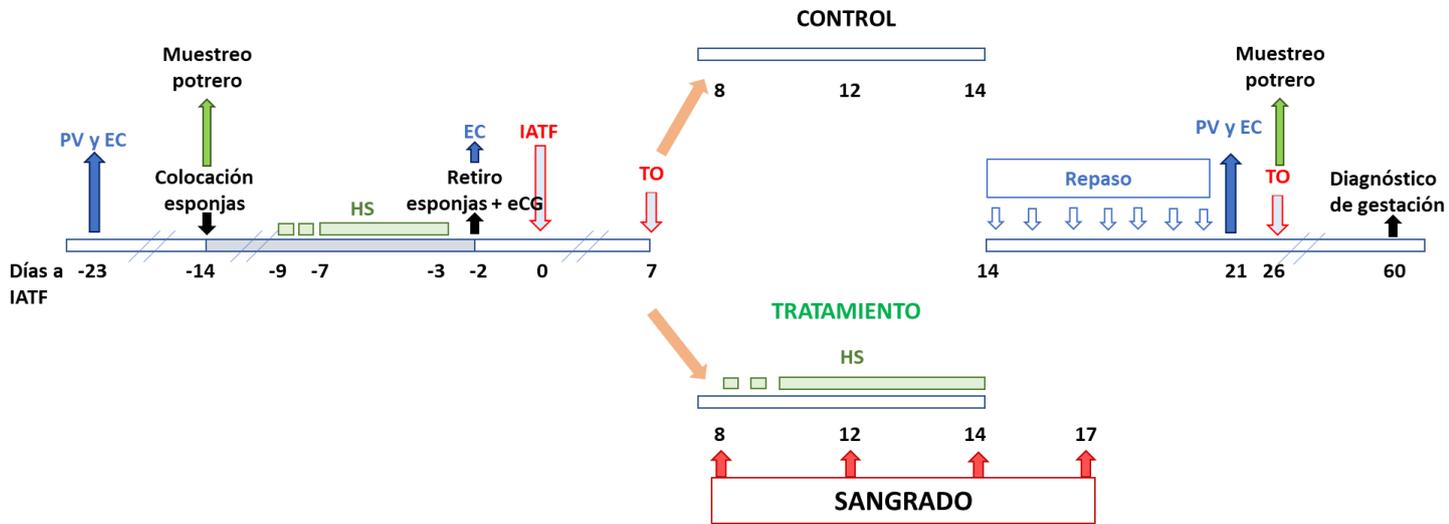
#### Determinaciones ambientales

Se realizaron mediciones de pluviometría diaria por observación manual (pluviómetro Walmur ®, Montevideo, Uruguay). Durante el experimento se registraron lluvias por un total de 735 mm, con un acumulado de 392 mm entre los Días -13 a -3, y 310 mm entre los Días 2 y 9, con un registro máximo el Día 9, con 110 mm.

#### Determinaciones bioquímicas

Las variables evaluadas fueron consideradas por su vínculo con el estatus metabólico de las ovejas y/o con la suplementación realizada. Los momentos de muestreos fueron elegidos por estar próximos a eventos claves en la reproducción y suplementación (Día 8: comienzo de la suplementación, 12: reconocimiento materno de la gestación, 14: fin de la suplementación, y 17: fase folicular en ovejas no gestantes del servicio de IATF). Los metabolitos se analizaron en un equipo multianalizador (Selectra 2 ®; Vital Scientific, Dieren, Holanda). Se evaluó AGNE (método colorimétrico enzimático; NEFA-HR2, Wako Chemicals, Richmond, Estados Unidos), BHB (método enzimático; RANBUT®, Randox Laboratories Ltd., Crumlin, Reino Unido), urea (método UV cinética, Wiener Lab. MT, Ingbert, Alemania), proteínas totales (método colorimétrico: Wiener Lab. MT, Ingbert, Alemania), albúmina (método colorimétrico; Wiener Lab. MT, Ingbert, Alemania), y colesterol (método enzimático; Wiener Lab. MT, Ingbert, Alemania). La precisión de todos los métodos bioquímicos realizados se llevó a cabo con suero control y calibrador comercial de los respectivos fabricantes. Los coeficientes de variación fueron 1,9; 9,2; 9,7; 4,3; 4,6 y 4,6%, y 1,9; 19,2; 8,3; 3,4; 8,1; y 16% inter e intra-análisis para AGNE, BHB, urea, proteínas totales, albúmina, y colesterol respectivamente.

**Figura 4.** Cronograma del experimento.



*PV y EC: evaluación de peso vivo y estado corporal. Muestreo potrero: calidad y disponibilidad. Colocación de esponjas: introducción de esponjas intravaginales con Medroxiprogesterona. HS: harina de soja. Retiro de esponjas + eCG: retiro de esponjas intravaginales + gonadotropina coriónica equina. IATF: inseminación artificial a tiempo fijo. TO: ecografía ovárica transrectal. Control: ovejas a campo natural. Suplementado: ovejas suplementadas con harina de soja entre los Días 8 y 14. Sangrado: extracción de sangre los Días 8, 12, 14 y 17. Repaso: servicio de repaso con carneros marcadores pintados con grasa y tierra de color. Diagnóstico de gestación: ecografía transabdominal para evaluar respuesta reproductiva al servicio de IATF y de repaso. Día 0= IATF.*

### **Análisis estadístico**

Variables categóricas como el NR-D21, fertilidad, pérdidas reproductivas parciales, totales, prolificidad y fecundidad fueron analizadas con un modelo mixto generalizado y comparadas mediante las pruebas de Chi Cuadrado o Brown (Brown, 1988).

Se usó el software estadístico Infostat® basado en el procedimiento gls de R®. Variables discretas como el EC y continuas como el PV fueron analizados mediante análisis de varianza y comparación de medias (test de Tukey).

Se realizó un análisis univariado para cada uno de los metabolitos (urea, AGNE, BHB, proteínas totales, albúmina y colesterol) estudiados para identificar outliers. Las concentraciones de los metabolitos fueron analizadas usando mediadas repetidas en el tiempo, modelando la correlación como autorregresivo continuo de orden 1 (AR-1). El modelo incluyó, como efectos fijos el servicio (gestante o vacía), la

suplementación (suplementada o control) y sus interacciones, y el Día de suplementación (Día 8, 12, 14 o 17), siendo la oveja (unidad experimental) el efecto aleatorio.

Modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \delta_{ij} + \gamma_k + \lambda_{ms} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

$\mu$ : representa la media general

$\alpha_i$ : efecto del i-ésimo grupo

$\beta_j$ : efecto del j-ésimo día

$\delta_{ij}$ : efecto de la interacción entre el i-ésimo grupo y el j-ésimo día

$\gamma_k$ : efecto de la k-ésima oveja dentro de cada grupo

$\lambda_{ms}$ : covarianza de medidas sucesivas en el mismo animal (repetidas en el tiempo)

$\varepsilon_{ijk}$ : error experimental

Las medias fueron comparadas con test de Tukey, y los valores de P fueron corregidos por Sidak para minimizar error tipo I. Para todos los resultados, el nivel de significancia fue  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS

De las 328 ovejas iniciales se retiraron del experimento 16 por diferentes causas (dos por adherencia de esponjas intravaginales; 6 ovejas sin ovulaciones visibles al Día 7; y 8 presentaron más de tres ovulaciones). De esta forma el grupo **C** quedó con 157 ovejas y el **S** con 155.

Los factores estudiados tratamiento (**C** o **S**) o retorno o no retorno al servicio no afectaron el EC ni el PV ( $P > 0,05$ ). La interacción entre estos dos factores no fue significativa ( $P > 0,05$ ).

En el cuadro II se presentan los valores de TO al Día 7 y el número de ovejas según tipo de ovulación (simple, doble o triple) para cada grupo (**C** o **S**) y subgrupo (**C-NR**, **C-R**, **S-NR** o **S-R**). Se observó que las ovejas **C-NR** tuvieron una mayor TO ( $P < 0,05$ ) que las del subgrupo **C-R** explicable principalmente por el mayor número de ovejas con ovulaciones triples, el 8% de las ovejas **C-NR** ovularon triple mientras que en el **C-R** fueron 1,57%.

**Cuadro II.** Valores de Tasa Ovulatoria (TO) y número de ovulaciones (simples, dobles o triples) por grupo y subgrupo, en ovejas multíparas Merino Australiano servidas por IATF vía cervical con semen fresco (Día 0) pastoreando solo campo natural (Control; **C**), o suplementadas con harina de soja entre los Días 8 al 14 (Suplementado; **S**).

Grupo	Subgrupo (n)	TO	Ovulaciones (n)		
			Simple	Doble	Triple
Control	C-NR (100)	1,66 ± 0,62 a	42	50	8
	C-R (57)	1,40 ± 0,53 b	35	21	1
	media ± DE	1,57 ± 0,60	77	71	9
Suplementado	S-NR (102)	1,61 ± 0,57 ab	44	54	4
	S-R (53)	1,49 ± 0,61 ab	30	20	3
	media ± DE	1,57 ± 0,58	74	74	7

*Subgrupo: ovejas que no retornan al servicio (-NR) o que sí retornan al servicio con carneros (-R). n= número de ovejas, TO: tasa ovulatoria (CL/oveja ovulada), Ovulaciones= número de ovejas con ovulación simple, doble o triple, evaluadas al Día 7 (IATF) por ecografía transrectal. Día 0=IATF. a, b:  $P < 0,05$ .*

En el cuadro III se presentan los resultados reproductivos del servicio de IATF. De las 312 ovejas, 110 fueron marcadas por los carneros durante el servicio de repaso, por lo que se asume que las mismas no se preñaron al servicio de IATF (falla en el reconocimiento materno con pérdida total de embriones). Estas cifras indican que en el promedio de ambos grupos (**C** y **S**), se logró un NR-D21 del 64,7%. También se observó que cuatro ovejas (dos de cada grupo) no repitieron estro, pero fueron diagnosticadas como sin gestación en la ecografía al Día 60. En este caso, debemos pensar que estas ovejas perdieron el/los fetos luego del reconocimiento materno de la gestación, lo que imposibilitó que obtuvieran servicio de repaso.

**Cuadro III.** Resultados reproductivos en ovejas multíparas Merino Australiano servidas por IATF vía cervical con semen fresco (Día 0) pastoreando solo campo natural (Control; C), o suplementadas con harina de soja entre los Días 8 al 14 (Suplementado; S).

Grupo (n)	NR-D21 (%)	Fertilidad (%)	Prolificidad	Fecundidad (%)
Control (157)	63,7 a (100/157)	62,4 a (98/157)	1,33 ± 0,76 a	82,8 a
Suplementado (155)	65,8 a (102/155)	64,5 a (100/155)	1,32 ± 0,75 a	85,2 a

*NR-D21: porcentaje de no retorno al servicio al Día 21 evaluada desde el Día 14 al 21 con carneros pintados (ovejas no retornadas/total de servidas \*100). Fertilidad (ovejas gestantes/total de servidas \*100), Prolificidad (fetos/oveja gestante) y Fecundidad (fetos/total de ovejas servidas \*100) evaluadas al Día 60 por ecografía vía abdominal. n: número de ovejas. Día 0= IATF. a, b: P < 0,05.*

En el cuadro IV se muestran los resultados reproductivos del servicio de repaso. No se observan diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) para ninguna de las variables analizadas. No se encontraron diferencias significativas en la TO del servicio de repaso (C-R vs. S-R) ( $P > 0,05$ ).

**Cuadro IV.** Resultados reproductivos del servicio de repaso con carneros en ovejas multíparas Merino Australiano pastoreando solo campo natural (Control con retorno al servicio; C-R), o suplementadas con harina de soja entre Días 8 a 14 (Suplementado con retorno al servicio; S-R).

Subgrupo (n)	TO	Fertilidad (%)	Prolificidad	Fecundidad (%)
C-R (57)	1,16 ± 0,37 a	87,7 a	1,00 ± 0,00 a	87,7 a
S-R (53)	1,15 ± 0,36 a	90,6 a	1,02 ± 0,14 a	92,4 a

*Subgrupo: ovejas que retornan al servicio con carneros (-R). C-R: ovejas grupo Control que retornan al servicio con carneros; S-R: ovejas grupo Suplementado que retornan al servicio con carneros; TO: tasa ovulatoria (CL/oveja ovulada); Fertilidad (ovejas gestantes/total servidas \*100), Prolificidad (fetos/oveja gestante) y Fecundidad (fetos/total de ovejas servidas \*100) evaluadas al Día 60 por ecografía vía abdominal. n: número de ovejas. Día 0= IATF. a, b: P < 0,05.*

En el cuadro V se presentan las pérdidas reproductivas acontecidas entre el último servicio de la oveja (IATF o Repaso) y la ecografía al Día 60. No se observan diferencias significativas entre subgrupos ( $P > 0,05$ ) para ninguna de las variables presentadas en ambos servicios. En el servicio de repaso se encontró una mayor retención total de embriones, y menores pérdidas parciales y totales, atribuibles quizás a que a diferencia del servicio de IATF realizado con sincronización hormonal, este se realizó por monta natural sobre estro natural.

**Cuadro V.** Pérdidas reproductivas parciales, totales o retención total de fetos (% de ovejas) hasta el Día 60 en ovejas multíparas Merino Australiano pastoreando solo campo natural (Control; C), o suplementadas con harina de soja entre los Días 8 a 14 (Suplementado; S).

Grupo	Subgrupo	n	Pérdidas (%)		Retención Total (%)
			Parciales	Totales	
<b>Control</b>	C-NR	100	18,5	37,5	43,9
	C-R	57	10,5	12,3	77,2
<b>Suplementado</b>	S-NR	102	18,1	35,5	46,5
	S-R	53	13,5	9,4	77,4

*Control: ovejas grupo no Suplementado (C); Suplementado: ovejas grupo Suplementado (S); Subgrupo C-NR: ovejas grupo Control que no retornan al servicio con carneros; C-R: ovejas grupo Control que retornan al servicio con carneros; S-NR: ovejas grupo Suplementado que no retornan al servicio con carneros; S-R: ovejas grupo Suplementado que retornan al servicio con carneros. n: número de ovejas. Pérdidas parciales: mayor TO que embriones a la ecografía al Día 60 (% de ovejas). Pérdidas totales: 1, 2 o 3 fetos ausentes en ovejas con ovulación simple, doble o triple respectivamente (% de ovejas). Retención total (ovejas que no tuvieron pérdidas): igual TO que fetos al Día 60 (% de ovejas). Día 0= IATF. a, b: P < 0,05.*

Luego de dos servicios (IATF + Repaso), no se observaron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre grupos **C** y **S** en fertilidad (94,3 vs. 95,5), prolificidad ( $1,22 \pm 0,44$  vs.  $1,22 \pm 0,45$ ) o fecundidad final (114, 6 vs. 116,8).

En el cuadro VI se presentan la tabla de efectos fijos incluidos en el modelo estadístico del análisis de metabolitos. Sólo se observó efecto del tratamiento (Suplementación) sobre los niveles de urea y albúmina ( $P < 0,05$ ): El efecto del Día de muestreo fue significativo para AGNE y urea, lo que indica que estos valores variarían en función del Día que se obtuvo la muestra: claramente en la urea por efecto del tratamiento, mientras que en los AGNE por un incremento en sus niveles en los días previos al inicio del tratamiento diferencial.

## Cuadro VI. Efectos fijos incluidos en el modelo para variables metabólicas

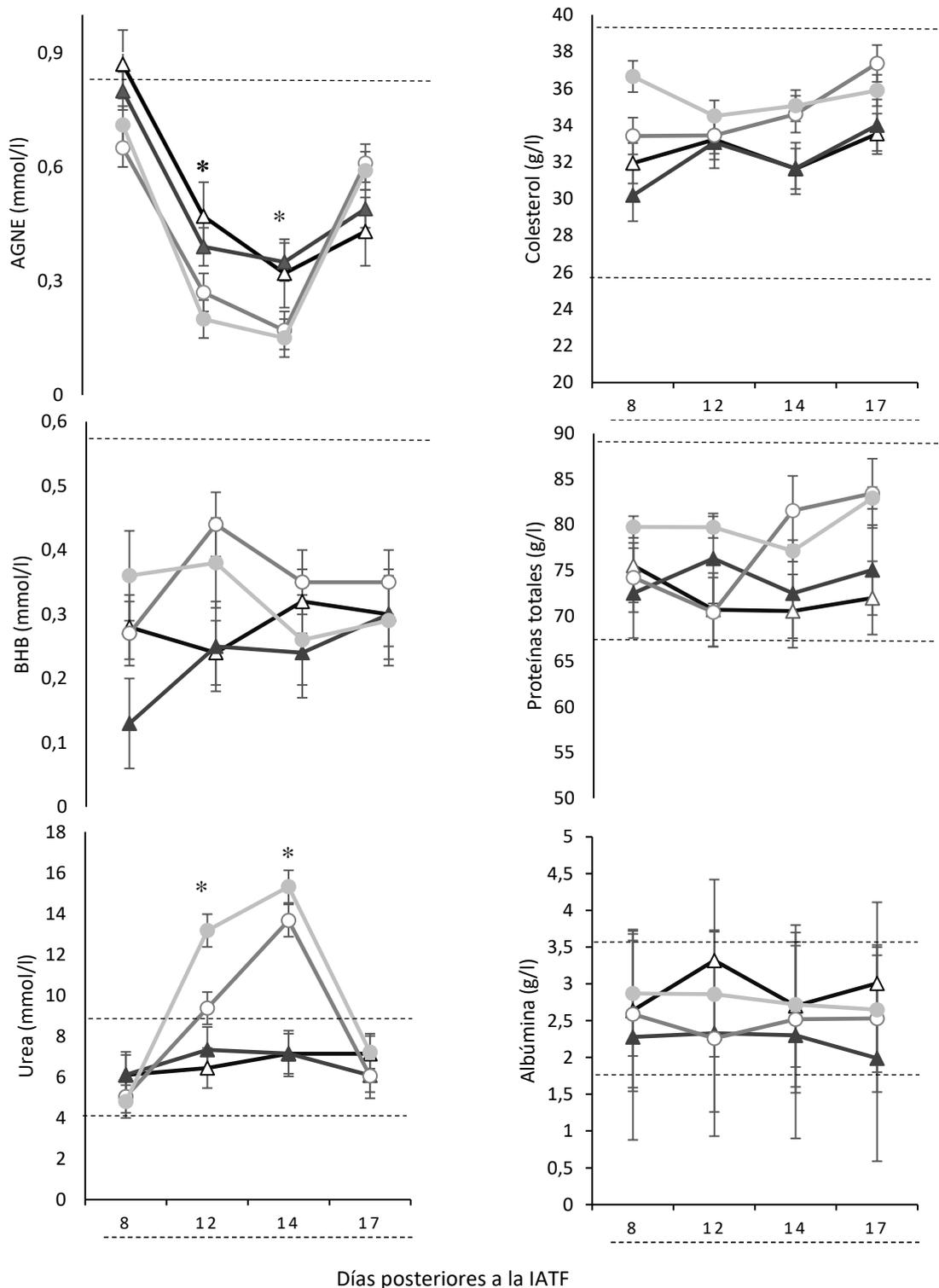
Los efectos fijos son Tratamiento (Suplementado o Control), Día del ciclo estral posterior a IATF (8, 12, 14 o 17) y las interacciones entre ellos. BHB, Betahidroxibutirato; AGNE, Ácidos grasos no esterificados.

Variable (metabolitos)	<i>n</i>	Tratamiento	Día	Tratamiento x Día
<b>AGNE</b>	193	NS	***	***
<b>BHB</b>	94	NS	NS	NS
<b>Urea</b>	86	*	***	***
<b>Proteínas Totales</b>	86	NS	NS	NS
<b>Albumina</b>	99	**	NS	*
<b>Colesterol</b>	97	NS	NS	NS

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

*n*: número de muestras. Tratamiento: Control o Suplementado. Día: día con respecto a la IATF (Día 0).

En la Figura 5 se muestra la evolución en los niveles plasmáticos de metabolitos previo, durante, y posterior a la suplementación focalizada con harina de soja entre los Días 8 al 14 para cada uno de los subgrupos conformados. Se observa que previo a la suplementación (Día 8), los niveles plasmáticos de AGNE en el subgrupo S-R se encuentran por encima de los niveles normales, mientras que los otros tres subgrupos restantes (S-NR, C-NR, y C-R) se encuentran cercanos al límite fisiológico superior, disminuyendo hacia el Día 12 en todos los subgrupos. Los niveles de plasmáticos de urea se incrementaron significativamente en los subgrupos Suplementados, por encima de los niveles fisiológicos, hacia el Día 12 (+60%) y 14 (+95%) de evaluación, desapareciendo esos efectos hacia el final de la suplementación ( $P > 0,05$ ). La suplementación no afectó en forma significativa los niveles plasmáticos de proteínas totales, albúmina o colesterol a lo largo del período ( $P > 0,05$ ), a excepción de los niveles de albúmina al Día 17, donde los subgrupos Suplementados presentaron niveles más elevados que los subgrupos Control ( $P < 0,05$ ).



**Figura 5.** Evolución en la concentración plasmática (medias  $\pm$  desvío estándar) de AGNE (Ácidos Grasos No Esterificados), BHB (Betahidroxibutirato), Urea, Albúmina, Proteínas totales y Colesterol en ovejas múltiparas Merino Australiano servidas por IATF vía cervical con semen fresco, pastoreando solo campo natural (Control que retornan al servicio  $\Delta$  o Control no retorno  $\blacktriangle$ ), o suplementadas con harina de soja entre los Días 8 al 14 respecto al servicio de IATF (Suplementado que retornan al servicio  $\circ$  Suplementado no retorno  $\bullet$ ). -----: Rangos fisiológicos. Día 0= IATF. \*  $P < 0,05$ .

## DISCUSIÓN

La hipótesis de que una suplementación proteica-energética focalizada en ovinos aplicada los días posteriores a un servicio de IATF, disminuye la supervivencia de los embriones generados en este servicio, pero aumenta la prolificidad del servicio de repaso no fue aceptada. Si bien la suplementación generó un aumento en los niveles de urea plasmática, esto no se acompañó de un incremento en las pérdidas reproductivas del servicio de IATF, pero tampoco se observó un incremento de la TO y/o prolificidad al servicio de repaso. Por tanto, en nuestras condiciones, la suplementación de ovejas Merino Australiano en condiciones pastoriles con harina de soja entre los días 8 al 14 de la gestación, no incrementó el número final de fetos obtenidos luego de dos servicios.

Los hallazgos de nuestro experimento evidencian que la suplementación focalizada con harina de soja entre el Día 8 y 14 no generó incremento en las pérdidas reproductivas parciales o totales de los embriones obtenidos por el servicio de IATF. Esto contrasta con los reportes de otros autores (Parr et al., 1987), quienes alimentando ovejas desde el Día 2 al 14 posterior al servicio, al 200% de las necesidades de mantenimiento en EM, encuentran un incremento significativo en las pérdidas embrionarias, asociándolas a una disminución en las concentraciones plasmáticas de progesterona. Sin embargo, Robertson et al. (2014), permitiendo el acceso de ovejas sin estro sincronizado a pastura fresca de alfalfa desde una semana antes hasta una semana después del inicio del servicio, no reportan incremento en las pérdidas embrionarias. Estos mismos autores (Robertson et al., 2015a), alimentando ovejas *ad libitum* con alfalfa hasta el Día 17 (y consumiendo 326 gr de PC y 3,38 Mcal/día de EM), encuentran una reducción en la proporción de preñeces múltiples, en comparación con ovejas alimentadas a mantenimiento. Esto concuerda además con lo reportado por Berardinelli et al. (2001), o Esponda, Itzaina y Ramos (2016), quienes observan que la suplementación con concentrados ricos en energía o proteína no tendrían efecto sobre la supervivencia de los embriones en ovejas.

Durante la suplementación los niveles plasmáticos de urea resultaron supra fisiológicos (entre 4,0 y 10,0 mmol/l; Contreras et al., 2010), hallazgo que coincide con lo reportado por otros autores (Bishonga et al., 1996; Velázquez, 2011; Esponda, Itzaina y Ramos, 2016). Sin embargo, las concentraciones de urea plasmática de nuestro experimento no fueron tan elevadas como las observadas por Robertson et al. (2015b) en ovejas alimentadas *ad libitum* con alfalfa desde una semana antes de la encarnada y por cinco semanas (16 mmol/l), o por Esponda, Itzaina y Ramos (2016), con administración de harina de soja al 1% del PV por tres semanas (dos previo y una posterior al inicio del servicio) en comederos de autoconsumo (12 a 14 mmol/l), o con suministro diario (9 mmol/l). Tampoco se llegó a los niveles que afectan la tasa de concepción en otros ruminantes (> 20 mmol/dl; revisado por Velázquez, 2011 y Farman et al., 2016). Según reportes previos (Velázquez, 2011; Habibizad et al., 2015), el mayor efecto perjudicial de la urea sería sobre los ovocitos y/o sobre el transporte embrionario. Nuestra suplementación focalizada realizada entre los días 8 a 14 posterior al servicio de IATF, habría quedado desfasada de esos eventos, a diferencia de otros trabajos (Robertson et al.

2015a), que reportan incrementos en pérdidas embrionarias en alfalfa *ad libitum* hasta el día 17. Sin embargo, otros autores (Viñoles et al., 2012), suplementando con 0,5 kg de grano de lupino desde el día -6 al 15 no reportan incremento en las pérdidas embrionarias. Los mayores niveles de urea observados no se relacionaron con un incremento en la mortalidad embrionaria ni en menores porcentajes de fertilidad.

A pesar de los buenos niveles de concepción observados, no se generó, tal cual lo esperado, diferencias significativas entre los grupos en TO o prolificidad al servicio de repaso. Debido a la sincronización y servicio de IATF realizado, hay certeza que la suplementación diferencial ocurrió entre los días 8 al 14 del ciclo estral (en etapa luteal). Un aumento del nivel nutricional (con altos niveles de energía y proteína) en los días cercanos al fin del ciclo estral incrementa la TO y prolificidad de ese servicio (Stewart & Oldham, 1986; Viñoles et al., 2009). Se reporta que este tipo de suplementación focalizada no genera mayores concentraciones de FSH (hormona estimulante del desarrollo folicular), pero incrementa las concentraciones de glucosa e insulina (Downing et al., 1995; Viñoles et al., 2005), IGF-I y leptina (Scaramuzzi et al., 2011), las que tendrían un efecto directo en el ovario. Si bien esas hormonas no fueron evaluadas en nuestro experimento, a pesar de haber actuado en el momento del ciclo estral recomendado, no se observó un incremento en la TO ni en la prolificidad del servicio repaso en las ovejas suplementadas.

Dadas las condiciones de manejo descritas, las ovejas suplementadas tuvieron una ingestión estimada de EM y PC igual o superior a la recomendada para su PV y/o momento fisiológico (AFRC, 1993; NRC, 2007). No se verificaron a lo largo del experimento variaciones en el PV o el EC, lo que descarta la ocurrencia del denominado “flushing tradicional” (Smith & Stewart, 1990; Scaramuzzi et al., 2006). Estudios previos no reportan diferencias en estas variables cuando se utiliza este tipo de alimentación focalizada (Viñoles et al., 2009). Es así como Viñoles et al., (2005) y Viñoles et al. (2009), logra incrementos en TO y prolificidad con suplementaciones de siete días con una mezcla de 80% de grano de maíz entero y 20% de harina de soja. Similares resultados se obtuvieron suplementando, con expeller de girasol (Banchero & Quintans, 2005) o harina de soja con o sin taninos condensados, a ovejas previo a un estro natural presincronizado (Banchero et al., 2012). Reportes previos al presente trabajo demuestran que la suplementación al 1,2% del PV con harina de soja por cinco días generaran similares efectos en TO y prolificidad también en un servicio de IATF (Errandonea et al., 2018; Olivera Muzante et al., 2019). Los niveles de ingesta de PC del grupo Suplementado fueron más del doble que los del grupo Control, superando los 125 gr de proteína digestible total descritos por la bibliografía como necesarios para el incremento de la TO (Smith, 1985). Este aporte proteico generó en el grupo Suplementado hacia el Día 17 elevación en los niveles de albúmina plasmáticas. Similares resultados se han encontrado en suplementaciones más prolongadas, tanto en pasturas como con concentrados (Uriarte et al., 1988; Macedo et al., 2018), consecuencia de un mayor aporte de PC en la dieta. Por todo esto se considera, que el suplemento elegido y sus niveles de inclusión, no deberían ser considerados la causa a una falta de respuesta al servicio de repaso.

Los resultados observados de falta de respuesta al servicio de repaso acontecieron, como ya se revisó, en condiciones nutricionales y sanitarias favorables para que ello ocurriera (EC adecuado, elevado contenido de PC en la dieta, EM no limitante, suplementación establecida durante la fase luteal tardía, ausencia de parasitosis, etc.; Viñoles, 2003; Banchemo et al., 2006; Fernández-Abella et al., 2006). Es posible que otros factores no controlados expliquen la falta de respuesta en términos de TO y/o prolificidad esperada. Se ha reportado que factores ambientales estresantes tales como la lluvia y temperaturas elevadas reducen la manifestación estral y la TO, específicamente si el factor estresante se produce hacia final del ciclo estral (Doney et al., 1973; Fernández Abella et al., 2008). Durante el presente experimento ocurrieron abundantes precipitaciones los días previos al comienzo y durante la suplementación (310 mm entre los Días 2 y 9, con 110 mm al Día 9). Estas lluvias pudieron tener un impacto depresivo en el consumo de los animales (González, 2000). Un indicio de lo ocurrido son los elevados niveles de AGNE basales encontrados al Día 8. Se ha reportado que estos metabolitos se elevan bajo situaciones de restricción nutricional o stress (Russel, 1984; Contreras, 2000 Sosa et al., 2006). La deprivación del alimento (carencia o imposibilidad de acceso), generaría una menor producción de leptina por parte del tejido adiposo (hormona clave en el crecimiento folicular e incremento en TO; Viñoles et al., 2005; Navqui et al., 2012), y una mayor producción de GABA a nivel hipotalámico, disminuyendo los picos de GnRH, por ende, la concentración de FSH y LH, con la consecuente falta de respuesta.

Por último, y según nuestro conocimiento, este sería el primer estudio en ovejas con estros sincronizado asociando dos suplementaciones focalizadas consecutivas: una previa al servicio de IATF y otra previa al servicio de repaso. En este sentido, es posible que la falta de respuesta observada en prolificidad al servicio de repaso se deba a que, fruto de la suplementación focalizada implementada a todas las ovejas previo al servicio de IATF, hayamos seleccionado y fertilizado aquellas ovejas metabólica o genéticamente “más aptas” para responder en ese momento (Scaramuzzi et al., 2010; Scaramuzzi et al., 2011; Juengel et al., 2013; Monniaux, 2016), y en consecuencia, haber aplicado la suplementación previa al servicio de repaso a ovejas con menores posibilidades de responder. Sin embargo, nuestro diseño experimental no permite confirmar esta hipótesis, y por ende nuevos trabajos en este sentido deberían ser planteados para confirmar esta observación.

## **CONCLUSIONES**

Se concluye en las condiciones planteadas, la suplementación proteica-energética focalizada con harina de soja aplicada en ovejas Merino Australiano los días posteriores a un servicio de IATF, no ocasiona un incremento en las pérdidas reproductivas de ese servicio, pero tampoco incrementa la TO, prolificidad o fecundidad del servicio de repaso.

## REFERENCIAS

1. Abdelli A, Kaidi R, Ibrahim B, Kalem A, Raboisson D, Iguer-Ouada M. (2017). Elevated non-esterified fatty acid and  $\beta$ -hydroxybutyrate in transition dairy cows and their association with reproductive performance and disorders: A meta-analysis. *Theriogenology* 93:99-104.
2. Abecia JA, Lozano JM, Forcada F, Zarazaga L. (1997). Effect of level of dietary energy and protein on embryo survival and progesterone production on day eight of pregnancy in Rasa Aragonesa ewe. *Anim Reprod Sci* 48:209-218.
3. Abecia JA, Forcada F, Lozano JM. (1999). A preliminary report on the effect of dietary energy on prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  production in vitro, interferon-tau synthesis by the conceptus, endometrial progesterone concentration on days 9 and 15 of pregnancy and associated rates of embryo wastage in ewes. *Theriogenology* 52(7):1203-1213.
4. Abecia JA, Forcada F, González-Bulnes A. (2012). Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Anim Reprod Sci* 130:173-179.
5. Adams GP. (1999). Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *J Reprod Fertil* 95:17-32.
6. AOAC. (1984). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 14<sup>a</sup> ed. Arlington, VA.
7. Azzarini M. (2000). Consideraciones y sugerencias para mejorar los procreos ovinos. Una propuesta para mejorar los procreos ovinos. *Boletín de difusión SUL*. Montevideo, pp. 35.
8. Baird DT. (1983). Factors regulating the growth of the preovulatory follicle in the sheep and human. *J Reprod Fertil* 69:343-352.
9. Banchemo G, Quintans G. (2005). Alternativas nutricionales y de manejo para aumentar la señalada en la majada en sistemas ganaderos extensivos. En: Seminario de Actualización Técnica: Reproducción Ovina. Serie Actividades de Difusión 401. INIA Treinta y Tres. INIA Tacuarembó, Uruguay, pp.17-31.
10. Banchemo G, Fernández M, Ganzábal A, Vázquez A, Quintans G. (2006). Manejo genético y nutricional para aumentar la tasa mellicera de nuestras majadas. En: XXXIV Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, pp.71-76.
11. Banchemo G, Vázquez A, Vera M, Quintans G. (2012). Adding condensed tannins to the diet increases ovulation rate in sheep. *Anim Prod Sci* 52:853-856.
12. Berardinelli JG, Weng J, Burfening PJ, Adair R. (2001). Effect of excess degradable intake protein on early embryonic development, ovarian steroids, and blood urea nitrogen on days 2, 3, 4, and 5 of the estrous cycle in mature ewes. *J Anim Sci* 79:193-199.
13. Bishonga C, Robinson JJ, McEvoy TG, Findlay P, Aitken RP, Robertson I. (1996). Excess dietary urea intake in ewes and its effect on ovulation rate and embryo development. *Jpn J Vet Res* 44(3):139-151.
14. Brown GH. (1988). The statistical comparisons of reproduction rates for groups of sheep. *Aust J Agric Res* 39:899-905.

15. Bruss ML. (2008). Chapter 4 - Lipids and Ketones. In JJ Kaneko, JW Harvey, ML Bruss (Eds.), *Clinical Biochemistry of Domestic Animals (Sixth Edition)*. pp. 81-115.
16. Chilliard Y, Delevalud C, Bonnet M. (2005). Leptin expression in ruminants: Nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. *Dom Anim Endoc* 29(1):3-22.
17. Cognié Y, Mariana JC, Thimonier J. (1970). Etude du moment d'ovulation chez la brebis normale ou traitée par un progestagène associé ou non à une injection de PMSG. *An Biol Anim Bioch Bioph* 10:15-24.
18. Colas G, Thimonier J, Courot M, Ortatavant R. (1973). Fertilité, prolificité et fécondité pendant la saison sexuelle des brebis inseminées artificiellement après traitement à l'acetate de fluorogestone. *Ann de Zootech* 22:441-451.
19. Colas G, Brice G, Guérin Y. (1974). Acquisitions récentes en matière d'insemination artificielle ovine. *Bull Tech Inf Minist Agric* 294:795-800.
20. Contreras P, Wittwer F, Bohmwald H. (2000). Uso do perfis metabólicos no monitoramento nutricional dos ovinos. Em: González F, Barcellos J, Ospina H, Ribeiro LA. (Eds.) *Perfil metabólico em ruminantes*. Gráfica UFRGS. Porto Alegre.
21. DICOSE (2018). Declaración jurada anual de existencias. Disponible en: [www.mgap.gub.uy/institucional/datos-abiertos/xml/2018](http://www.mgap.gub.uy/institucional/datos-abiertos/xml/2018). Fecha de consulta: 17/07/2019.
22. Dobson H, Fergani C, Routly JE, Smith RF. (2012). Effects of stress on reproduction in ewes. *Anim Reprod Sci* 130(3-4):135-140.
23. Doney J, Gunn R, Griffiths J. (1973). The effect of pre-mating stress on the onset of oestrus and ovulation rate in Scottish Blackface ewes. *J Reprod Fert* 35:381-384.
24. Downing JA, Scaramuzzi RJ. (1991). Nutrient effects on ovulation rate, ovarian function and the secretion of gonadotrophic metabolic hormones in sheep. *J Reprod Fert* 43:209-227.
25. Downing JA, Joss J, Connell P, Scaramuzzi RJ. (1995). Ovulation rate and the concentrations of gonadotrophic and metabolic hormones in ewes fed lupin grain. *J Reprod Fert* 103:137-145.
26. Dupont J, Scaramuzzi RJ, Reverchon M. (2014). The effect of nutrition and metabolic status on the development of follicles, oocytes and embryos in ruminants. *Animal* 8(7):1031-1044.
27. Durán del Campo A. (1980). *Anatomía, Fisiología de la Reproducción e Inseminación Artificial en Ovinos*. Ed. Hemisferio Sur. Montevideo, pp. 264.
28. Edey TN. (1969). Prenatal mortality in sheep. A review. *Anim Breed* 37:173-190.
29. Errandonea N, Fierro S, Viñoles C, Gil J, Banchemo G, Olivera-Muzante J. (2018). Short term protein supplementation during a long interval prostaglandin-based protocol for timed AI in sheep. *Theriogenology* 114:34-39.
30. Errandonea N. (2018). Suplementación proteica focalizada previo a servicios de inseminación artificial a tiempo fijo en ovinos sincronizados con

- prostaglandinas. Tesis de Maestría en reproducción animal. Facultad de Veterinaria Udelar, Montevideo, pp. 51.
31. Esponda M, Itzaina MC, Ramos JF. (2016). Evaluación del libre acceso al concentrado proteico como modalidad de suplementación para el flushing de ovejas sobre campo natural. Tesis de grado, Facultad de Agronomía Udelar, Montevideo, pp. 166.
  32. Evans G, Maxwell C. (1990). Inseminación artificial en ovejas y cabras. En: Evans G, Salomon S. Inseminación artificial en ovejas y cabras. Ed Acribia Zaragoza, pp. 158-161.
  33. Evans AC, Flynn JD, Duffy P, Knight PG, Boland MP. (2002). Effect of ovarian follicle ablation on FSH, oestradiol and inhibin A concentrations and growth of other follicles in sheep. *Reproduction* 123:59-66.
  34. Evans AC. (2003). Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. *Anim Reprod Sci* 78:289-306.
  35. Faigl V, Vass N, Jávora A, Kulcsar M, Solti L, Amiridis G, Cseh S. (2012). Artificial insemination of small ruminants- a review. *Acta Vet Hung* 60:115-129.
  36. Farman M, Nandi S, Girish Kumar V, Tripathi SK, Gupta PSP. (2016). Effect of the metabolic stress on ovarian activity and reproductive performance of dairy cattle: a review. *Iran J Appl Anim Sci* 6(1):1-7.
  37. Fernández Abella D. (1993). Principios de fisiología reproductiva ovina. Ed. Hemisferio Sur. Montevideo, pp. 247.
  38. Fernández Abella D, Formoso D, Lafourcade E, Rodríguez Monza P, Monza J, Aguerre J, Ibáñez W. (2005). Efecto del nivel de oferta de *Lotus uliginosus* cv. Maku previo al servicio sobre la fecundidad ovina. *SUL. Prod Ovina* 17:37-46.
  39. Fernández Abella D, Folena G, Formoso D, Irabuena O. (2008). Estudio de la mortalidad embrionaria y fetal en ovinos. IV. Efecto del estrés pluviométrico artificial y natural sobre la actividad ovárica y las pérdidas reproductivas. *Prod Ovina* 20:21-30.
  40. Fernández Abella D, Villegas N. (2015). Tecnologías reproductivas bovinas y ovinas. Ed. Hemisferio Sur. Montevideo, pp. 151.
  41. Fierro S, Gil J, Viñoles C, Soca F, Banchemo G, Olivera-Muzante J. (2014). Protein supplementation during a short-interval prostaglandin-based protocol for timed AI in sheep. *Anim Reprod Sci* 149:158-162.
  42. Fierro S, Viñoles C, Olivera-Muzante J. (2016). Concentrations of steroid hormones, estrous, ovarian and reproductive responses in sheep estrous synchronized with different prostaglandin-based protocols. *Anim Reprod Sci* 167:74-82.
  43. Fierro S, Viñoles C, Olivera-Muzante J. (2017). Long term prostaglandin based-protocols improve the reproductive performance after timed artificial insemination in sheep. *Theriogenology* 90:109-113.
  44. Fierro S, Olivera-Muzante J. (2017). Long interval prostaglandin as an alternative to progesterone-eCG based protocols for timed AI in sheep. *Anim Reprod Sci* 180:78-84.

45. Ganzábal A, Ruggia A, Miquelerena J. (2003). Producción de corderos en sistemas intensivos. Serie de Actividades de Difusión de INIA 342 Montevideo, pp.1-7.
46. Ganzábal A, Ciappesoni G, Banchemo G, Vazquez A. (2011). Biotipos maternas para enfrentar los nuevos desafíos de la producción ovina moderna. XXXIX Jornadas de Buiatría. Paysandú. 157-160.
47. Gao H, Wu G, Spencer TE, Johnson, GA, Li X, Bazer, FW. (2009). Select nutrients in the ovine uterine lumen. I. Amino acids, glucose, and ions in uterine lumenal flushings of cyclic and pregnant ewes. *Biol Reprod* 80(1):86-93.
48. Gibbons AE, Fernández J, Bruno-Galarraga MM, Spinelli MV, Cueto MI. (2019). Technical recommendatios for artificial insemination in sheep. *Anim Reprod* 16(4):803-809.
49. Gómez Miller R. (2017). Adopción de tecnologías en sistemas ganaderos del norte. Serie técnica 235- Inia. Montevideo, pp. 117.
50. González- Bulnes A, Menchaca A, Martin GB, Martínez- Ros P. (2020). Seventy years of progestagen treatments for management of the sheep oestrous cycle: where we are and where we should go. *Reprod Fert and Devel* 32:441-452.
51. González FHD. (2000). Uso do perfil metabólico para determinar o status nutricional em gado de corte. Em: González FHD, Ospina H, Barcelos JO, Ribeiro LAO. (Eds) Perfil metabólico em ruminantes: Seu uso em nutrição e doenças nutricionail. Gráfica UFRGS. Porto Alegre.
52. Gordon I. (1983). Fixed-time sheep artificial insemination. In: *Controlled Breeding in Farms Animal*. Gordon, I. (Ed). Oxford, pp. 197-208.
53. Habibizad K, Riasi A, Kohram H, Rahmani H. (2015). Effect of long-term or short-term supplementation of high energy or high energy-protein diets on ovarian follicles and blood metabolites and hormones in ewes. *Small Rum Res* 132:37-43.
54. Haydock KP, Shaw NH. (1975). The comparative yield method for estimating dry matter yield of pasture. *Aust J Exper Agric* 15:663-670.
55. Herdt T, Emery RS. (1992). Therapy of disease of ruminant intermediary metabolism. *Vet Clin N America: Food Anim Pract* 8(1):91-106.
56. Huntington G, Archibeque SL. (1999). Practical aspects of urea and ammonia metabolism in ruminants. *J Anim Sci* 78:1-11.
57. Juengel JL, Davis GH, McNatty KP. (2013). Using sheep lines with mutations in single genes to better understand ovarian function. *Reproduction* 146(4):111-123.
58. Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss M. (2008). *Clinical Biochemistry of Domestic Animals (Sixth Edition)*. Academic Press. San Diego, pp. 905.
59. Kelly RW, Crocker KP. (1990). Reproductive wastage in Merino flocks in Western Australia: a guide for fundamental research. In: *Reproductive Physiology of Merino Sheep. Concepts and consequences*. Oldham CM, Martin GB, Purvis IW (Eds). School of Agriculture (Animal Science). The University of Western Australia. Crawley, WA, pp.1-9.

60. Lindsay D, Martin G, Williams I. (1993). Nutrition and reproduction. In: *Reproduction in Domesticated Animals: World Animal Sciences Series*. King GJ (editor). Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 459-491.
61. Macedo JGL, Rodrigues VJC, Cruz WFG, Ferreira DA, Andrade MEB. (2018). Metabolic, productive and reproductive profile of ewe receiving flushing supplementation with different energy sources *Veter Not* 24(1):12-29.
62. Margan DE. (1994). Energy and protein value of lupin seed as a production ration or as a supplement for sheep fed chaffed wheaten hay. *Aust J Exper Agric* 34:331-337.
63. Martin GB, Milton J, Davidson R, Banchero-Hunzicker G, Lindsay D, Blache D. (2004). Natural methods for increasing reproductive efficiency in small ruminants. *Anim Reprod Sci* 82-83:231-246.
64. Maurya VP, Sejian V, Kumar K, Sigh G, Naqvi SMK. (2012). Walking stress influence livestock production. In: *Environmental stress and amelioration in livestock production*. Sejian V, Naqvi SMK, Ezeji T, Lakritz J, Lal R. (Eds). Springer. Germany.
65. McCracken JA, Glew ME, Scaramuzzi RJ. (1970). Corpus luteum regression induced by prostaglandin F<sub>2</sub>-alpha. *J Clin Endocrinol Metab* 30:544-546.
66. McEvoy TG, Robinson JJ, Aitken RP, Findlay PA, Robertson IS. (1997). Dietary excesses of urea influence the viability and metabolism of preimplantation sheep embryos and may affect fetal growth among survivors. *Anim Reprod Sci* 47:71-90.
67. Menchaca A, Rubianes E. (2004). New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reprod Fertil Dev* 16:403-413.
68. Menchaca A, Vilariño M, Rubianes E. (2009). Short-term v Long-term progesterone protocol using cervical or intrauterine fixed-time insemination in sheep. *Reprod Fert Dev* 22:172.
69. Merck (2011). *Manual Merck de Veterinaria*. Sexta edición. Kahn CM; Line S. (Eds). Editorial Océano. Barcelona, pp. 2736.
70. Meza -Herrera CA, Ross TT, Hallford DM, Hawkins DE, González -Bulnes A. (2010). High periconceptional protein intake modifies uterine and embryonic relationships increasing early pregnancy losses and embryo growth retardation in sheep. *Reprod Dom Anim* 45:723-728.
71. MGAP (2018). Encuesta Nacional Ganadera. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/unidad-organizativa/oficina-de-programación-y-política-agropecuaria/estadísticas-y-documentos/10-12> Fecha de consulta: 02/08/2019.
72. Mieres JM. (2004). Guía para la alimentación de rumiantes. Mieres JM (Editor). Serie Técnica N°142. Montevideo, pp. 92.
73. Montossi F. (2003). 1era auditoria de calidad de la cadena cárnica ovina del Uruguay. Montossi F (Editor). Serie Técnica N° 138. Montevideo, pp. 129.
74. Monniaux D. (2016). Driving folliculogenesis by the oocyte-somatic cell dialog: lessons from genetic models. *Theriogenology* 86(1):41-53.
75. Moschos S, Chan JL, Mantzoros CS. (2002). Leptina y reproducción. *Rev Chil Obst Gin* 67(2):167-168.

76. Naqvi SMK, Kumar D, Paul RK & Sejian V. (2012). Environmental stresses and livestock production. In: Environmental stress and amelioration in livestock production. Sejian V, Naqvi SMK, Ezeji T, Lakritz J, Lal R. (Eds). Springer. Germany, pp. 577.
77. Nelson DL, Cox M. (2008). Lehninger. Principios de bioquímica. Cuarta edición. Ediciones Omega. Barcelona, pp. 1119.
78. Noakes D. (2009). Endogenous and exogenous control of ovarian cyclicity. In: Veterinary reproduction and obstetrics. Ninth edition. Noakes D, Parkinson T and England G. Saunders. England.
79. Nottle MB, Hynd PI, Seamark RF, Setchell BP. (1988). Increases in ovulation rate in lupin-ewes are initiated by increases in protein digested post- ruminally. *J Reprod Fert* 84:563-566.
80. Noro M, Wittwer F. (2012). Interrelaciones entre ureagénesis y glucogénesis hepática en rumiantes alimentados con elevado contenido de nitrógeno. *Vet Mex* 43(2):143-154.
81. NRC (National Research Council). (2007). Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids. Washington DC.
82. Olivera J, Gil J. (2005). Estudio de diferentes alternativas para la sincronización de estros en ovinos: descripción y valorización económica. En: XXXIII Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, pp.195-196.
83. Olivera- Muzante J, Gil J, Fierro S, Menchaca A, Rubianes E. (2011). Alternatives to improve a prostaglandin-based protocol for timed artificial insemination in sheep. *Theriogenology* 76:1501-1507.
84. Olivera- Muzante J. (2018). Inseminación artificial cervical a tiempo fijo en ovinos empleando análogos de prostaglandina. Olivera-Muzante, J. (Ed). Serie Técnica INIA N° 67. Montevideo, pp. 67.
85. Olivera- Muzante J, Fierro S, Alabart JL, Claramunt M, Minteguiaga MA, Aunchayna G, Errandonea N, Banchemo G. (2019). Short-term dietary protein supplementation improves reproductive performance of oestrus-synchronized ewes when there are long intervals of prostaglandin or progesterone-based treatments for timed AI. *Anim Reprod Sci* 206:78-84.
86. Palacios C, Abecia JA. (2015). Meteorological variables affect fertility rate after intrauterine artificial insemination in sheep in a seasonal-dependent manner: a 7-year study. *Inter J Biometeorology* 59(5):585-592.
87. Papadopoulos S, Lonergan P, Gath V, Quinn KM, Evans ACO, Callaghan DO, Boland MP. (2001). Effect of diet quantity and urea supplementation on oocyte and embryo quality in sheep. *Theriogenology* 55:1059-1069.
88. Parr RA, Davis IF, Miles MA, Squires TJ. (1993). Liver blood flow and metabolic clearance rate of progesterone in sheep. *Res Vet Sci* 55:311-316.
89. Parr RA, Davis IF, Fairclough RJ, Miles MA. (1987). Overfeeding during early pregnancy reduces peripheral progesterone concentration and pregnancy rate in sheep. *J Reprod Fert* 80:317-320.
90. Pisani LF, Antonini S, Pocar P, Ferrari S, Brevini TAL, Rhind SM, Gandolfi F. (2008). Effects of pre-mating nutrition on mRNA levels of developmentally

- relevant genes in sheep oocytes and granulosa cells. *Reproduction* 136(3):303–312.
91. Ramírez Lozano RG. (2017). *Principios de nutrición de rumiantes*. Ed. Palibrio. México, pp. 186.
  92. Rhind SM, McNeilly AS. (1986). Follicle populations, ovulation rates and plasma profiles of FSH, LH and prolactin in Scottish Blackface ewes in high and low levels of body condition. *Anim Reprod Sci* 10:105-115.
  93. Rhind SM, McMillen S, McKelvey WA, Rodriguez-Herrejon FF, McNeilly AS. (1989). Effect of the body condition of ewes on the secretion of LH and FSH and the pituitary response to gonadotrophin-releasing hormone. *J Endoc* 120:497-502.
  94. Robertson SM, Clayton EH, Friend MA. (2015a). Reproductive performance in ewes fed varying levels of cut lucerne pasture around conception. *Anim Reprod Sci* 158:75-85.
  95. Robertson SM, Clayton EH, Morgan B, Friend MA. (2015b) Reproductive performance of ewes grazing lucerne during different periods around mating. *Anim Reprod Sci* 162:62-72.
  96. Robertson SM, King BJ, Allworth MB, Rummery J, Friend MA. (2014). The effect of peri-conceptual grazing of live pasture on fetal numbers in unsynchronised ewes. *Anim Prod Sci* 54:1008–1015.
  97. Robinson JJ, Ashworth CJ, Rooke JA. (2006). Nutrition and fertility in ruminant livestock. *Anim Feed Sci Tech* 126:259-276.
  98. Rubianes E, Menchaca A, Carbajal B. (2003). Response of the 1-5 day-aged ovine corpus luteum to prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$ . *Anim Reprod Sci* 78(1-2):47-55.
  99. Russel AJF, Doney JM, Gunn RG. (1969). Subjective assessment of body fat in live sheep. *J Agric Sci* 72:451-454.
  100. Russel AJF. (1984). Means of assessing the adequacy of nutrition of pregnant ewes. *Livest Prod Sci* 11:429-436.
  101. Saravia C, Cruz G. (2003). Influencia del ambiente atmosférico en la adaptación y producción animal. Facultad de Agronomía, Udelar. Nota técnica no.50. Montevideo, pp. 36.
  102. Scaramuzzi RJ, Campbell BK, Downing JA, Kendall NR, Khalid M, Muñoz-Gutiérrez Somchit A. (2006). A review of the effects of supplementary nutrition in ewes on the concentrations of reproductive and metabolic hormone and the mechanism that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reprod Nutr Dev* 46:339-354.
  103. Scaramuzzi RJ, Brown HM, Dupont J. (2010). Nutritional and metabolic mechanisms in the ovary and their role in mediating the effect of diet on folliculogenesis: a perspective. *Reprod Domest Anim* 45:32-41.
  104. Scaramuzzi RJ, Baird DT, Campbell BK, Driancourt MA, Dupont J, Fortune JF, Gilchrist RB, Martin GB, McNatty KP, McNeilly AS, Monget P, Monniaux D, Viñoles C, Webb R. (2011). Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. *Reprod Fertil Dev* 23:444-467.
  105. Senger PL. (2005). *Pathways to pregnancy and parturition*. Second edition. Cadmus professional communication. Washington.

106. Senosy W, Abdel-Raheem SM, Abd-Allah M, Fahmy S, Hassan EH, Derar RI. (2013). Effect of transient high-energy diets just after ovulation on ovarian performance and metabolic status in cyclic ewes. *Small Rum Res* 109:152-155.
107. Sliwowska JH, Billings HJ, Goodman RL, Lehman MN. (2006). Immunocytochemical colocalization of GABA-B receptor subunits in gonadotropin -releasing hormone neurons of the sheep. *Neuroscience* 141:311-319.
108. Smith JF. (1985). Protein, energy and ovulation rate. In: *Genetics of Reproduction in sheep*. Land, R.B.; Robinson DW (Editor). New Zealand Ministry of Agriculture and Fisheries Research, pp. 349-359.
109. Smith AJ, Stewarth RD. (1990). Effects of nutrition on the ovulation rate of ewes. In: *Reproductive Physiology of Merino Sheep. Concepts and consequences*. Oldham CM, Martin GB, Purvis IW (Editores). School of Agriculture (Animal Science). The University of Western Australia. Crawley, Australia, pp. 85-101.
110. Sosa C, Abecia JA, Forcada F, Viñoles C, Tasende C, Valares JA, Palacín I, Martin GB and Meikle A. (2006). Effect of undernutrition on uterine progesterone and oestrogen receptors and on endocrine profiles during the ovine oestrus cycle. *Reprod Fert Dev* 18:447-458.
111. Souza CJ, Campbell BK, Baird DT. (1998). Follicular waves and concentrations of steroids and inhibin a in ovarian venous blood during the luteal phase of the oestrus cycle in ewes with an ovarian autotransplant. *J Endocrinol* 156:563-572.
112. Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC. (2004). Implantation mechanisms: insights from the sheep. *Soc Reprod Fert* 128:657-668.
113. Stewarth R, Oldham CM. (1986). Feeding lupins to ewes for four days during the luteal phase can increase ovulation rate. *Proc Aust Soc Anim Prod* 16:367-370.
114. Synchrovine® (2003). Registro de marca. Ministerio de Industria, Energía y Minería. Montevideo, Uruguay. Protocolo de sincronización de celos con Prostaglandina F2 $\alpha$  e inseminación artificial a Tiempo Fijo en ovinos ciclando. Rubianes E, Menchaca A, Gil J, Olivera J.
115. Teleni E, Rowe JB, Croker KP, Murray PJ, King WR. (1989). Lupins and energy-yielding nutrients in ewes. II. Responses in ovulation rate in ewes to increased availability of glucose, acetate and amino acids. *Reprod Fertil Dev* 1:117-125.
116. Uriarte G, Bonino J, Gaggero C, Oficialdegui R. (1988). Algunos parámetros bioquímicos sanguíneos en ovejas, y sus relaciones con la nutrición e índices reproductivos. *Producción Ovina* 1(1):47-58.
117. Ungerfeld R. (2002). *Reproducción en los animales domésticos*. Tomo I. Ed. Melibea. Montevideo, pp. 180.
118. Viñoles C, Forsberg M, Banchero G, Rubianes E. (2002). Ovarian follicular dynamics and endocrine profiles in Polwarth ewes with high and low body condition. *Anim Sci* 74:539-545.

119. Viñoles C. (2003). Effect of nutrition on follicle development and ovulation rate in the ewe. *Veterinaria* 165. Tesis Doctoral. Swedish University of Agricultural Science, Uppsala, pp. 56.
120. Viñoles C, Forsberg M, Martín GB, Cajarville C, Repetto J, Meikle A. (2005). Short-term nutritional supplementation of ewes in low body condition affects follicle development due to an increase in glucose and metabolic hormones. *Reproduction* 129(3):299-309.
121. Viñoles C, Meikle A, Martin B. (2009). Short-term nutritional treatments grazing legumes or feeding concentrates increase prolificacy in Corriedale ewes. *Anim Reprod Sci* 113:82-92.
122. Viñoles C, González de Bulnes A, Martin GB, Sales F, Sale S. (2010). Sheep and Goats. In: *Atlas of Ruminant and Camelid Reproductive Ultrasonography*. Ed: Luc DesCoteaux, Jill Colloton and Giovanni Gnemi. Wiley-Blackwell: Ames, Iowa, pp.181-210.
123. Viñoles C, Paganoni B, Milton JTB, Driancourt MA, Martin GB. (2011). Pregnancy rate and prolificacy after artificial insemination in ewes following synchronization with prostaglandin, sponges or sponges with bactericide. *Anim Prod Sci* 51:565-569.
124. Viñoles C, Glover KMM, Paganoni B, Milton JTB, Martin GB. (2012). Embryo losses in sheep during short-term nutritional supplementation. *Reprod Fert Dev* 24:1040-1047.
125. Willingham T, Shelton M, Thompson P. (1986). An assessment of reproductive wastage in sheep. *Theriogenology* 26:179-188.
126. Wilkins J, Croker K. (1990). Embryonic wastage in ewes. In: Oldham CM, Martin GB, Purvis IW. *Reproductive Physiology of Merino Sheep. Concepts and consequences*. Perth, The University of Western Australia, pp. 169-177.
127. Xu ZZ, McDonald MF, McCutcheon SN. (1989). The effects of nutritionally-induced liveweight differences on follicular development, ovulation rate, oestrus activity and plasma follicle stimulating hormone levels in the ewe. *Anim Reprod Sci* 19:67-78.
128. Zywicki ME, Blohowiak SE, Magness RR, Segar JL, Kling PJ. (2018). Impact of the ovarian cycle and pregnancy on plasma chemistry values in ewes. *J Vet Diag Inves* 30(2):238–244.