

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

**DETERMINACIÓN DE UN TRATAMIENTO EFICAZ DE
MULTIOVULACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES EN
OVEJAS CORRIEDALE BOOROLA**

por

Marcela RODRIGUEZ CERCHI

**TESIS presentada como
uno de los requisitos
para obtener el título de
Ingeniero Agrónomo**

MONTEVIDEO

URUGUAY

2010

Tesis aprobada por:

Director: -----

PhD. Ing. Agr. Daniel Fernández Abella

Dr. M. V. Ignacio Lago

PhD. Dr. M. V. Raquel Pérez

Fecha: -----

Autor: -----

Marcela Rodriguez Cerchi

AGRADECIMIENTOS

A todas aquellas personas que confiaron, colaboraron y me apoyaron durante todo el proceso de este trabajo.

Muy especialmente a mi tutor, Ing. Agr. Daniel Fernández Abella por estar incondicionalmente en todas las etapas de esta tarea y por enseñarme que la perseverancia es una herramienta fundamental para obtener logros no sólo profesionales sino también a nivel personal.

Al Dr. Ignacio Lago por estar, y sobre todo en algunos momentos difíciles (cuando quise que la tierra me tragara).

A Lili, Haroldo, Lucía, Giovanna y todos los demás empleados del S.U.L. (Cerro Colorado), por su hospitalidad y confianza.

A mi familia y amigos, que me acompañaron y apoyaron siempre, desde el principio y a lo largo de toda mi carrera.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VI
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	3
2.1 <u>CICLO ESTRAL</u>	3
2.1.1 <u>Fase Folicular</u>	6
2.1.2 <u>Fase Luteal</u>	7
2.1.2.1 <u>Cuerpo lúteo</u>	7
2.1.2.2 <u>Luteólisis</u>	9
2.2 <u>FOLICULOGÉNESIS</u>	10
2.2.1 <u>Ovogénesis</u>	11
2.2.2 <u>Crecimiento folicular</u>	13
2.2.2.1 <u>Crecimiento folicular terminal y maduración</u>	17
2.3 <u>CORRIEDALE BOORoola</u>	21
2.3.1 <u>Origen del “gen Booroola” (Fec^B)</u>	22
2.3.2 <u>Efecto del gen Fec^B en la hembra</u>	23
2.3.2.1 <u>Pubertad</u>	23
2.3.2.2 <u>Tasa ovulatoria</u>	23
2.3.2.3 <u>Actividad del ovario (foliculogénesis)</u>	25
2.3.2.4 <u>Duración de la estación reproductiva y estro</u>	26
2.3.3 <u>Efectos del gen Fec^B en el macho</u>	26
2.3.3.1 <u>Modificaciones endócrinas</u>	27
2.4 <u>MULTIOVULACIÓN Y TRANSFERENCIA DE EMBRIONES (MOTE)</u>	28
2.4.1 <u>Producción mediante multi o superovulación</u>	29
2.4.1.1 <u>Antecedentes de protocolos de multi o superovulación</u>	34
2.4.2 <u>Elección de donantes</u>	40
2.4.3 <u>Elección de receptoras</u>	40
2.4.4 <u>Colecta</u>	42
2.5 <u>CRIOPRESERVACIÓN</u>	44
2.5.1 <u>Crioprotectores</u>	45
2.5.2 <u>Criopreservación convencional o tradicional (congelación por enfriamiento lento)</u>	47
2.5.3 <u>Vitrificación (enfriamiento brusco)</u>	49

3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	52
3.1 LOCALIZACIÓN.....	52
3.2 SUELOS.....	52
3.3 CONDICIONES CLIMÁTICAS.....	53
3.4 ANIMALES.....	54
3.4.1 <u>Hembras dadoras</u>	54
3.5 ALIMENTACIÓN.....	55
3.6 TRATAMIENTOS.....	56
3.6.1 <u>Tratamientos con dosis decrecientes de FSH</u>	58
3.6.2 <u>Tratamientos de única dosis de FSH</u>	59
3.6.3 <u>Tratamiento sin FSH</u>	59
3.7 SERVICIOS.....	60
3.8 COLECTA.....	60
3.8.1 <u>Metodología de colecta y materiales utilizados</u>	60
3.9 CRIOPRESERVACIÓN.....	62
3.10 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	63
3.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	64
4. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	65
4.1 TRATAMIENTOS CON DOSIS DECRECIENTES DE FSH.....	65
4.1.1 <u>Respuesta ovárica</u>	65
4.1.2 <u>Colecta de embriones</u>	69
4.2 TRATAMIENTOS DE ÚNICA DOSIS DE FSH.....	71
4.2.1 <u>Respuesta ovárica</u>	71
4.2.2 <u>Colecta de embriones</u>	73
4.3 TRATAMIENTO SIN FSH.....	74
4.4 OTROS TRATAMIENTOS.....	75
4.4.1 <u>Dosis concentrada de FSH sin aplicación de eCG</u>	75
4.5 COMPARACIÓN ENTRE TRATAMIENTOS.....	76
5. <u>CONCLUSIONES</u>	79
6. <u>RESUMEN</u>	80
7. <u>SUMMARY</u>	81
8. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	82

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Principales hormonas reproductivas.....	5
2. Tasa ovulatoria en otoño y primavera según la presencia o no del gen Fec ^B	25
3. Algunos mecanismos que diferencian las ovejas portadoras del gen Fec ^B	25
4. Protocolos de multi o superovulación.....	35
5. Protocolos de congelación tradicional.....	48
6. Protocolos de vitrificación.....	50
7. Descripción de los tratamientos según tipo y cantidad de hormona.....	56
8. Protocolo de tratamiento con dosis decrecientes de FSH.....	58
9. Protocolo de tratamiento de única dosis de FSH.....	59
10. Actividad ovárica de cada animal según el tratamiento e indicación de casos donde se realizó colecta de embriones..	66
11. Clasificación y evaluación de calidad de los embriones según tratamiento, y cantidad de embriones colectados y congelados por oveja.....	69
12. Actividad ovárica de cada animal según tratamiento e indicación de casos donde se realizó la colecta de embriones.....	71

13. Clasificación y evaluación de calidad de los embriones según tratamiento, y cantidad de embriones colectados y congelados por oveja.....	73
14. Actividad ovárica según tratamiento de dosis única de eCG.	74
15. Actividad ovárica según tratamientos de dosis única de FSH sin la administración de eCG.....	75

Figura No.

1. Ovario y sus estructuras según la etapa de desarrollo.....	3
2. Cuerpo lúteo.....	8
3. Representación diagramática del desarrollo de la célula germinal femenina, en el ciclo vital.....	12
4. Esquema de los principales fenómenos que ocurren durante el crecimiento folicular.....	14
5. Factores correguladores del crecimiento y diferenciación folicular independiente de gonadotropinas.....	17
6. Resumen de las etapas mas importantes de la diferenciación del oocito, célula granulosa y teca, así como el desarrollo folicular durante la foliculogénesis y la dependencia de hormonas gonadotrópicas.....	19
7. Requerimientos de gonadotropinas dependiendo del tamaño folicular.....	20
8. Técnicas quirúrgicas utilizadas para colecta embriones. Izquierda: Flushing o lavado desde el cuerno al oviducto. Derecha: Técnica antigrado de lavado desde la unión uterotubal hasta la parte basal del cuerno.....	43

9. Supervivencia de embriones según el estado de desarrollo luego de su congelación y descongelación.....	49
10. Temperatura media mensual según el año e histórica nacional.....	53
11. Precipitaciones acumuladas mensuales según el año e histórica nacional.....	54
12. Esquema de la técnica de colecta.....	61
13. Pasos a seguir previo a colocar los embriones en la pajueta..	63
14. Tasa ovulatoria promedio (número de cuerpos lúteos) según el tratamiento con dosis decrecientes de FSH y sus respectivos desvíos estándar.....	67
15. Tasa ovulatoria promedio (número de cuerpos lúteos) según el tratamiento con única dosis de FSH y sus respectivos desvíos estándar.....	72
16. Tasa ovulatoria promedio (número de cuerpos lúteos) según el tratamiento y sus respectivos desvíos estándar.....	76
17. Número de embriones colectados y posteriormente congelados según el tratamiento de superovulación.....	78

1 INTRODUCCIÓN

El uso de la selección (ya sea directa o indirecta) y cruzamientos, con objetivos de mejorar características productivas sigue siendo lo más corriente en términos de mejora genética. Para lograr que ésta sea más eficiente resulta imprescindible apostar a mejorar las técnicas reproductivas actuales, en su defecto es imposible mantener cualquier programa de mejoramiento.

Tradicionalmente, puede ser mejorado genéticamente un animal mediante el uso de cruzamientos a partir de la monta natural, esta técnica requiere de mucho tiempo para lograr un número representativo de descendencia que permita continuar con el proceso de mejora. Luego, la inseminación artificial, si bien logra un uso más eficiente del carnero seleccionado, igualmente se necesita mucho tiempo para obtener una progenie numerosa y homogénea de un mismo par de progenitores previamente seleccionados considerados “mejores”. El uso de la innovadora técnica de inseminación intrauterina utilizando semen congelado mejora la eficiencia en términos de mejora genética ya que es mayor el número de hembras a inseminar y otorga la posibilidad de utilizar genética de calidad incluso luego de la muerte del carnero donante.

Actualmente existen técnicas biotecnológicas a nivel reproductivo. La biotecnología reproductiva incluye las técnicas “In vitro”, la manipulación genética, así como la multiovulación y transferencia de embriones. Esta última utiliza en forma simultánea ambos progenitores genéticamente superiores lo que implica avanzar más rápidamente que los métodos de inseminación artificial ya sea por vía cervical como intrauterina, obteniendo un mayor progreso genético anual, al disminuir el intervalo generacional y aumentar notablemente el diferencial de selección, en consecuencia, se ejerce mayor intensidad de selección y por ende, se obtiene una descendencia altamente superior en términos genéticos así como en número de individuos.

No obstante, la técnica de congelación de embriones y su transferencia hacen posible el traslado de embriones desde un lugar a otro, transferirlos a cualquier raza y obtener un gran número de corderos puros de la raza elegida como dadora. Asimismo, el riesgo de transmisión de enfermedades es mínimo, se hace factible cambiar una raza por otra rápidamente y las crías no necesitan ningún período de adaptación al ambiente en que nazcan ya que la gestación ocurre en el vientre del animal local y por ende éste último transmitirá las características adaptativas de su lugar de origen.

El presente trabajo intenta determinar un tratamiento de superovulación que le permita al productor o institución obtener un número considerable de embriones de elevada genética, que implique un protocolo de sencilla

implementación y que sea viable en términos económicos. Este tipo de tratamientos se aplican en general en razas prolíficas con el fin de asegurar una mayor respuesta. Dentro de las razas prolíficas, se utilizaron animales Corriedale portadores del gen Booroola dado que es fácilmente factible introducir el gen que otorga la característica de alta prolificidad a la raza mayoritaria de nuestro país (Corriedale) la que representa más del 50% del stock actual ovino, sin variar el trasfondo genético de la misma.

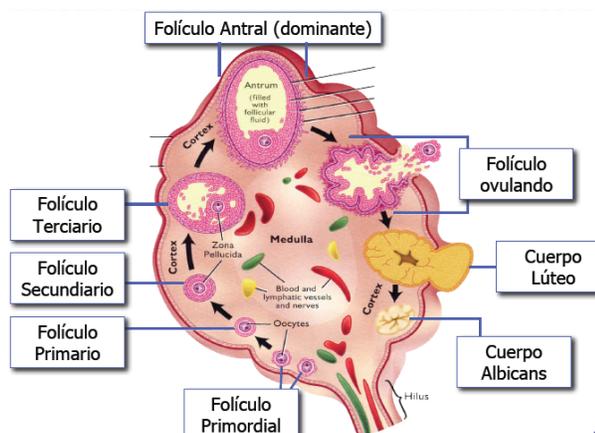
2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 CICLO ESTRAL

El ciclo estral es definido como el período entre dos celos o estros, es decir, entre los momentos en que la hembra acepta la monta del macho, y es caracterizado por importantes cambios morfológicos y de comportamiento, interconectados a una dinámica neuro-endócrina (Fernández Abella, 1993). En ovinos, las hembras son policíclicas estacionales, ya que mantienen sucesivos ciclos durante un determinado período del año (día corto), el cual es variable según la raza (Senger, 2003). La duración de dicho período es de 17 ± 2 días, aunque si bien la mayoría de las ovejas presenta un período dentro de dicho rango, Senger (2003) indica que existieran hembras con ciclos de 13 días. De acuerdo a lo anterior, el ciclo estral se divide en cuatro diferentes etapas donde suceden cambios morfológicos y funcionales del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal y del tracto reproductivo, los cuales suceden tanto a nivel del endometrio, cuernos uterinos y oviducto, cérvix, y también en términos microscópicos (Fernández Abella, 1993). La ciclicidad puede cesar (anestro) si existen condiciones ambientales estresantes o desnutrición, o bien en presencia de ciertas enfermedades en el tracto reproductivo, infección uterina o momificación fetal (Senger, 2003).

Las etapas del ciclo estral se agrupan en diferentes fases: la folicular y la luteal. Dentro de la primera se incluyen las etapas de proestro y estro, mientras que el metaestro y diestro componen la fase luteal (Fernández Abella, 1993), siendo la duración aproximada de cada una de: 2, 1.5, 2 y 12 días respectivamente, aunque, se verá más adelante que éstos son diferentes según los distintos autores.

Figura No. 1. Ovario y sus estructuras según la etapa de desarrollo.



Fuente: Senger (2004).

El sistema endócrino y el sistema nervioso funcionan para iniciar, coordinar y regular las funciones del sistema reproductor, el primero utiliza mensajeros químicos u hormonas para regular procesos corporales lentos, como el crecimiento y la reproducción, mientras que el segundo lo hace a través de impulsos nerviosos eléctricos rápidos (Hafez y Hafez, 2002). Contrariamente a las rápidas respuestas del sistema nervioso, las del sistema hormonal son lentas, pues las sustancias elaboradas por células especializadas tienen un lugar preciso del cuerpo donde deben ser transportadas (órganos blancos o efectores) (Fernández Abella, 1993).

Cada componente del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal cumple funciones fundamentales en la regulación del ciclo estral, como también lo hacen los ovarios y útero del animal, siempre respondiendo a la variación de factores externos (abióticos, como el fotoperiodo) e internos (bióticos, como las hormonas), utilizando de manera importante mecanismos moduladores de retroalimentación o feedback, reflejos neuroendocrinos y de control inmunoendocrino (Hafez y Hafez, 2002). Todos los componentes del sistema reproductivo y del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal están íntimamente relacionados por las hormonas que se producen en cada uno de sus componentes (Cavestany y Durán del Campo, 1993).

Las hormonas actúan en tres "circuitos"; largo, corto y ultracorto. El circuito largo consiste en la retroacción de las hormonas ováricas a nivel del hipotálamo e hipófisis, y recíprocamente por acción de hormonas hipofisarias en el ovario. El circuito corto consta de la acción de las hormonas hipofisarias en el hipotálamo, y el ultracorto son las hormonas ováricas que actúan en el mismo órgano que las produce. Otro circuito corto sería el de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ producida en el útero que ejerce su acción en el ovario. A través de estos circuitos las hormonas regularían su propia tasa de liberación (Cavestany y Durán del Campo, 1993).

La progesterona es la hormona que gobierna el ciclo; su presencia impide una nueva ovulación alterando la tonicidad y niveles de las hormonas gonadotrópicas. Por lo tanto, la formación y regresión del cuerpo lúteo son momentos claves en la fertilidad y duración de los ciclos (Fernández Abella, 1993).

A continuación se presenta un cuadro señalando el origen, su estructura y funciones principales de las hormonas reproductivas de mayor importancia.

Cuadro No 1. Principales hormonas reproductivas.

Nombre	Origen y estructura	Función principal
Liberadora de gonadotropina (GnRH)	Hipotálamo basal medio. Decapéptido.	Estimula la liberación tónica y oleada preovulatoria de FSH y LH
Oxitocina	Hipotálamo y ovario, se almacena en la neurohipófisis. Proteína.	Induce contracciones uterinas, la descarga de la leche y facilita el transporte de gametos. Induce liberación de PGF _{2α} en el endometrio.
Melatonina	Glándula pineal. Amina.	Estimula el inicio de la época reproductiva (estación de cría).
Folículo estimulante (FSH)	Adenohipófisis. Glucoproteína.	Estimula el crecimiento folicular (hembra) y espermatogénesis (macho).
Luteinizante (LH)	Adenohipófisis. Glucoproteína	Estimula ovulación y luteinización de folículos ováricos.
Prolactina (PRL)	Adenohipófisis. Proteína.	Promueve la lactancia y la conducta maternal. Mantiene el cuerpo lúteo (Fernández Abella, 1993).
Estrógeno (E ₂)	Adenohipófisis, folículo ovárico. Esteriode.	Promueve el comportamiento sexual, estimula el desarrollo de características sexuales secundarias, efectos anabólicos.
Progesterona (P ₄)	Cuerpo lúteo, placenta y glándula suprarrenal. Esterioide.	Prepara el endometrio para la implantación y mantenimiento de la preñez, actúa sinérgicamente con estrógenos para inducir el comportamiento estral, desarrolla alvéolos de glándula mamaria, inhibe el estro y oleada ovulatoria de LH, inhibe movilidad uterina.
Relaxina	Cuerpo lúteo. Polipéptido.	Dilata cuello uterino y vagina antes del parto, causa contracciones uterinas
Prostaglandina F _{2α}	Casi todos los tejidos corporales, endometrio. Ácido graso.	Contracciones uterinas facilitando el transporte de espermatozoides y parto. Causa regresión del cuerpo lúteo (luteólisis).
Activina	Líquido folicular. Proteína.	Estimula secreción de FSH.

Inhibina	Células de la granulosa. Proteína.	Reducen la secreción de FSH sin alterar la liberación de LH.
Folistatina	Líquido folicular. Proteína.	Inhibe secreción de FSH, enlaza activina y neutraliza su actividad biológica. (modula secreción de FSH).
Gonadotropina coriónica equina (eCG o PMSG)	Útero (copas endometriales) días 40 a 85 de preñez. Glucoproteína.	Acción biológica de la FSH y LH, estimula el desarrollo de folículos ováricos (la mayor parte se vuelven luteinizados por acción parecida a la LH).

Fuente: Fernández Abella (1993), Hafez y Hafez (2002).

2.1.1 Fase folicular

Esta fase comienza luego de la luteólisis cuando existe una marcada reducción de los niveles de progesterona, luego, el efecto de retroalimentación negativa de la progesterona hacia el hipotálamo se revierte y así, la GnRH es liberada a mayores amplitudes y frecuencias (Senger, 2003), reanudándose un nuevo ciclo, con la etapa de proestro.

Hafez y Hafez (2002) por su parte, definen a la fase folicular como el período que va desde la regresión del cuerpo lúteo o amarillo a la siguiente ovulación, con una duración de dos días, aunque la presencia de folículos antrales durante la fase luteal sugiere que sea más larga (de dos a cinco días) si se entiende que la fase folicular es el período que abarca desde la formación del folículo antral a la ovulación. Por lo que ellos sugieren que existe una superposición entre las dos fases.

Según Fernández Abella (1993) dicha etapa tiene una duración de 3-4 días y se puede decir que es el período de preparación para el estro. La ovulación acontece a las 25-30h de comenzado el estro (Evans y Maxwell 1990, Cavestany y Durán del Campo 1993) y de 24-30h según Senger (2003).

La GnRH estimula a la hipófisis para que libere FSH y LH. La hormona folículo estimulante (FSH) provoca el crecimiento de los folículos y éstos comienzan a secretar estrógenos (Evans y Maxwell 1990, Cavestany y Durán del Campo 1993). Ya culminadas las etapas previas de reclutamiento y selección de la dinámica folicular, existen uno o más folículos dominantes que será/serán los que efectivamente ovulen. Los estrógenos, al llegar a su pico de secreción (por parte de los folículos de mayor tamaño), estimulan al hipotálamo a liberar GnRH, que induce a la hipófisis a liberar la descarga preovulatoria de LH (Godinsky et al., Scaramuzzi et al., Karsh y Foster, citados por Gordon 1989, Evans y Maxwell 1990, Cavestany y Durán del Campo 1993). Los altos niveles de estrógenos son

los responsables de las manifestaciones de celo o estro (Evans y Maxwell 1990, Cavestany y Durán del Campo 1993).

El nivel de estrógenos alcanza el máximo justamente antes de la aparición del celo; la oleada preovulatoria de LH ocurre al principio del estro, siguiendo luego, a las 18-24h, la ovulación (Evans y Maxwell, 1990).

Según Evans y Maxwell (1990), Hafez y Hafez (2002) el estro tiene una duración de 18-72h; mientras que según Asdell, citado por Gordon (1989) dura entre 24 y 36h. Para Cavestany y Durán del Campo (1993) tiene una duración de 20-30h, para Fernández Abella (1993) es de 30 a 36h y para Senger (2003) es de 30h (rango: 18-48h). Las observaciones detalladas en varias razas de ovinos inglesas en un estudio de tres años mostraron que el promedio es de aproximadamente 35h (Hafez, citado por Gordon, 1989). Otro estudio realizado a campo por Fernández Abella et al. (1998), utilizando diferentes razas, condición corporal, peso vivo y en diferentes estaciones del año (otoño y principio de primavera) mostraron que en promedio el celo era de 23h 54minutos, y a su vez citan a otros autores (Grant, Parsons y Hunter, Bindon et al.) que afirman que dicha duración se encuentra en un rango de 26 a 36h.

En borregas es de menor duración (8 a 10h), así como también en primavera, en períodos de elevada temperatura, y, en la hembra que recibió varios servicios (Parsons et al., 1967).

2.1.2 Fase luteal

Esta fase tiene una duración de 15 días (11-16 días) y es subdividida en las etapas de metaestro y diestro, con una duración de 2 y 12 días respectivamente.

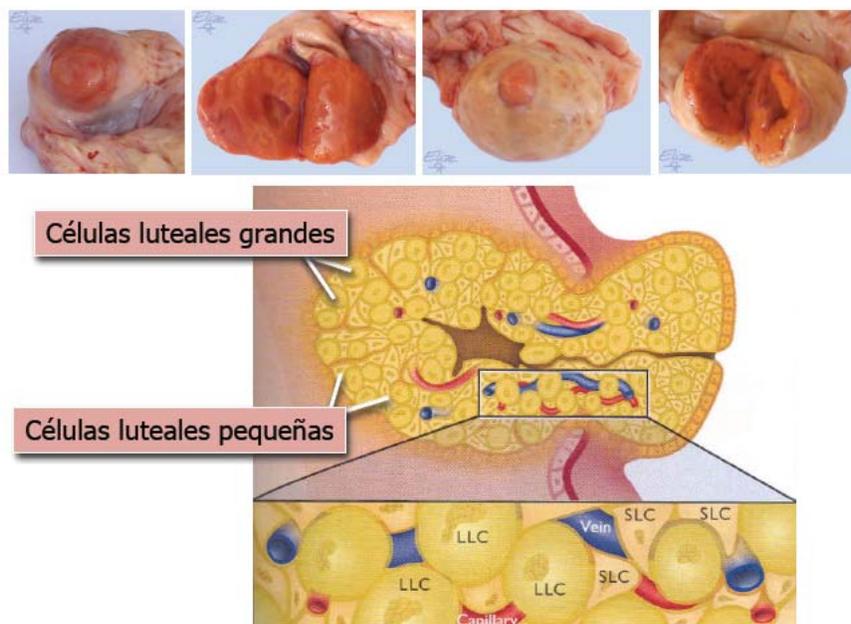
Durante esta fase se forma el cuerpo lúteo o amarillo y también su lisis, conocido este fenómeno como luteólisis, en el caso de que no haya habido fecundación (ciclo estéril).

2.1.2.1 Cuerpo lúteo

Luego de que ocurre la ovulación, se forma en el ovario el cuerpo hemorrágico en el lugar donde fue despedido el folículo dominante y maduro que logró ovular, donde seguidamente se forma el cuerpo lúteo. Las células de la granulosa tienden a ocupar el antro y se transforman en luteales dado una hipertrofia celular causada por la activación de las hormonas FSH y LH. Las células de la teca interna también se transforman en luteales y son de menor tamaño que las de la granulosa, así, el crecimiento del cuerpo lúteo se da por un aumento del tamaño, y número de dichas células respectivamente. De ahí que el cuerpo lúteo se defina como una glándula de secreción interna altamente

vascularizada (Girard, 1971). La LH y la prolactina son necesarias para la producción de progesterona (Denamur et al. 1973, Hay y Moor 1978) por parte del cuerpo lúteo (Figura No. 2).

Figura No. 2. Cuerpo lúteo.



Fuente: Senger (2003).

Edgar y Ronaldson, citados por Gordon (1989), estuvieron entre los primeros que mostraron que el cuerpo lúteo de ovinos tiene una actividad secretora total aproximadamente a los 6-8 días del ciclo estral y continúa secretando progesterona en un nivel más o menos normal hasta aproximadamente el día 15. Aunque Cavestany y Durán del Campo (1993) señalan que el cuerpo lúteo tiene un rápido desarrollo a partir de las 36h hasta el día 5 del ciclo estral, lento hasta el día 10 y decrece (se reduce) finalmente alrededor del día 17.

Por otro lado, Hansel y Convey, Cunningham et al., Quirke et al., citados por Gordon (1989), las máximas concentraciones de progesterona se alcanzan aproximadamente en el día 8 del ciclo estral y hay una abrupta disminución en los niveles de progesterona alrededor del día 15. La secreción de progesterona se observa luego de cada pulso de LH (Fitz et al. 1982, Farin et al. 1986).

Existen otras hormonas que favorecen el mantenimiento y la actividad del cuerpo lúteo, entre ellas estradiol, serotonina y prostaglandinas E (Fernández Abella, 1993)

2.1.2.2. Luteólisis

Son las células grandes (originadas de la granulosa) las que producen la mayor cantidad de progesterona hacia el final de la fase luteal y a su vez son las que contienen la mayor parte de los receptores a la $\text{PGF}_{2\alpha}$ (de origen uterino) (Fitz et al., citados por Alila y Dowd, 1991), la cual, junto con la oxitocina, juegan un papel fundamental en la lisis del cuerpo lúteo. Estas células son el blanco primario de la acción luteolítica de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Niswender et al., Braden et al., Alila et al., citados por Alila y Dowd, 1991).

Para que la luteólisis ocurra, el estradiol induce a los receptores de oxitocina en el endometrio para que éstos sean activados por la pulsátil secreción de oxitocina de origen hipofisario u ovárica. Esto determina que a cada pulso de oxitocina corresponda otro de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Fernández Abella, 1993).

La progesterona, durante la fase luteal, inhibe la acumulación de receptores de estradiol no permitiéndose la síntesis de receptores de oxitocina. Después de 10 días de acción de la progesterona sobre el útero se produce, probablemente, una pérdida de sus propios receptores y un incremento en los receptores de estradiol. Esto permite que los receptores de oxitocina comiencen a desarrollarse (Fernández Abella, 1993).

El útero es el responsable, luego de la prolongada exposición a la progesterona, de producir prostaglandina (Evans y Maxwell, Wilson et al., citados por Gordon, 1989); que llega al ovario por un mecanismo de contra corriente desde la vena útero-ovárica a la arteria ovárica y que es la responsable de la lisis del cuerpo lúteo. También está descrita la llegada de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ por vía linfática útero-ovárica (Staples y Whyllie, 1984). Según Gordon (1989), la actividad del cuerpo lúteo es autorregulada.

La $\text{PGF}_{2\alpha}$ no tiene efecto luteolítico hasta que no se produce la formación de receptores de LH en las células luteales, determinando que el efecto de la descarga preovulatoria cese totalmente recién a partir del día 4-5 del ciclo (Farin et al. 1986, Harrison et al. 1987).

Alila y Dowd (1991), señalan varios mecanismos posibles por los cuales la $\text{PGF}_{2\alpha}$ ejerce su acción luteolítica: a) disminución del aporte sanguíneo al cuerpo lúteo. Sin embargo es difícil elucidar si en realidad la $\text{PGF}_{2\alpha}$ produce la disminución del flujo sanguíneo o es una consecuencia de otros eventos involucrados en la lisis del CL, b) reducción en los receptores a LH y subsecuente disminución en las señales involucradas en el sistema del AMP cíclico, c) efecto citotóxico directo sobre las células luteales, d) disminución en la utilización del colesterol para la síntesis de P_4 , incluyendo supresión en la síntesis de colesterol

luteal, e) reducción de la actividad de las enzimas esteroidogénicas, f) cambios en la composición lipídica e incremento de la fluidez de la membrana.

2.2 FOLICULOGÉNESIS

Este proceso comienza desde antes del nacimiento de la hembra siguiendo diferentes etapas de crecimiento y diferenciación hasta llegar a un estado de maduración determinado que posibilita finalmente la ovulación.

Gong y Webb (1996) señalan que en estudios previos realizados por Goodman y Hodgen en 1983, en primates y roedores, se usaron términos para describir la foliculogénesis: **reclutamiento** (grupo de folículos del pool inicial comienza a crecer rápidamente); **selección**, definido como el proceso donde sólo los folículos reclutados son seleccionados para seguir desarrollándose y eventualmente establecerse como dominante/s; y **dominancia**, como el mecanismo por el cual el o los folículos dominantes continúan con su desarrollo en un ambiente donde crecen y se desarrollan mientras que los otros folículos reclutados son al mismo tiempo suprimidos (atrésicos). Estos conceptos serán tratados más adelante en forma más detallada.

Ha sido estimado que en ovejas, lleva unos 4 a 6 meses para que el folículo primordial llegue al estado ovulatorio (Cahill y Mauléon, Gosden et al., citados por Gong y Webb, 1996). Estudios recientes demuestran, mediante exámenes histológicos y/o técnicas marcadoras de folículos, que los folículos crecen continuamente y también, por otro lado, que éstos crecen bajo un patrón de ondas (Rubianes et al., 2002). Gong y Webb (1996) relatan que en cada onda folicular existe el crecimiento simultáneo de entre 5 y 7 folículos antrales del pool inicial (éste va decayendo en número a partir de los 7-8 años) mayores a 5mm de diámetro (reclutamiento), donde luego uno de éstos comienza a crecer rápidamente (selección) mientras los demás regresan, es decir, se vuelven atrésicos. La selección continúa hasta llegar a un diámetro de 15 mm (folículo/s dominante/s) y permanecen con ese tamaño máximo durante 2-3 días antes de que regresen, y allí comenzará la nueva onda de desarrollo folicular. En ovinos existirían 3 ondas y que emergen a intervalos de 4-6 días. Rubianes et al. (2002) señalan algunas de las características más frecuentemente observadas de las ondas: 1) el folículo mayor de la Onda 1 es más grande que el folículo mayor de la Onda 2; 2) la tasa de crecimiento desde el día de emergencia (primer día con un diámetro de 3 mm) y el día de máximo diámetro es de alrededor de 1 mm/día; 3) en promedio de 1.2 a 1.5 folículos alcanzan 5 o más mm de diámetro en cada onda pero esto depende de la raza estudiada; 4) el intervalo entre la Onda 1 y la Onda 2 es más largo que entre la Onda 2 y la Onda 3; y 5) los folículos que no alcanzan más de 3 mm de diámetro emergen y regresan de un modo más continuo.

No obstante, aún se requiere confirmar si efectivamente existe en ovinos una funcionalidad de dominancia por parte de los folículos de mayor tamaño (Driancourt et al., citados por Gong y Webb, 1996).

Una característica del folículo dominante es la capacidad de sintetizar mucha más cantidad de estradiol que los subordinados, para lo cual requiere suministro adecuado de andrógenos por parte de las células de la teca.

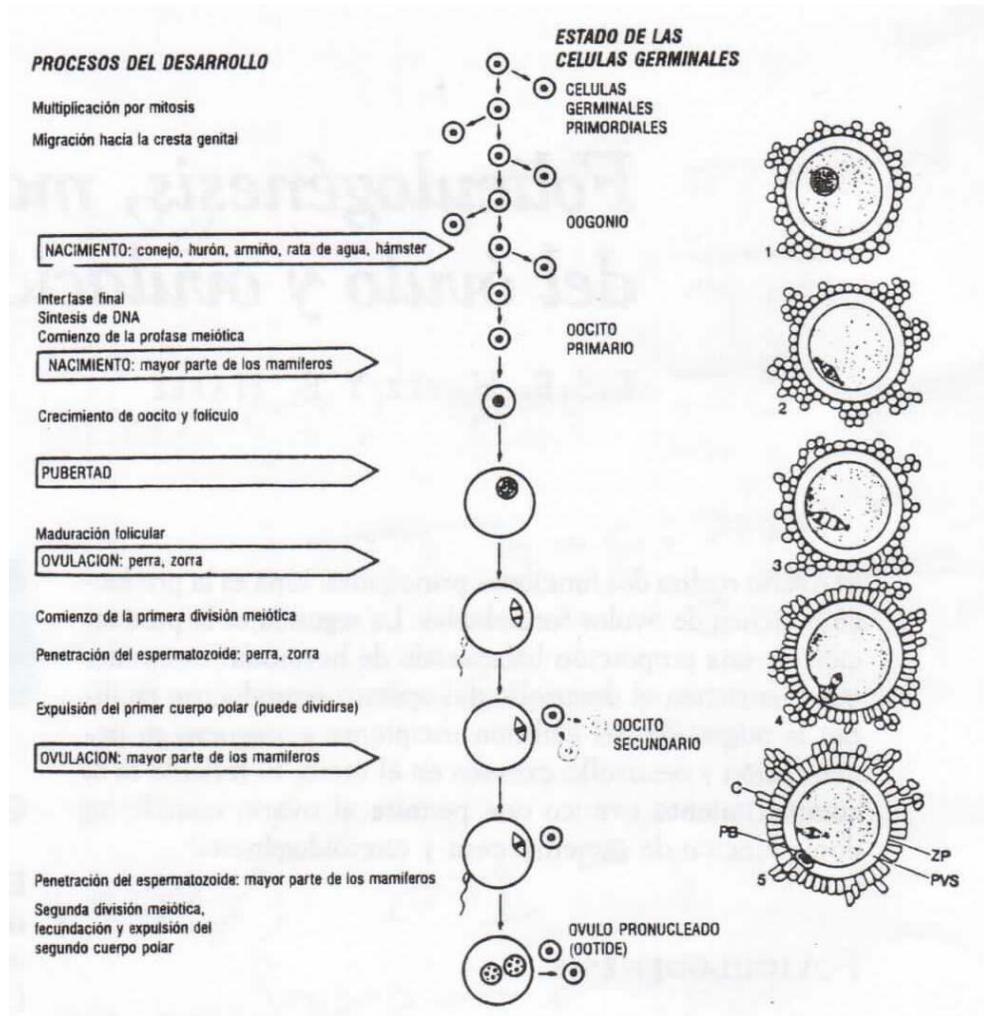
Existe una mínima concentración de FSH debajo de la cual el reclutamiento no procede. La hormona LH aparenta estar mínimamente involucrada en el control del reclutamiento evidenciado por la observación de que el reclutamiento continúa de manera similar en situaciones en donde la frecuencia de pulsos de LH se reduce, es baja o muy baja (etapa prepuberal, anestro posparto) (Driancourt, 2000).

Por otro lado, Rubianes et al., citados por Rubianes et al. (2002), señalan que los niveles supraluteales del esteroide (superiores a los de una fase luteal normal) afectan el crecimiento del folículo mayor promoviendo el recambio folicular. Al mismo tiempo, cuando se inducen niveles subluteales de progesterona, la vida del folículo mayor se prolonga y el efecto de la dominancia sobre los folículos subordinados se extiende (Viñoles et al., citados por Rubianes et al., 2002). Es entonces que la concentración de progesterona circulante juega un rol preponderante en el recambio folicular, que el crecimiento folicular es dependiente de la concentración de LH y está negativamente correlacionado con las concentraciones de progesterona circulante, y que la reducción de su pulsatilidad provoca regresión del folículo dominante de la onda y por lo tanto se levanta la retro-inhibición que los estrógenos producidos por él, provoca la liberación de FSH. De ese modo se incrementa la FSH y una nueva onda folicular emerge. Si la fase de crecimiento o la etapa en que el folículo aún se encuentra en estado de dominante coincide con la luteólisis, sufrirá un rápido crecimiento preovulatorio y eventualmente ovulará (Gong y Webb, 1996).

2.2.1 Ovogénesis

Comienza antes del nacimiento de la cordera, cuando las células germinales primordiales embrionarias dan origen a los gonocitos (50 días de gestación), así, se llega al nacimiento con un número de folículos ováricos que contienen ovocitos primarios, lo que determinará el potencial reproductivo máximo (Fernández Abella, 1993).

Figura No. 3. Representación diagramática del desarrollo de la célula germinal femenina, en el ciclo vital.



Fuente: extraído de Baker por Hafez y Hafez (2002).

El número de folículos al nacimiento es alto y variable. En un estudio basado en observaciones post-mortem se observó un número elevado de folículos entre las 4 y 8 semanas post-mortem y luego declinaba hasta que se estabilizaba al momento de la primera ovulación (Kennedy et al., 1974). El número de folículos crece rápidamente, al unísono que el folículo, incrementando su citoplasma y desarrollando una membrana o zona pelúcida, esto va acompañado de la acumulación de reservas que le permitirán su posterior desarrollo en caso de ser fecundado (Fernández Abella, 1993). Según Hafez y Hafez (2002) cuando un folículo primordial es liberado, comienza a crecer junto con el oocito, siendo el crecimiento de este último casi completo en el momento de la formación del antro, dentro del cual comienzan a acumularse hormonas. Fernández Abella (1993) señala que esta etapa se desarrolla en las

primeras etapas post-nacimiento, para continuar hasta alcanzar la ovulación al comenzar la actividad reproductiva (pubertad). Es al comenzar la etapa adulta que los folículos primordiales comenzarán a desarrollarse escalonadamente para determinar folículos preovulatorios o de Graaf.

Según Driancourt (2000), exámenes diarios utilizando la técnica de ultrasonido, demostraron que la fase de la dinámica folicular se puede dividir en dos períodos de tiempo. Durante el primer período que culmina con luteólisis, el número de folículos creciendo fue mayor que el número de ovulaciones y durante el segundo período que culmina con la ovulación, el número de folículos creciendo fue igual que el número de ovulaciones. Esto se asoció con la presencia de un folículo mayor y la simultánea regresión de los otros folículos reclutados.

A partir de la oogénesis, el núcleo del oocito diploténico permanece en etapa de reposo, normalmente nunca se reinicia la meiosis antes de la oleada ovulatoria de gonadotropinas, esta última suprime la producción del factor inhibidor de la meiosis de las células de la granulosa, la que luego sufrirá modificaciones metabólicas (Hafez y Hafez, 2002)

2.2.2 Crecimiento folicular

El número de folículos en crecimiento disminuye con la edad, influyendo la calidad alimenticia, la época del año y las secreciones hormonales. Tres o cuatro días antes de la ovulación se determina el número de folículos que están prontos para ovular.

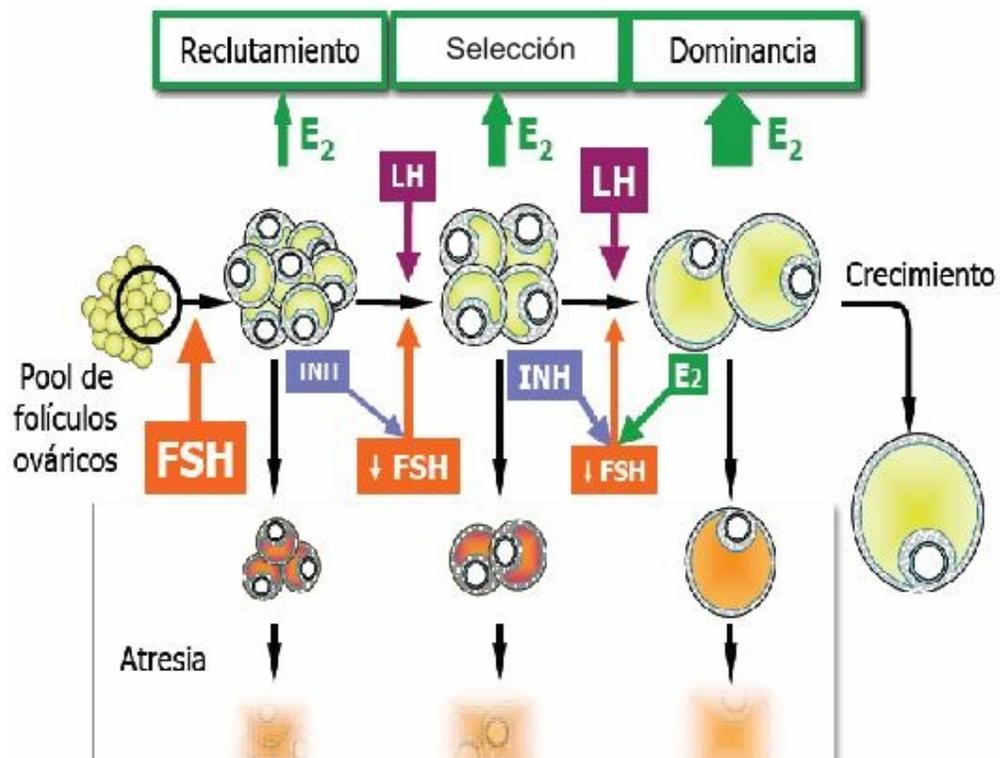
En el crecimiento folicular intervienen la proliferación y diferenciación (inducidas por hormonas) de células de la teca y de la granulosa, lo que finalmente causa un incremento en la capacidad de los folículos de producir estradiol y de reaccionar a las gonadotropinas (Hafez y Hafez, 2002). Según Fernández Abella (1993) el crecimiento folicular puede dividirse en dos etapas, la primera donde el folículo primordial o primario crece hasta alcanzar el estado de pre-antro y la segunda, donde se forma el antro hasta la descarga de gonadotropinas que induce la ovulación.

La capacidad de un folículo en desarrollo para liberar altas concentraciones de estrógenos, que estimulan el crecimiento y diferenciación celular de la granulosa, es fundamental para que éste madure y ovule; así, si es interrumpida la secreción de estrógenos en cualquier etapa, causa atresia de folículos (Hafez y Hafez, 2002).

Según Gong y Webb (1996), los folículos con un diámetro de 2mm o más, responden a la FSH, pero a la vez son independientes de las

gonadotropinas. La FSH juega un rol crítico en el reclutamiento de folículos desde el pool de reserva y la LH tal vez esté más involucrada en la selección del o los folículos dominantes. Fernández Abella (1993) define al crecimiento folicular inicial o preantral como la primera etapa en la que un número de folículos que comienza su crecimiento depende de su reserva y ésta depende principalmente de la alimentación fetal, y que en dicho período no hay un control por parte de las gonadotropinas, son los propios folículos primarios en crecimiento que inhiben los folículos que están en reserva.

Figura No. 4. Esquema de los principales fenómenos que ocurren durante el crecimiento folicular.



Fuente: Senger (2003).

Dado los resultados de varios estudios (la mayoría realizados en ratas), todos coinciden en que el estradiol y la activina promueven el desarrollo folicular y la diferenciación, y previenen la luteinización prematura de folículos (Richard, Hsueh et al., Ireland, Findlay, citados por Gong y Webb, 1996) mientras que los andrógenos, progesterona, inhibina y folistatina aparecen con efectos contrarios (Fortune y Vicent, Hsueh et al., Findlay, citados por Gong y Webb, 1996).

Gong y Webb (1996), Hafez y Hafez (2002) aseguran que factores de crecimiento (reguladores intraováricos) que actúan por mecanismos autócrino y parácrino modulan la sensibilidad de las células blanco a la FSH y LH, bien estimulando o inhibiendo la respuesta a/las mismas. Ellos incluyen a las activinas, inhibinas, IGF-1, EGF, FGF, TGF α , TGF β , TNF α , interleucina-1, interferón gamma y endotelina, aunque sólo algunos han sido demostrados In vivo. Afirman que utilizando el modelo de autotransplante de ovario en la oveja, el EGF, TGF α , FGF básico, inhibinas y el líquido folicular libre de esteroides inhibían la función ovárica, mientras que IGF-1 e insulina tienen un efecto estimulador.

La activina estimula la secreción de FSH y sus receptores son expresados en células de la granulosa, teca y oocitos. Estudios In vitro sostienen que la activina promueve la proliferación de las células de la granulosa y su diferenciación tanto en folículos pequeños como avanzados. Aumenta la estimulación de FSH y P450 aromatasa (P450a) por ende la producción de estradiol. La folistatina, como se señaló en el cuadro No. 1 actúa como modulador de la secreción de FSH.

La inhibina reduce la secreción de andrógenos, lo cual hace que haya una acción positiva en inhibina endógena en células de la teca y aumente la producción de andrógenos (feedback positivo) asegurando que el folículo preovulatorio obtenga suficiente sustrato para aumentar la síntesis de estrógenos. En el folículo dominante hay un aumento de la expresión de la inhibina y folistatina en células de la granulosa posiblemente acompañado por una disminución en la expresión de activina para asegurar que las células de la granulosa reciban adecuado suplemento de P450a aumentando la síntesis de estradiol, lo cual está demostrado por cambios en la expresión de las subunidades de inhibina, activina y folistatina en la foliculogénesis.

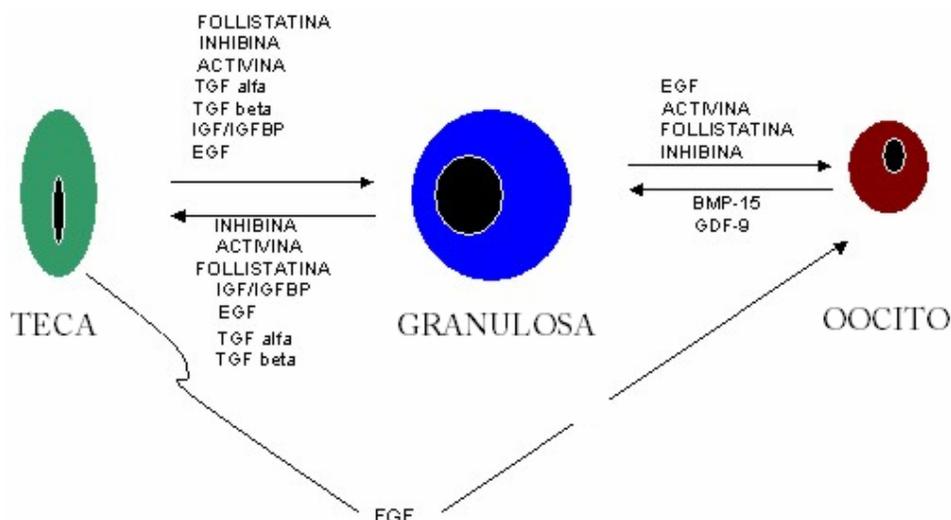
Estudios previos mantuvieron la hipótesis de que la nutrición influía en la funcionalidad del ovario modulando la secreción de gonadotropinas, sin embargo, numerosos estudios en ovejas (Rhind y McNeilly, Downing y Scaramuzzi, Downing et al., citados por Gong y Webb, 1996) y en cabras (Kinder et al., Jolly et al., citados por Gong y Webb, 1996) revelaron que dichos efectos de la nutrición no eran consistentes en la concentración periférica de gonadotropinas). Por lo tanto se propusieron otras hipótesis como por ejemplo que cambios en el metabolismo de hormonas como la de crecimiento (GH), la insulina y factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), los cuales son acompañantes consistentes de la inducción de las alteraciones de la nutrición en el cuerpo energético y del balance proteico, pueden afectar la función del

ovario, bien directamente o mediante la modulación de la acción de gonadotropinas a nivel del ovario (Gong y Webb, 1996).

En ovejas, se reportó que las concentraciones periféricas de GH y ARN mensajero de la pituitaria son aumentados durante la fase folicular del ciclo estral (Landefeld y Suttie, citados por Gong y Webb, 1996). Sin embargo, Davis et al., citados por Gong y Webb (1996), no encontraron efectos al administrar GHr (GH recombinante bovino) en la tasa ovulatoria y Eckery et al., citados por Gong y Webb (1996) demostraron que tratamientos con GHr no cambiaban la población folicular. En contraste, muchos estudios utilizando modelos de autotransplante de ovarios han demostrado que la infusión de GH, insulina y IGF-1 alteran el desarrollo folicular (Gong y Webb, 1996). Es recientemente demostrado que reemplazando por altas concentraciones fisiológicas de FSH y LH purificada, o de PMSG (gonadotropina sérica de yegua preñada) y HCG (gonadotropina coriónica humana) fallan en la estimulación del desarrollo de folículos adicionales de un diámetro menor o igual que 2 mm en ovejas hipofisectomizadas, sin embargo, el desarrollo del folículo puede estar inducido por el uso de preparaciones de FSH pituitaria o por un tratamiento adicional con GHr (Sawyer et al., Eckery et al., citados por Gong y Webb, 1996). Estos resultados indican la mayor importancia que tiene la GHr y factores de crecimiento (IGF-1 e insulina) en el desarrollo adicional de folículos que son independientes de gonadotropinas.

Las clásicas hormonas metabólicas (GH, IGF-1 e insulina) están involucradas en las etapas tempranas de la foliculogénesis, incrementando el tamaño del pool de folículos con respuesta a gonadotropinas o en la población de folículos dependientes de éstas. Estos efectos podrían estar implicados en mecanismos fundamentales de la influencia de la nutrición en la performance reproductiva de ovejas y cabras (Gong y Webb, 1996). Estos mismo autores creen estar seguros que las bases fisiológicas de la selección y dominancia folicular y que la representación de mecanismos fundamentales en el control de la tasa ovulatoria natural en ovejas y cabras, es debido a la expresión diferencial de dichos factores estimuladores o inhibidores y sus receptores que determinan las diferencias en el destino de folículos individuales que comparten el mismo ambiente de gonadotropinas.

Figura No. 5. Factores correguladores del crecimiento y diferenciación folicular independiente de gonadotropinas.



Fuente: Philip (2003).

El crecimiento folicular y atresia están influenciados por cambios en las concentraciones de IGF-1 y por los cambios en los niveles de IGFBP. En folículos atrésicos se presenta mayor cantidad de IGFBP-4 lo que significa que participa en el proceso de selección. Actuando en la inhibición de la acción de IGF-1 (Figura No. 5).

Estos factores intervienen en la proliferación de las células de la granulosa como las células de la teca, en la maduración del oocito, en la regulación de la acción de las gonadotropinas modificando la expresión de sus receptores, estimulan la producción de estrógenos y aseguran el sustrato de andrógenos hacia las células de la teca y hacen efectiva la actividad de la enzima P450a. Juegan un papel importante en el proceso de dominancia y atresia folicular (Figura No. 5).

2.2.2.1. Crecimiento folicular terminal y maduración

El crecimiento y maduración folicular representan una sucesión de transformaciones subcelulares y moleculares de diversos componentes del folículo: el oocito, granulosa y teca, regidas por varios factores intraováricos e intrafoliculares y señales hormonales que conducen a la secreción de andrógenos y estrógenos (principalmente estradiol) (Hafez y Hafez, 2002).

El reclutamiento folicular es una etapa que comienza aproximadamente 72 h antes de la ovulación, en la fase luteal del ciclo estral pudiendo seguir en la fase folicular. Los folículos capaces de transformarse en folículos preovulatorios son los que poseen antro, con un diámetro igual o mayor a 2mm creciendo a una velocidad que dependerá del tamaño (Fernández Abella, 1993). Este es un paso clave en la maduración, ya que permite al folículo producir estradiol a partir de precursores androgénicos producidos de la célula de la teca (Driancourt, 2000).

La folistatina es producida por la población de folículos con antro que vienen creciendo y aumenta a medida que aumenta el tamaño folicular; como consecuencia, aumenta la activina e inhibina.

El reclutamiento de la población de folículos conteniendo el futuro folículo ovulatorio tiene una duración de entre uno y tres días en ovinos. Sólo folículos dependientes de gonadotropinas son reclutados. Todos los folículos reclutados son potencialmente capaces de ovular.

En corderas, estudios usando ultrasonografía transrectal de ovarios mostraron que el reclutamiento folicular y su desarrollo incrementan a partir de los primeros 2 meses de edad y justo antes de la pubertad.

Al momento de la selección, un folículo será dominante y el resto de los folículos de la población se atresian. Existen pasos claves asociados con la selección y la aparición del folículo dominante: 1) la aparición de los receptores de LH en las células de la granulosa es pre requisito para el establecimiento del folículo dominante y ovulación siguiendo un pico de LH (Driancourt, 2000) y 2) una reducción en la concentración de proteínas IGF, como IGFBP2 e IGFBP4 que aparenta estar controlada por la reducción de producción (IGFBP2) o por un incremento de proteólisis (IGFBP4). Esto ocurre cuando el folículo tiene aproximadamente 8mm de diámetro (ver figura No. 5).

El proceso de selección ha sido ampliamente estudiado y existen dos teorías que explican los mecanismos involucrados. En la primera, la selección es controlada únicamente por mecanismos endócrinos (reducción de FSH) y en la segunda, existe la producción de componentes por parte del folículo mayor lo que directamente inhibe el desarrollo de los otros folículos reclutados. En ovinos es más importante el primer mecanismo (ver Figura No. 4).

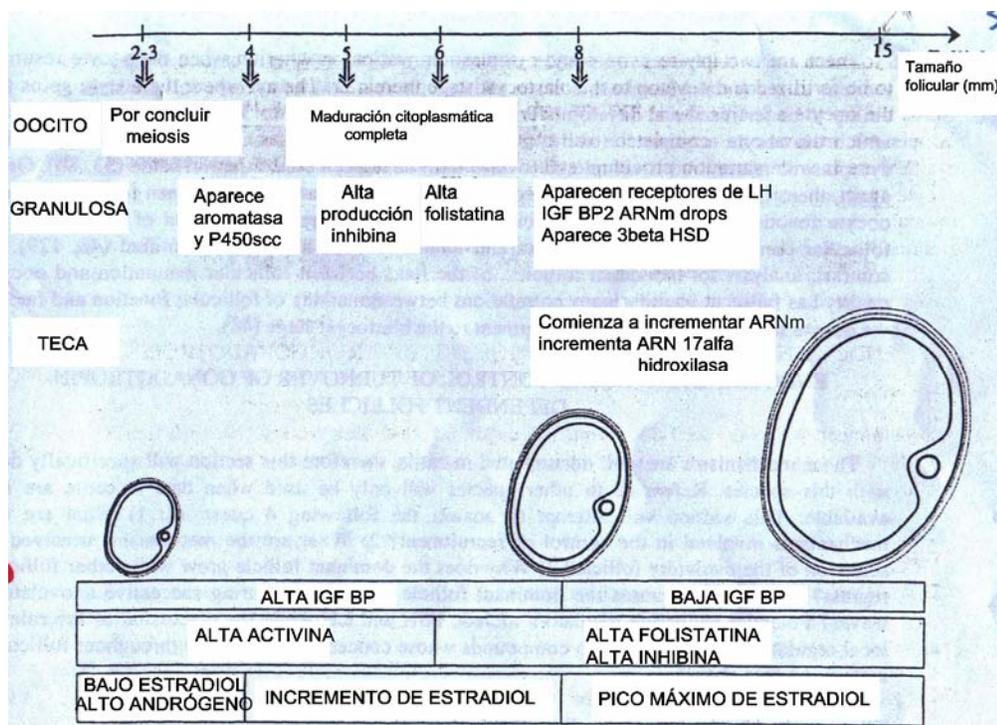
La idea de disminución de la concentración de FSH, lo que ocurre entre 2 y 3 días después del reclutamiento, es un mecanismo clave en el proceso de selección. La disminución de FSH es causada por una acción combinada de inhibina y estradiol que son producidas por folículos mayores de 5mm de diámetro y actúan a través de un feedback negativo en la glándula pituitaria. El

agregado exógeno de FSH resultó en imposibilidad del proceso de selección, también el agregado de una sustancia antagónica de FSH resultó en la atresia de la población de folículos, concluyendo y demostrando que la depresión de FSH determina atresia (Driancourt, 2000).

En general se asume que el mayor de los folículos de la población sea el futuro dominante y ovulatorio, aunque el proceso es muy complejo y todos los folículos son funcionalmente diferentes.

El folículo seleccionado aparenta ser el primero que desarrolla los receptores de LH en la célula de la granulosa, en ovinos esto sucede cuando el folículo alcanza los 4mm.

Figura No. 6. Resumen de las etapas más importantes de la diferenciación del oocito, célula de la granulosa y teca, así como el desarrollo folicular durante la foliculogénesis y la dependencia de hormonas gonadotrópicas.



Fuente: Driancourt (2000).

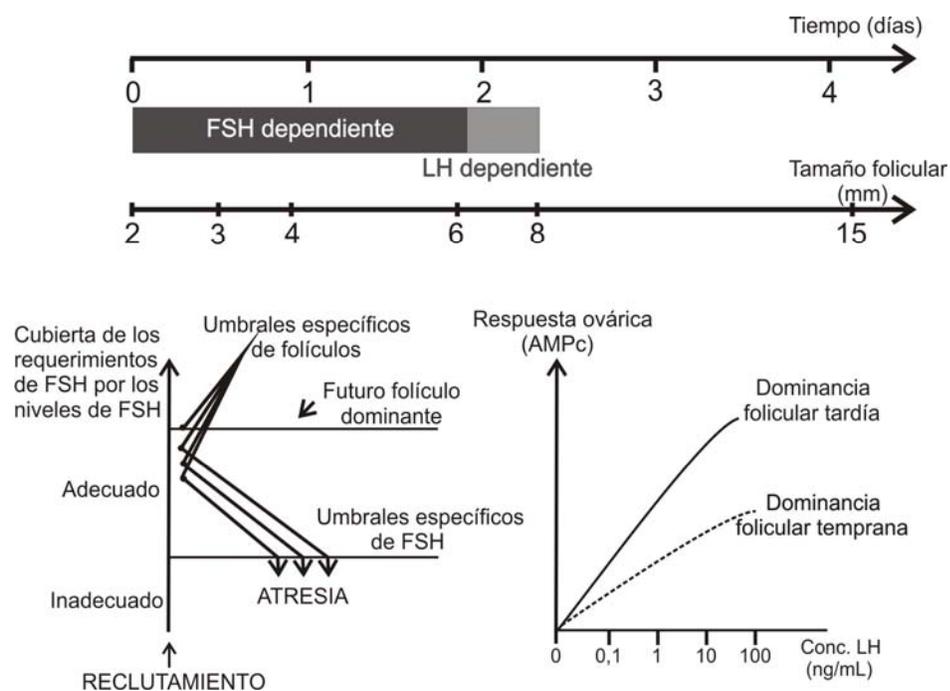
Durante la dominancia folicular ocurre el crecimiento y maduración del folículo preovulatorio, mientras los otros folículos regresan completamente por atresia. En esta etapa no ocurre reclutamiento. Existe una relación directa entre la presencia del folículo dominante y la ausencia de reclutamiento. Para que un

folículo primario llegue a preovulatorio transcurren 6 meses, en donde la etapa terminal se lleva a cabo en 30-40 días.

El temprano incremento en el número y tamaño de folículos en corderas es posible, al menos en parte, se deba a cambios en la liberación y potencia de FSH, y la mayor producción de folículos anteriormente a la primera ovulación probablemente sea causada por un incremento en la frecuencia de pulsos de LH.

La selección es la etapa terminal del crecimiento folicular y consiste en la selección de uno o más folículos dominantes y la atresia de los otros folículos. Lo que permitiría que un folículo se vuelva dominante con respecto al resto sería la mayor producción de estrógenos, a su vez los que presentan mayor producción de estrógenos son los de tamaño más grande, lo cual aumentaría la posibilidad de ser dominante.

Figura No. 7. Requerimientos de gonadotropinas dependiendo del tamaño folicular.



Fuente: Driancourt (2000).

Debajo en la figura No. 7 se puede observar los mecanismos que modulan la respuesta a la FSH (gráfica de la izquierda) o LH. La respuesta del ovario a la FSH opera a través de pulsos los cuales son específicos para la

hembra y folículo. La respuesta del ovario a la LH es modulada por la etapa de la dominancia folicular y asociada a cambios en los receptores de LH.

La LH es la hormona clave involucrada en el desarrollo final del folículo dominante mientras los otros folículos se atresian (figura No. 7). Agregados exógenos de pulsos de LH, luego del parto donde los pulsos de LH son limitados, resultan en un incremento máximo en diámetro del folículo dominante y un incremento en la duración de la dominancia. Tratamientos con antagonistas de la GnRH, lo que suprime los pulsos de LH, bloquearon el desarrollo folicular al tamaño en donde el folículo se vuelve dominante (8mm). El balance hormonal requerido para una exitosa transición folicular involucra un descenso progresivo en las concentraciones de FSH combinado con una alta secreción de pulsos de LH (Driancourt, 2000).

El folículo dominante es muy sensible a los pulsos de LH, por lo que cambios en el patrón de secreción de pulsos pueden afectar su desarrollo y así volverse atresicos. Aumentos en la concentración de progesterona resultan en un 50 % de reducción de la frecuencia de pulsos de LH. Esto coincide con lo observado en el momento que se atresia el folículo en una primer onda del ciclo que coincide con el pico de concentración de progesterona y una mínima frecuencia de pulsos de LH (Driancourt, 2000).

2.3 CORRIEDALE BOORoola

En nuestro país esta variedad surgió como resultado de numerosos cruzamientos de la raza Corriedale y también Merino con carneros portadores de la mutación Booroola (Fernández Abella, 1994). Se trataba de dos carneros provenientes de Nueva Zelanda adquiridos por el establecimiento Santa Elena de Guarapirú en el departamento de Paysandú, los cuales fueron introducidos en 1970 (Fernández Abella, 1991) confirmando la presencia en forma homocigota del alelo Fec^B "gen Booroola" mediante prueba de progenie (Fernández Abella, 1991).

Posteriormente, estos carneros fundadores fueron empleados en programas de selección, obteniendo por lo tanto rebaños Merino y Corriedale con buen nivel genético para la producción de lana y fenotípicamente similares al Corriedale, pero con altas tasas de ovulación (Fernández Abella, 1995b, 1996).

La evaluación de los efectos de dicha introducción no ha sido del todo sistemática, pero es posible afirmar que el balance neto de la introducción del gen es positivo (Fernández Abella, 1987, 1995a), ya que los resultados de cruzamiento con Corriedale e Ideal demuestran que sería posible el incremento

de los porcentajes de señalada de las majadas encarneradas en cualquier época del año (Fernández Abella, 1987).

2.3.1 Origen del “gen Booroola” (Fec^B)

Según Davis et al. (2002) el origen de la mutación Booroola es de la raza Garole, originada en los pantanos de Bengala Occidental en India. Dicha mutación ha sido recientemente encontrada en ovejas de cria nativas en India, China e Indonesia y es la misma que el gen Fec^B de Merino Booroola de Australia derivado de importaciones de la raza Garole de la India en los años 1792 y 1793 (Fogarty, 2009).

Una serie de experimentos realizados en Australia y Nueva Zelanda confirmaron la existencia de dicho gen mayor (Davis et al. 1982, Piper et al. 1985). Al mismo tiempo, Piper y Bindon (1982) postularon que la presencia del gen principal Fec^B explicaba mayor fecundidad. Se han testado en 21 razas y líneas prolíficas la presencia del Fec^B (Davis et al., 2006), por lo que se podría afirmar que se trata de un mismo gen.

Actualmente se conoce que se trata de un gen autosómico de efecto principal (Davis et al. 1992, Walling et al. 2000, Fernández Abella et al. 2005, Fabre et al. 2006), denominado gen Booroola (Fec^B), que posee dos alelos denominado B y + (salvaje); el alelo B incrementa marcadamente la tasa ovulatoria en ovejas, con un efecto aditivo, adicionando con cada copia del gen un promedio 1.0 a 1.5 óvulos (Davis et al. 1982, 2001, Piper et al. 1985, Wilson et al. 2001, Davis 2004). Su presencia puede originar niveles de prolificidad muy elevadas por su efecto sobre la tasa ovulatoria en las ovejas (Piper y Bindon et al. 1982, 1996, Davis et al. 1991, Davis 2005).

Por otro lado, según una ardua revisión elaborada por Fogarty en el 2009, el efecto de las medias ponderadas para aquellas ovejas que portan una copia del gen Fec^B (B+) es de 1,3 (con un rango de 0,8 a 2,0) para tasa ovulatoria y de 0,7 (rango de 0,4 a 1,3) para el tamaño de camada (prolificidad), además menciona que el efecto de una segunda copia (BB) es en general de efecto aditivo para la primer característica mientras que mantiene poco o nulo aumento en el segundo caso (prolificidad).

Existen actualmente, técnicas más avanzadas que permiten verificar más exactamente la presencia, ubicación y características de dicha mutación. Se trata de los marcadores moleculares, los cuales han sido encontrados en el cromosoma 6 en ovejas (Montgomery et al., 1993, 1994). También se demostró que el efecto del gen Fec^B se debe a una mutación en la proteína morfogenética ósea (BMP) receptor 1B (BMPR-1B) (Mulsant et al. 2001, Souza et al. 2001,

Wilson et al. 2001). Posteriormente, mediante la técnica de PCR, que permite la rápida, sencilla y eficiente detección de nucleótidos polimórficos, se detectó a BMPR – IB en el locus A746G (Fabre et al. 2006, Guan et al. 2007).

El efecto aditivo sobre la tasa ovulatoria determina que no sea recomendable el manejo de ovejas homocigotas ya que ocasiona un alto porcentaje de preñeces cuádruples y quíntuples, determinando altas tasas de mortandad neonatal y de ovejas, es por esto que los cruzamientos deben estar basados en el uso de madres heterocigotas ($Fec^B Fec^+$), mientras que los machos a utilizar deben mantener en su genotipo una doble copia del gen ($Fec^B Fec^B$) con el fin de asegurar ser transmitido a la descendencia.

2.3.2 Efecto del gen Fec^B en la hembra

2.3.2.1 Pubertad

Resultados generados por investigación sobre la pubertad en ovinos portadores del gen Fec^B sugieren que el gen Fec^B no determina una precocidad importante y que tal vez su expresión varíe según los genotipos ($Fec^B Fec^B$ vs $Fec^B Fec^+$) y/o razas donde se encuentra presente (Fernández Abella, 2005).

2.3.2.2 Tasa ovulatoria

Su presencia puede originar niveles de prolificidad muy elevados por su efecto sobre la tasa ovulatoria en las ovejas (Piper y Bindon et al. 1982, 1996, Davis et al. 1991, Davis 2005).

En hembras portadoras se ha observado una mayor cantidad de folículos durante la primera ola de desarrollo folicular de la fase luteal, y que su maduración ocurre a menor tamaño respecto a animales no portadores (Souza et al., 1997, 2004). Esa mayor cantidad de folículos tienen un diámetro significativamente menor, lo cual da lugar a cuerpos lúteos también de menor tamaño (Driancourt et al. 1985, McNatty et al. 1986, Souza et al. 1994).

La acción del gen Booroola se ha asociado desde un comienzo a un aumento significativo de la FSH durante el ciclo estral (McNatty et al. 1986, Bindon et al. 1996). Según esta visión, el mayor determinante de la tasa ovulatoria en ovinos, estaría dada por la cantidad de FSH que llega al ovario (McNatty et al., 1985). Según Souza et al. (1997), las secreciones totales de la hormona ovárica involucradas en el control de la secreción de FSH es la misma, tanto en hembras portadoras como no portadoras. Esto se debe a que, a pesar

de que los folículos ovulatorios y cuerpos lúteos son más pequeños, son a la vez más numerosos en las hembras portadoras de Fec^B , resultando de tal forma en una secreción total similar (Campbell et al., 2003). De acuerdo con este estudio, el gen Booroola no tendría efecto sobre la secreción de la hormona ovárica; no siendo esenciales las altas concentraciones de FSH para la acción del gen.

También se sugiere que el gen actuaría a nivel del ovario a través de la proteína morfogénica del hueso, aumentando la tasa ovulatoria en heterocigotos portadores y bloqueando el desarrollo folicular en homocigotos portadores (Montgomery et al., 2001). De tal forma, las altas tasas ovulatorias estarían determinadas principalmente por factores de estimulación e inhibición intra-ováricos, así como por la presencia y número de receptores de hormona FSH y LH en las células de la granulosa (Souza et al., 2003, 2004).

Fogaty (2009) señala que la mutación provoca la maduración precoz de los folículos ováricos mediante el aumento de la sensibilidad de los mismos a la FSH y no mediante el aumento de las concentraciones circulantes de la misma, reafirmando lo antes mencionado. Muchos estudios han demostrado la existencia de otros genes, además del Fec^B , que tienen también un efecto mayor en la fecundidad (Davis et al., 2005).

En términos generales, Fogarty (2009) señala en su revisión que la ventaja de las ovejas cruza con Merino Booroola según promedios ponderados, es de 0,94 para tasa ovulatoria, 0,70 para el tamaño de camada y de 0,23 para el número de corderos destetados. Por su lado, Piper y Bindon en 1988 mostraron que con una copia del alelo Fec^B se incrementa la tasa ovulatoria en 1,0 a 1,5 óvulos y en el tamaño de camada lo hace entre 0,8 y 1,2 corderos nacidos, para una serie de combinaciones genotípicas y ambientales. Luego, en 1995, Fernández Abella (1995a) señala que la tasa de ovulación media en otoño (máxima actividad reproductiva en ovejas Corriedale) varía entre 4,3 y 5,0 en la hembra Booroola homocigota ($Fec^B Fec^B$), de 2,8 a 3,0 en hembras heterocigotas para este gen y que en la primavera el nivel de ovulación es de aproximadamente un 70% del observado en el otoño.

A continuación se presenta un cuadro comparativo de las tasas de ovulación según el genotipo, la estación del año y la edad de la hembra:

Cuadro No. 2. Tasa ovulatoria en otoño y primavera según la presencia o no del gen Fec^B .

GENOTIPO	TASA DE OVULCIÓN		FUENTE
	OTOÑO	PRIMAVERA	

Ovejas adultas			
Fec ^B Fec ^B	4,3	3,1	Bindon et al. (1982)
Fec ^B Fec ⁺	2,8	2,2	
Fec ⁺ Fec ⁺	1,7	1,1	
Borregas (12 a 18 meses)			
Fec ^B Fec ⁺	2,87	2,15*	Fernández Abella (1985a)
Fec ⁺ Fec ⁺	1,37	1,02*	

*Ovulación observada luego de la sincronización de las borregas con esponjas de Fluorogestona (40mg) y posterior introducción del macho.

Fuente: Fernández Abella (1995a).

2.3.2.3 Actividad del ovario (foliculogénesis)

La elevada tasa ovulatoria de la ovejas Booroola es debida en parte a una menor atresia folicular (Scaramuzzi y Turnbull 1980, Cahill et al. 1982, Driancourt 1985) y por otra parte al reclutamiento continuo de folículos pre-ovulatorios desde el día 13 al 16 del ciclo estral (Driancourt et al. 1985, González Bulnes et al. 2004). Por otro lado el patrón pulsátil global de la LH, por acuerdo general, no sería diferente en las hembras prolíficas (Bindon et al., 1996).

Existen otros mecanismos propios de las ovejas que poseen el gen Fec^B, entre éstos se puede citar:

Cuadro No. 3. Algunos mecanismos que diferencian las ovejas portadoras del gen Fec^B.

Autor/es	Mecanismo diferencial propio de la oveja portadora con el gen FecB
Driancourt et al. (1985)	Folículos preovulatorios con capacidad de "esperar" el pico preovulatorio de LH.
Baird et al. (1982), Mc Natty et al. (1985, 1986)	Folículos preovulatorios tienen la mitad de células de la granulosa respecto a no portadoras, determinando la formación de cuerpos lúteos de pequeña talla.
Cummins et al. (1983)	Menor cantidad de inhibina en el ovario, lo cual influye en el control de la secreción de FSH.
Ms Natty et al. (1986)	El menor contenido de inhibina se le atribuye al menor tamaño folicular

Fuente: extraído de Fernández Abella (1995a).

2.3.2.4 Duración de la estación reproductiva y estro

Presentan una estación sexual más larga y un 40% más de ciclos estrales por año (Bindon y Piper, 1982), los Merinos Booroola respecto al Merino. Sin embargo, la hembra portadora no comparte con otras razas prolíficas el hecho de reiniciar tempranamente la actividad ovárica posparto, como sucede en Finsheep y Romanov (Bindon et al., 1996). Cabe destacar que en dichas razas prolíficas, así como en la mayoría de otras razas de ovinos, los estros se caracterizan por ser más largos (Land, Hanrahan y Quirke, Bindon et al., citados por Fernández Abella, 1995a), lo que no sucede con el Merino Booroola, el cual mantiene una duración similar a la de otros Merino (29 horas) (Bindon et al., 1982), pero, sin embargo, disminuye el intervalo entre pico de LH y la ovulación (aproximadamente entre 5 y 7,5h) respecto a la de la especie ovina que es de 24h (Cumming et al., 1973).

Cabe destacar que en hembras homocigotas para el gen Fec^B así como en otras razas prolíficas como Romanov y Finesa, la ovulación comienza varias horas antes de haber culminado el celo, y no hacia el final del mismo como sí sucede en razas o líneas de baja prolificidad (Fernández Abella et al., 1995a).

2.3.3 Efectos del gen Fec^B en el macho

El comportamiento reproductivo de los machos en el cruzamiento Booroola, no determina una precocidad sexual más importante. Se reporta una actividad sexual exacerbada, con un mayor número de montas por servicio que en Merino no prolíficos (Walker et al., 1985); lo cual ha sido observado también en machos resultado de la cruce Merino Booroola¹.

2.3.3.1 Modificaciones endócrinas

En el período pre-puberal, se observan niveles superiores de FSH asociado a la presencia del gen Booroola, aunque la magnitud de dicha diferencia es pequeña, impidiendo separar correctamente las variaciones individuales entre los genotipos (Fernández Abella, 1995a).

En carneros adultos los niveles de gonadotropinas (LH y FSH) no se ven modificadas por la presencia del gen Fec^B (Seck et al., 1991). Sin embargo, en

¹Fernández Abella, D. 2010. Com. personal.

otras razas prolíficas como Romanov y Finesa, los niveles de LH se incrementan durante el período postnatal, no así la FSH (Lafortune et al., 1984). En estas razas los niveles de testosterona son elevados, mientras que en machos Fec^B , los niveles son similares a los observados en no portadores. En estudios realizados en nuestro país a partir de animales resultantes de cruzamientos entre Merino Booroola y Corriedale, e Ideal o Merino, se han confirmado mucho de los efectos del gen Fec^B (Fernández Abella, 1987, 1995a), indicando que la introducción del gen en nuestras razas es un aporte viable para obtener mejoras en la prolificidad.

El componente reproductivo determinante de los incrementos más significativos en cuanto a la fecundidad ovina, esta dado por la prolificidad o tamaño de la camada; siendo la utilización de razas prolíficas clave para lograr altas tasas de destete.

Dentro de las desventajas asociadas a los fenotipos Booroola, la más marcada es el bajo peso al nacer que presentan los corderos portadores del gen respecto a los no portadores. Se ha relevado en estudios recientes, la no existencia de un efecto pleiotrópico del gen Booroola sobre dicha característica (Walling et al., 2000). Sin embargo, se detectó la existencia de otro locus estrechamente ligado al Fec^B , que sí afectaría el crecimiento desde el nacimiento hasta el destete (Walling et al., 2000).

2.4 MULTIOVULACIÓN Y TRANSFERENCIA DE EMBRIONES (MOTE)

Este programa biotecnológico utiliza en forma simultánea ambos progenitores genéticamente superiores lo que implica avanzar más rápidamente que los métodos de inseminación artificial, ya sea por vía cervical como intrauterina, obteniendo un mayor progreso genético anual (Fernández Abella, 2006), dado que el rápido avance genético se logra al disminuir el intervalo entre generaciones y especialmente, al ejercer un mayor diferencial de selección en los padres (Cardellino y Rovira, 1987).

Implica en primer término, seleccionar la hembra donante así como el macho o semen a utilizar, éstos serán considerados “mejores” según los objetivos y criterios utilizados en la selección, luego, mediante un tratamiento donde se combinan diferentes hormonas reproductivas se induce la super o multiovulación en la hembra denominada como donadora. Se procede con la colecta de los embriones y finalmente se realiza la criopreservación y transferencia, o bien, la criopreservación en medio congelado (Fernández Abella, 2006), según cuál sea el destino final de dichos embriones. Esta biotecnología se la ha utilizado para hacer aumentar poblaciones de caprinos escasos y caros (Gordon, 2006).

La primer transferencia de embriones (TE) se remonta a la realizada por Walter Heape en Inglaterra hace más de un siglo; Tim Rowson y asociados, trabajando en Cambridge con ovejas a mediados de la década de los 50, mostraron la utilidad de la TE como herramienta de investigación y ha sido usada en muchos aspectos de la investigación en reproducción de la década (Gordon, 2006), aunque según Armstrong y Evans (1983) fue realizada por Warwick y Berry en 1933 en ovejas y cabras.

En Uruguay, la primer transferencia de embriones ovinos la realizó Aníbal Durán del Campo en el año 1969, posteriormente, en 1978, Cavestany, Hughes, Cash y Durán del Campo realizan otros trabajos (Cavestany et al., 1979).

Al presente, se conoce que la TE en los pequeños rumiantes tiene el potencial de facilitar el movimiento seguro del plasma germinal por todo el mundo siempre que se tomen medidas preventivas adecuadas contra las enfermedades en el manejo de los embriones y animales, igualmente puede ser un método para evitar la trasmisión de enfermedades a la descendencia (Gordon, 2006).

En Uruguay, recién en el 2001 se realizan comercialmente y por rutina los primeros **programas de multiovulación y transferencia de embriones (MOTE)** en número importante de dadoras o donantes de embriones ovinos

SAMM y Dorper por un equipo uruguayo (Fernández Abella, 2006). Unos dos años antes, el equipo de Rubianes de la Facultad de Veterinaria, que desde la década del 90' investiga en el área, aplica un programa MOTE en el ámbito comercial en dadoras de la raza Corriedale. En el año 1996, Boggio Devincenzi realiza trabajos de recolección y congelación (convencional y vitrificación) de embriones Corriedale en la cabaña "Granja Roland" del Dr. Caorsi en Trinidad. En el 2000, los doctores Lago y Perdigón también realizan trabajos experimentales de recolección de embriones ovinos (Fernández Abella, 2006).

Según Bonino et al. (1989) debe tenerse en cuenta la raza donante, tipo de servicio, factores ambientales, nutricionales y sanitarios, así como el número de progenies de la donadora, la edad de ésta y el carácter a seleccionar. Se logran mayores éxitos con embriones de ovejas adultas que con jóvenes (Smith, citado por Fernández Abella, 2006), aunque según Bari et al. (2000), las más jóvenes tienen mayor porcentaje de embriones de alta calidad (transferibles).

Dado que en la mayoría de los casos el objetivo es la mejora genética, las dadoras deben tener un valor genético evaluado a través de su progenie (Fernández Abella, 2006), por ende, es deseable que sean múltiparas, es decir de al menos 1,5-2 años de edad. No obstante, esta biotecnología es utilizada para introducir o multiplicar una raza exótica, de alto valor o escasa (Fernández Abella 2006, Gordon 2006)

El costo de todo el proceso es muy alto (hormonas, recursos humanos, otros) en términos relativos, lo que limita la aplicación a gran escala en nuestro país (Bonino y Sienna, 1986). Cabe destacar que la alta variabilidad en la respuesta, a los diferentes tratamientos de superovulación es la principal causa de fracaso y es común para todos los protocolos conocidos hasta el momento (Azzarini 1992, Gong y Webb 1996). Actualmente se practica casi exclusivamente en establecimientos cabañeros, donde la mejora genética es el principal objetivo de producción, es decir, lograr reproductores genéticamente mejores. Dado esto, la imposibilidad práctica de canular el cuello uterino y la heterogeneidad en la respuesta superovulatoria, en ovinos no se ha aplicado tanto como en bovinos (Fernández Abella, 2006).

2.4.1 Producción mediante multi o superovulación

Las primeras descripciones de superovulación para la producción de embriones se remontan a Smith y Engle en 1927, que usaron preparados a base de adenohipófisis para inducir el incremento cuádruple en la ovulación de ratas y ratonas (Gordon, 2006).

Hasta la fecha se ha venido investigando en muchos países la manera de estimular al animal para provocar la super o multiovulación, es decir la forma

de producir la mayor cantidad de ovocitos, que éstos lleguen a madurar adecuadamente de manera de ser expulsados (ovulación) para finalmente ser fertilizados y así obtener un alto número de embriones viables, en otras palabras, una tasa ovulatoria mayor a la esperada normalmente y una efectiva fertilización, esto se logra mediante el uso de gonadotropinas (Azzarini 1992, Fernández Abella 2006). La variación genética de la tasa ovulatoria evidenciada en condiciones naturales de reproducción, puede no estar controlada por los mismos genes que determinan la respuesta a los métodos artificiales de multiovulación (Azzarini, 1992).

La superovulación puede ser afectada por diversos factores, entre los que se encuentran el tipo o fuente de gonadotropina (Azzarini 1992, Aké López et al. 2003), la dosis de gonadotropina empleada (Aké López et al., 2003), la relación FSH/LH, la edad, la raza, la época y otros (Azzarini, 1992). La utilización de FSH porcina (pFSH) genera la formación de anticuerpos, lo que no ocurre con la FSH ovina (oFSH). No obstante, la respuesta ovulatoria es muy variable entre distintas partidas de oFSH (Fernández Abella, 2006). Cuando se utiliza FSH que contiene o está contaminada con cierta proporción de LH, la respuesta disminuye (Chupin et al., Donaldson et al., citados por Aké López et al., 2003), sin embargo otros trabajos muestran que la aplicación de FSH junto con una cantidad conocida de LH puede incrementar la misma (Chupin et al., Wierzchos et al., citados por Aké López et al., 2003). Según Joyce et al. (1998), la estimulación de folículos con FSH reduce la concentración de estrógenos y testosterona, y tiene una baja incidencia en el fenómeno de atresia.

Diversos estudios demuestran que al utilizar FSH se obtiene mejor respuesta a la superovulación que cuando se utiliza la gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG) (Armstrong y Evans 1983, Jabbour y Evans 1991).

La FSH, cuando es utilizada para inducir la multiovulación en cabras se administra normalmente en dos veces al día dado su corta vida (Armstrong, 1983), una sola inyección resulta en una menor tasa ovulatoria y un menor número de embriones colectados comparados con dos dosis diarias (Chupin y Procureur, citados por Batt et al., 1993).

Extractos de la pituitaria del caballo y FSH pituitaria preparada comercialmente (Armstrong y Evans 1983, Jabbour y Evans 1991), de origen porcino, ambas han sido usadas como gonadotropinas alternativas a la PMSG y se sugiere que producen ovocitos de mayor calidad que esta última. También existe la posibilidad de usar la HMG (gonadotropina de menopausia humana) pero además de ser cara, no es más eficiente (Azzarini, 1992). Altas dosis de PMSG pueden estimular el desarrollo de folículos grandes y por ende su persistencia y pueden afectar negativamente la fertilidad (Bindon y Piper 1982, Robinson et al., Evans y Robinson, citados por Jabbour y Evans 1991). A su

vez, podría no solo incrementar el número de folículos, sino también la tasa de crecimiento de cada folículo individual (Turnbull et al., citados por Jabbour y Evans, 1991), resultando en un mayor número de células productoras de esteroides dentro del folículo, lo que Jabbour y Evans (1991), agregan que existe un efecto negativo en el transporte de espermatozoides y en el ambiente útero tubárico para los embriones, aunque según Azzarini (1992), los resultados pueden mejorarse con el uso de combinado de gonadoliberina (GnRH) o suero anti-PMSG.

Desafortunadamente, la PMSG es también luteinizante (como la LH), lo que puede causar efectos no deseados como la maduración anormal de oocitos (Kumar et al., citados por Batt et al., 1993) asociado con una alta frecuencia de regresión temprana de CL (Armstrong, citado por Batt et al., 1993). Sin embargo, los resultados de Jabbour y Evans (1991) demuestran que la PMSG es más esteroidogénica en ovejas y que utilizando ésta en combinación con dosis decrecientes de FSH resultan ser menos perturbadoras en términos de los niveles y patrones pre-ovulatorios de secreciones de estrógenos y LH, y al mismo tiempo, se logra un ambiente más favorable para la fertilización y desarrollo embrionario temprano dentro del tracto reproductivo de la hembra. Batt et al. (1993) señala también que es posible la superovulación utilizando dosis decrecientes de FSH en combinación con una sola inyección de PMSG, dado que ésta tiene una vida media más larga.

La cantidad de embriones de calidad (transferibles) está afectada negativamente por la presencia de folículos grandes (≥ 6 mm) al inicio del tratamiento superovulatorio (Gonzalez Bulnes et al. 2002, 2003a, Cognié et al. 2003). Según Hafez et al. (2002), en ovejas, uno o dos folículos grandes secretan más estrógenos y ligan más gonadotropinas a las células de la granulosa que todos los de menor tamaño. Para eliminar dichos folículos se utilizan antagonistas a GnRH, combinados con tratamientos de progestágenos que suprimen a las gonadotropinas endógenas y el desarrollo folicular superior a 1-2 mm.

Se ha demostrado que, en ausencia de CL, se incrementa la secreción de LH, ese aumento de frecuencia promueve el crecimiento de folículos grandes (Evans et al., 2001).

El número de folículos presentes al momento de iniciar el tratamiento hormonal, está correlacionado con la respuesta obtenida (Gibbons y Cueto, 1995). Los efectos inhibitorios de folículos grandes son más fuertes en ausencia de CL (progestágenos insertos hacia el final de la fase luteal o en la fase folicular) que en presencia de CL (progestágenos insertos al comienzo de la fase luteal). En ausencia de CL, serán reforzados los efectos dominantes de folículos mayores, los cuales inducen a la regresión de folículos subordinados.

El número y calidad de los embriones colectados no sólo es afectado por la población folicular presente en los ovarios al principio del tratamiento con FSH sino que también es afectado por la presencia o ausencia de CL que es visible mediante la ultrasonografía, a su vez, folículos dominantes podrían ser afectados por el efecto supresivo de la progesterona (Gonzalez Bulnes et al., 2002) administrada antes y durante el tratamiento con gonadotropinas.

De acuerdo con otros estudios, la alta concentración de progesterona al inicio del tratamiento mejora la respuesta del ovario en ovejas y en el caso de usar CIDER, sustituirlo antes de empezar el tratamiento con FSH es recomendado en protocolos tradicionales (Thompson et al., citados por Menchaca et al., 2009). Recientemente, se demostró que no cambian los resultados respecto al número de CL, ni la viabilidad de los embriones si en vez de que el tratamiento con progestágenos fuese de 11-14 días, éste sea más corto (5-7 días) (Menchaca et al., 2009).

Por otro lado, Joyce et al. (1998), señala que utilizando la hormona de crecimiento (rGH) junto con FSH en tratamientos de superovulación, hace incrementar el ritmo de maduración y el número de folículos de tamaño medio, pero no tiene efectos en la tasa ovulatoria.

Una inyección de GnRH 30-36 horas después de retirados los pesarios mejora la sincronización de las ovulaciones, determinando que una inseminación intrauterina 48 horas después de retiradas las esponjas, sea suficiente para obtener una buena tasa de fertilización (Cognié et al., 2003). Después de la estimulación hormonal, las ovulaciones se producen en un período de 6 horas ($58 \pm 6h$) (Cognié et al., citados por Fernández Abella, 2006).

El servicio directo por el carnero mejora las tasas de concepción, pero el uso de la laparoscopia asociada al servicio natural no modifica los resultados (Bari et al., 2000). Como el objetivo es obtener embriones de alta calidad muchas veces es necesario recurrir al semen congelado, lo cual determina el uso de la inseminación intrauterina.

Una sola dosis de GnRH (8,0µg buserelina) administrada al final del tratamiento super-estimulante induce un pico de LH en un plazo de 4h, y la ovulación ocurre entre 20 y 32h después, esto fue demostrado en cabras por Rubianes y Menchaca (2003). Walker et al., citados por Menchaca (2010) reportó que dicha dosis de GnRH al final del tratamiento con FSH incrementaba la producción de embriones. Sin embargo, otros autores no lo recomiendan dado que puede existir un segundo aumento de LH que hace disminuir la producción de embriones (Cognié, 1999). Un estudio reciente mostró que la administración de GnRH 24h después de haber sido retirado el CIDER aumenta

significativamente la tasa de fertilidad (de 84 a 93%) y el número de embriones transferibles por dadora (6 a 8 aproximadamente) comparado con aquellas ovejas no tratadas con GnRH (Menchaca et al., 2009). Además, las tasas de fertilización fueron mejoradas mediante la deposición del semen dentro de los cuernos uterinos utilizando la técnica de inseminación por laparoscopia (IAIU) (Robinson et al., Bari et al., citados por Menchaca et al., 2010).

En muchos programas usando GnRH 24h después de retirar el CIDER e inseminando por vía laparoscópica, se obtuvieron tasas de fertilización del 91,9% (3917/4262) y 86,4% (3048/3528), usando semen fresco (16h después de la GnRH) y congelado (16 y 24h después de la GnRH) respectivamente (Menchaca, citado por Menchaca et al., 2010).

Es común que se realice una sincronización del estro y ovulación previo al tratamiento de multiovlulación, con el uso de progesterona, prostaglandina y/o GnRH o sus respectivos análogos, como es el caso de algunos estudios realizados por Menchaca et al., donde se postula el denominado “Protocolo día 0”, donde se sincroniza la ovulación y se comienza con el tratamiento de superovulación enseguida luego de ese día (tomado como día 0). En dicho “pre-tratamiento” también se administran las mismas hormonas de muchos tratamientos tradicionales (Pg, PMSG y GnRH) y supone que poco después de la ovulación no hay folículos grandes y sí existe la presencia de un grupo homogéneo de folículos pequeños en crecimiento en todas las hembras (Menchaca et al., 2010).

Una alternativa para sincronizar la emergencia de la primer onda folicular es administrando un antagonista de la GnRH durante 10 días para suprimir la secreción de LH, prevenir la presencia de folículos grandes y aumentar el número de folículos pequeños (Cognié et al., Gonzales Bulnes et al., citados por Menchaca, 2010). Esto ha dado como resultado mayores tasas ovulatorias en cabras y ovejas, mayor número de embriones colectados en ovejas (Cognié, 1999), pero también un menor número de óvulos sin fertilizar, embriones degenerados y menor número de embriones transferibles en cabras (Cognié et al., 2003). Se examinaron tratamientos con 3 dosis cada 5 días (Cognié et al., 2003) y una dosis única de acción prolongada (López Alonso et al., citados por Mechaca et al., 2010) en ovinos, los cuales fueron efectivos en suprimir la secreción de gonadotropinas y la presencia de grandes folículos al momento de iniciar el tratamiento con FSH, pero al mismo tiempo fue afectada negativamente la producción de embriones (Menchaca et al., 2010).

Los tratamientos multiovulatorios pueden repetirse teóricamente cada 6 semanas o dos meses, según Azzarini (1992), Fernández Abella (2006) respectivamente. Si bien la mayoría de los animales mantienen una respuesta

elevada durante 2 años, el nivel de la misma decae con el número de tratamientos (Chemineau et al., 1991).

2.4.1.1 Antecedentes de protocolos de multi o superovulación

A continuación se presenta el cuadro No. 4 con los protocolos de multi o superovulación más utilizados principalmente en ovejas, aunque también se señalan algunos en cabras.

Cuadro No. 4. Protocolos de multi o superovulación.

AUTOR/RES	MÉTODO SINCRONIZACIÓN	FSH	PMSG	GnRH	MEDIA (Nº CL o *embriones colectados)
Gonzalez Bulnes et al. (2002, Raza: Manchega)	Esponjas con 40mg acetato de fluorogestona (día 0), cambio por otra nueva (día 7) hasta día 14. Una dosis de PGF2α (Cloprostenol) el día 12.	8 dosis decrecientes cada 12h. (1,5mL*3; 1,25mL*2; 1mL*3) comenzando en la mañana del día 12. El retiro de la esponja coincide con la 6ª dosis y el estro se detecta 24h después.			11,4 (12,7-10,0) (*7,2±1,25)
Bonino et al. (1989 Raza: Corriedale)	Esponjas con 60mg medroxiprogesterona durante 14 días.	6 dosis de 4mg cada 12h comenzando 48h antes de sacar esponjas.	1000UI o 1500UI 48h antes de sacar esponjas.		8,0 (2-15)
		6 dosis decrecientes cada 12h de 4-4-3-3-1-1mg comenzando 48hs. antes de sacar esponjas.			2,0 (0-2)
		3 dosis cada 24h: 4-3-3mg, la primera 48h antes de sacar esponjas.	1000UI: 400UI junto con la 1er dosis y 300UI junto con las demás (de 3mg de FSH).		8,6 (4-12)
Batt et al. (1993, Cabras Raza: Cruza Cashmere x Angora)	Esponjas con 60 mg acetato de medroxiprogesterona.	6 dosis decrecientes cada 12h de FSH porcina de 4-3-3-3-2-1mg comenzando 48h antes de sacar esponjas.		50ug 20h después de sacar esponjas	12 (*12)
	Esponjas con 60 mg acetato de medroxiprogesterona.	8 dosis cada 12h de 1,25mL de FSH Ovagen comenzando 72h antes de sacar esponjas.		idem anterior	11,9 (*10,2)
O'Callaghan et al. (2000, Raza: no indica)	Esponjas con 45mg de acetato de fluorogestona durante 8 días	6 dosis cada 12h de FSH porcina (40-40-40-40-20-20mg) comenzando 2 días antes de retirar esponjas			12,0±0,5 (folículos ?3mm)

AUTOR/RES	MÉTODO SINCRONIZACIÓN	FSH	PMSG	GnRH	MEDIA (Nº CL o *embriones colectados)
Batt et al. (1993,Cabras Raza: Cruza Cashmere x Angora)	Esponjas con 60 mg acetato de medroxiprogesterona.	4mg de FSH porcina 48h antes de retirar esponjas	200UI 48h antes de sacar esponjas	idem anterior	3,2 (*1,6)
	Esponjas con 60 mg acetato de medroxiprogesterona.	4mg de FSH porcina 48h antes de retirar esponjas	400UI 48h antes de sacar esponjas	idem anterior	6,3 (*6,0)
	Esponjas con 60 mg acetato de medroxiprogesterona.	12mg de FSH porcina 48h antes de retirar esponjas	200UI 48h antes de sacar esponjas	idem anterior	8,7 (*7,1)
	Esponjas con 60 mg acetato de medroxiprogesterona.	12mg de FSH porcina 48h antes de retirar esponjas	400UI 48h antes de sacar esponjas	idem anterior	9,9 (*3,6)
	Esponjas con 60 mg acetato de medroxiprogesterona.	2,5mL de Ovagen 48h antes de retirar esponjas	200UI 48h antes de sacar esponjas	idem anterior	13,6 (*12,4)
	Esponjas con 60 mg acetato de medroxiprogesterona.	2,5mL de Ovagen 48h antes de retirar esponjas	400UI 48h antes de sacar esponjas	idem anterior	15,2 (*12,2)
	Esponjas con 60 mg acetato de medroxiprogesterona	7,5mL de Ovagen 48h antes de retirar esponjas	200UI 48h antes de sacar esponjas	idem anterior	14,2 (*9,8)
	Esponjas con 60 mg acetato de medroxiprogesterona	7,5mL de Ovagen 48h antes de retirar esponjas	400UI 48h antes de sacar esponjas	idem anterior	14 (*9,4)
Gonzalez Bulnes et al. (2003b, Raza: Manchega)	Esponjas con 40mg de acetato de fluorogestona (día 0) cambiándose por otra nueva el día 7 y retirándose el día 14. Además, una dosis de 125µg de cloprostenol en el mismo momento de la 1º inyección de FSH	8 dosis decrecientes cada 12h (1,5mL*3; 1,25mL*2; 1mL*3) comenzando 60h antes de cambiar esponja			11,1±1,1 (*4,3±1,4)

AUTOR/RES	MÉTODO SINCRONIZACIÓN	FSH	PMSG	GnRH	MEDIA (Nº CL o *embriones colectados)
Menchaca et al. (2009, Raza: Merino)	CIDER con 0,3g de progesterona de 5 a 14 días, si están más de 7 días se cambian por uno nuevo 1 día antes de empezar con la FSH y 160µ de delprosnato (análogo de PGF2α) al momento de retirar el CIDER	8 dosis decrecientes de FSH porcina cada 12h (2,5-2,5-1,8-1,8-1,2-1,2-0,5-0,5mL) comenzando al momento de retirar el CIDER	200UI al momento de retirar el CIDER		7,5 (media entre NºCL según Nº de días con el CIDER (de 5 a 14 inclusive) ya que no habían diferencias significativas (*4,0)
	CIDER con 0,3g de progesterona durante 14 días	idem anterior	300UI al momento de retirar el CIDER		8,4 (7,7-9,1) (*3,2±0,5)
	CIDER con 0,3g de progesterona durante 14 días	8 dosis decrecientes de FSH porcina cada 12h (2,5-2,5-1,8-1,8-1,2-1,2-0,5-0,5mL) comenzando 60h antes de retirar el CIDER	200UI al momento de retirar el CIDER		7,0 (7,7-6,3) (*3,6±0,6)
	CIDER con 0,3g de progesterona durante 14 días	idem anterior			7,9 (8,4-7,4) (*5,3±0,5)
	CIDER con 0,3g de progesterona durante 14 días	8 dosis decrecientes de FSH porcina cada 12h (2,5-2,5-1,8-1,8-1,2-1,2-0,5-0,5mL) comenzando 60h antes de retirar el CIDER		8,0µg acetato de buserelina (análogo de GnRH) 24h antes de retirar CIDER	10,3 (9,6-11,0) (*7,6±0,6)
	CIDER con 0,3g de progesterona durante 14 días	8 dosis decrecientes de FSH porcina cada 12h (2,5-2,5-1,8-1,8-1,2-1,2-0,5-0,5mL) comenzando 60h antes de retirar el CIDER			8,7 (8,0-9,4) (*5,8±0,7)
	PROTOCOLO 0 (el comienzo del tratamiento con FSH debe coincidir con la "primer ola folicular", por lo que se sincroniza previamente con CIDER durante 6 días, 300UI de PMSG y una dosis de PGF al momento de retirar el CIDER.	8 dosis decrecientes de FSH porcina cada 12h (2,5-2,5-1,8-1,8-1,2-1,2-0,5-0,5mL) comenzando 60hs antes de retirar el CIDER. En la 7ª y 8ª dosis se aplica PGF (80µg de delprostenato)		8,0µg acetato de buserelina (análogo de GnRH) 24h después de la 1ª dosis de PGF	13,5 (12,1-14,9) (*7,9±1,4)

AUTOR/RES	MÉTODO SINCRONIZACIÓN	FSH	PMSG	GnRH	MEDIA (Nº CL o *embriones colectados)
Gonzalez Bulnes et al. (2003a, Cabras, Raza: Murciano-Granadina)	Esponja (día 0) con 45mg de acetato de fluorogestona durante 16 días, más una dosis de 100µg de cloprostenol (análogo de PGF2α) simultáneo con la 1º dosis de FSH	8 dosis cada 12 h de 1,25mL (Ovagen) comenzando en la mañana del día 14 (60h antes de retirar esponja)			14,3 (13,8-14,8) (*6,8±0,4)
Jabbour y Evans. (1991, Raza: Merino)	Esponjas impregnadas con progestágenos durante 12 días		1200UI 48h antes de retirar esponjas		11,4 (9,6-13,2)
		6 dosis decrecientes cada 12h de FSH porcina (3,5-3,5-2,5-2,5-1,5-1,5mg) comenzando 48h antes de retirar esponjas			7,2 (4,7-9,7)
		6 dosis decrecientes cada 12h de FSH porcina (2,5-2,5-2,0-2,0-1,0-1,0mg) comenzando 48h antes de retirar esponjas	700UI 48h antes de retirar esponjas		11,1 (9,0-13,2)
Rexroad y Powell. (1990, Raza: no indica)	Esponjas con 60mg de 6-metil-17-acetoxyprogesterona durante 16 días	1 dosis de 5mg a las 16:00h (72h antes de retirar esponjas) seguido de otras 6 dosis de 2,5mg cada 12h de FSH porcina, siendo la última inyección coincidente con el retiro de esponjas			12,1 (9,8-14,4) (*5,7±1,1)
	Esponjas con 60mg de 6-metil-17-acetoxyprogesterona durante 16 días	3 dosis de 5mg seguido por 2 de 2,5mg y las esponjas son retiradas 24h antes de la última dosis			11,5 (9,9-13,1) (*5,0±1,1)
	Idem anterior pero además, se agregan 2 inyecciones de PGF de 7,5mg cada una con un intervalo de 1,5h entre ambas, 24h antes de última inyección FSH	idem anterior			12,4 (10,2-14,6) (*6,9±1,5)

AUTOR/RES	MÉTODO SINCRONIZACIÓN	FSH	PMSG	GnRH	MEDIA (Nº CL o *embriones colectados)
Gonzalez Bulnes et al. (2005, Raza: Manchega)	Una mitad del grupo: 2 inyecciones de 100µg de cloprostenol con un intervalo de 10 días. En la otra mitad, esponjas con 40mg de acetato de fluorogestona el día despues de la ovulación	8 dosis decrecientes cada 12hs. (26,4 unidades de NIH-FSH-S1*3-22,0*2 y 17,6*3) Ovagen- comenzando en la mañana del día 12 (día0: ovulación según sincronización previa)			12,2 (*9,1)
	esponjas con 40mg de acetato de fluorogestona el día despues de la ovulación (día 0) y son reemplazadas por nuevas el día 7 hasta el día 14, además al momento de la 1º dosis de FSH se aplica una dosis de 125µg de cloprostenol	8 dosis decrecientes cada 12hs. (26,4 unidades de NIH-FSH-S1*3-22,0*2 y 17,6*3) Ovagen- comenzando en la mañana del día 12			10,5 (*8,2)
Aké López et al. (2003, Raza: Pelibuey)	Previamente, sincronización con implante Norgestomet durante 9 días y al retirarlo se aplica 150UI de PMSG. Al tercer día del tratamiento con FSH, 7,5mg de PGF2α en la mañana y otra dosis igual en la tarde	500UI y 500UI de LH, en 8 dosis decrecientes (200UI*2-150UI*2-50UI*2) comenzando el día 9-10 del ciclo (día 0: estro)			12,41±8,10 (*6,25±5,69)
		25mg en 8 dosis decrecientes cada 12h (5-4-4-3-3-2-2-2mg) comenzando el día 9-10 del ciclo (día 0: estro)			8,28±7,78 (*7,75±5,86)
Armstrong y Evans (1983, Raza: Suffolk)	Esponjas con progestágenos insertas 10-12 días antes de comenzar el tratamiento, retiro de pesarios en la 5º dosis de FSH (14 días)	8 dosis de 2,5-3mg cada 12h			8,4±0,9 (*5,3±0,5)
	idem anterior		1500-2000UI		7,7±1,4 (*3,5±1,6)

2.4.2 Elección de donantes

Boggio Devincenzi (2001) indica que las donadoras de embriones deben estar en perfectas condiciones de salud, no sólo desde el punto de vista general sino que fundamentalmente debe tener en perfectas condiciones de "salud" su tracto genital. Además, deben presentar ciclos estrales normales (por lo menos dos deben ser observados).

Al tratarse de un animal genéticamente superior a los de su generación (para la mayoría de los casos en que se realiza transferencia de embriones), debe estar libre de enfermedades de transmisión genética (hipoplasias genitales, braquignatismo y muchas más) e infectocontagiosas (aunque hay trabajos que indican que el embrión no transmite ciertas enfermedades infecciosas).

Según Aké López et al. (2003) las hembras se seleccionan en base de los siguientes criterios: que no estén amamantando, que tengan entre dos y seis partos, que no tengan problemas reproductivos en su último parto, y que tengan una condición corporal entre 3 y 4, de acuerdo con la escala de 1 al 5. Además, Bonino et al. (1989) señala la preferencia de trabajar con ovejas más jóvenes con el fin de reducir el intervalo generacional (IG).

Se la debe manejar con todo el "cariño" posible a los efectos de que el estrés al que pueda estar sometida sea el mínimo posible, ya que cualquier estrés al que se la someta tendrá influencia negativa; o en la respuesta a la superovulación o en los índices de recolección de embriones transferibles (Boggio Devincenzi, 2001).

2.4.3 Elección de receptoras

La hembra receptora es un factor determinante en el buen éxito de un programa de transferencia de embriones.

Una vez seleccionada por su genotipo, edad, facilidad de parto, estado fisiológico, condición corporal y salud, tanto general como reproductiva; debe tener "habilidad" para demostrar estro y la mucosa del útero debe estar en excelentes condiciones (Broadbent et al., 1991).

Turner et al., Graines et al., citados por Broadbent et al. (1991) indican que las cruzas son mejores receptoras que razas puras, al igual que Moore (1982), Bonino et al. (1989), quienes afirman que la raza de la receptora debe ser distinta

de la donadora.

Se debe tener en cuenta entre otros factores, el precio de la receptora y la adaptación al medio en términos de nutrición, enfermedades y cambios climáticos (Broadbent et al., 1991).

Toda hembra seleccionada como receptora debe de haber parido por lo menos una vez y se debe conocer su tipo de parto y su habilidad materna (Boggio Devincenzi, 2001).

Broadbent et al. (1991) señalan que los requerimientos de agua, minerales, vitaminas y niveles de energía, proteína y fibra deben estar acordes con el estado fisiológico de la receptora y que la oferta de forraje y cambios bruscos de clima inciden en la fertilidad, por lo que los animales deben presentar un buen estado alimentario y en un ambiente favorable que aseguren una buena salud. El stress influye en la demostración de celo, en el ciclo estral, en la ovulación, desarrollo e implantación del embrión, y en la preñez.

Debe haber una sincronía lo mas pareja posible entre el celo de la receptora y la dadora de los embriones. Esta sincronía es fundamental para una correcta implantación y desarrollo del embrión; el útero de la receptora debería estar en las mismas condiciones hormonales y anatómicas que el de la dadora. De una correcta y exacta detección de celo depende el grado de sincronía entre dadora y receptora (Boggio Devincenzi, 2001).

Se ha comprobado que con más de 12h de asincronía entre el celo de la receptora y dadora, el porcentaje de preñez post transplante decrece abruptamente (Aké López et al., 2003), aunque Armstrong y Evans (1983) realizaron estudios con ± 1 día de asincronía, obteniendo buenos resultados.

Bonino et al. (1989) señala además que la receptora esté en buenas condiciones, sin problemas mamarios y con un estricto control sanitario, que la relación respecto a la cantidad de donantes sea de 10 a 1 respectivamente, lo cual permite cubrir fallas comunes en la sincronización.

2.4.4 Colecta

La colecta se realiza a los 5-7 días luego de la fertilización (embriones en estado de mórula o blastocisto) a través de un lavado o flushing de los cuernos uterinos por vía quirúrgica, semi-laparoscópica (Bari et al. 2000, Evans et al. 2001, Fernández Abella 2003, Gonzalez Bulnes et al. 2002, 2003a, 2003b, 2005, Aké López et al. 2003, Menchaca et al. 2009) y también no quirúrgica (Ramón Ugalde, s.f.).

La oveja donante es anestesiada, vía anestesia general (García García et al. 2002, Gonzalez Bulnes et al. 2002, Menchaca et al. 2009) y/o tranquilizante local (Jabbour y Evans, 1991). Posteriormente, se la coloca en una pequeña camilla donde mediante un laparoscopio se observan los ovarios para ver la respuesta al tratamiento superovulatorio a través de la observación de los cuerpos luteos.

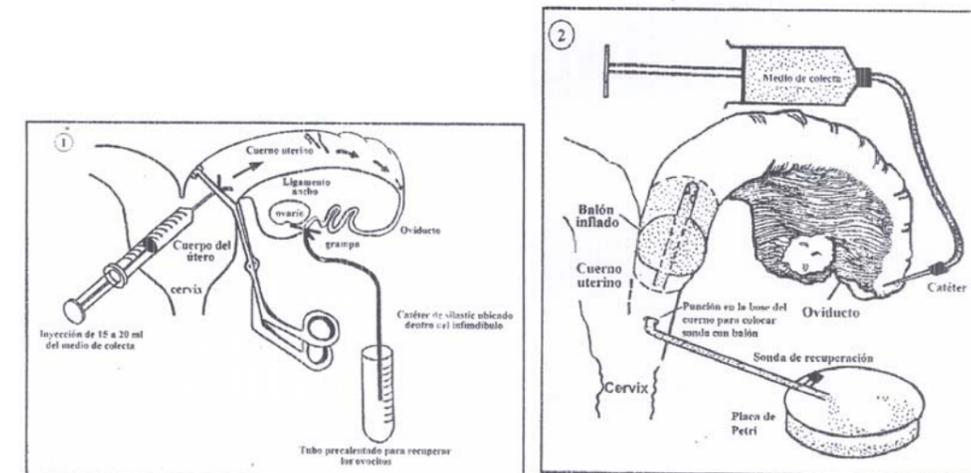
La obtención de embriones mediante cirugía está limitada por las adherencias post-operatorias que se producen (Hafez y Hafez, 2002), las cuales reducen el número de intervenciones que se pueden practicar a una misma oveja y disminuyen la tasa de recuperación por problemas de tipo mecánico. Pese a esto, la técnica quirúrgica es la más utilizada, ya que permite recuperar mayor cantidad de embriones, así como realizar más número de animales por día, se pueden recuperar embriones a través del oviducto (Hunter, Ramón et al. (sin publicar), o a nivel del cuerno uterino, que es la técnica de mayor uso y desarrollo actual (Ramón et al., Tervit et al., citados por Ramón Ugalde, s.f.).

Según Fernández Abella (2006), las técnicas de colecta más utilizadas actualmente en el mundo son:

1. la técnica australiana, usando una sonda Foley en la bifurcación de los cuernos uterinos; lavando desde la unión útero tubal hacia la parte basal de cada cuerno. Esta técnica es de las más comunes, varios trabajos españoles realizados por Gonzalez Bulnes et al. (2002, 2003a, 2003b, 2005) utilizan dicha técnica, aunque variando los medios de colecta (ver figura No. 8, izquierda).
2. la técnica europea, realizando un flushing desde el cuerno al oviducto (ver figura No. 8, derecha).

Figura No. 8. Técnicas quirúrgicas utilizadas para colectar embriones. Izquierda:

Flushing o lavado desde el cuerno al oviducto. Derecha: Técnica antigrado de lavado desde la unión uterotubal hasta la parte basal del cuerno.



Fuente: extraído de Fernández Abella (2006).

Este mismo autor señala que la técnica australiana es mucho más rápida que la europea (10 minutos vs 20 minutos), colectándose un 40% más de embriones y reduciéndose la formación de adherencias, y que la técnica por laparoscopia es muy lenta (30-40 minutos) y se recuperan el 60% de los embriones colectados por la técnica quirúrgica.

Entre los métodos no quirúrgicos el más usual es el que se realiza por endoscopia (Mc Kelvey et al., 1986). Con este método, se evitan los problemas de adherencias pero la tasa de recuperación es inferior a la que se logra mediante la perfusión quirúrgica (Tervit et al., 1991). Hafez y Hafez (2002) clasifican y explican dichos métodos como método transcervical y por vía laparoscópica con anestesia general, citando a Mc Kelvey et al., donde la diferencia fundamental de esta última con la técnica quirúrgica es que los instrumentos para el lavado se introducen a través de heridas tipo puñalada en lugar de por incisión ventral media.

Existe también la posibilidad de recuperar los embriones mediante la perfusión vía cervical, sin embargo, este sistema es normalmente utilizado en el vacuno y caprino, resulta difícil de aplicar en el ovino debido a la propia morfología del cérvix. Ha sido desarrollada una forma mixta o semiquirúrgica

que modifica la técnica quirúrgica tradicional de Hunter; ésta técnica se apoya en el uso del endoscopio y permite alcanzar altas tasas de recuperación de los embriones. Los resultados obtenidos por Ramón Ugalde (s.f.) mostraron que existe una correlación positiva entre la tasa de recuperación embrionaria y la tasa ovulatoria ($r = +0.7718$; $p < 0.001$), así como entre el número de embriones recuperados y la tasa ovulatoria ($r = +0.9744$; $p < 0.001$).

Los medios de colecta que se utilizan son variados, siendo el más común la solución fosfato buffer salina (PBS) o el suero albúmino bovino (BSA) (Gonzalez Bulnes et al., 2002), el cual habitualmente se le complementa con suero fetal bovino y antibiótico (Aké López et al., 2003) o simplemente con suero (10%) (Evans et al., 2001).

Finalizada la colecta, es conveniente administrar prostaglandina F_{2α}, para evitar que la oveja dadora quede preñada (Fernández Abella, 2006).

2.5 CRIOPRESERVACIÓN

La criopreservación de embriones determina que las ventajas que ofrece la tecnología de la transferencia de embriones aumenten significativamente, al economizar y aumentar el rendimiento del uso de receptoras. Además, permite el comercio internacional de material genético de gran valor, pudiéndose transportar embriones por mucho menor costo que el de animales en pie y con mucho menor riesgo de accidentes y transmisión de enfermedades. El embrión es la forma más segura de mover material genético internacionalmente (Boggio Devincenzi, 2001). Ventajas adicionales al comercio internacional son la adaptación de la cría al medio ambiente de la receptora, no sólo en términos agroclimáticos, sino también debido al aporte de anticuerpos maternos durante la gestación y lactancia (Seidel, 1991). También permite introducir nuevas razas en una región o país. Desde el punto de vista práctico, la ventaja más importante es la reducción de receptoras, haciendo más eficiente su uso, ya que representan la mayor inversión en la industria de la transferencia de embriones, aumentando la eficiencia del proceso. Los primeros corderos producidos a partir de embriones criopreservados nacieron en 1976 (Willadsen et al., citados por Cocero et al., 2002).

En el proceso de criopreservación es esencial eliminar la mayor parte del agua intracelular antes de que el congelamiento tenga lugar, de lo contrario se formarán grandes cristales intracelulares que causan daño mecánico y, frecuentemente, la muerte celular (Mazur, 1977). Respecto a la supervivencia embrionaria, ésta resulta diferente según el método de obtención de los embriones sea In vivo o In vitro, el tipo de crioprotector, así como del estado de desarrollo del embrión (Cocero et al., 2002).

Existen básicamente dos técnicas de criopreservación: la criopreservación convencional o congelación (por enfriamiento lento), y la vitrificación (por enfriamiento brusco). Ambos tienen efectos lesivos sobre el material biológico, por un lado el "efecto de solución", que es el daño que puede producir la solución en las células (alteraciones en la composición y propiedades de las soluciones intra y extracelulares) debido a las diferencias osmóticas a que éstas son expuestas y por otro, el "efecto de congelación", que es el daño celular debido a las bajas temperaturas que se alcanzan y a la formación de cristales de hielo (Boggio Devincenzi 2001, Martínez 2001). En ambas técnicas se requiere del uso de crioprotectores para optimizar la supervivencia del embrión. Los envases utilizados comúnmente en la criopreservación embrionaria, son las pajuelas plásticas francesas de 0,25 ó 0,50 mL o bien las denominadas open-pulled straws (OPS).

Hasta la fecha, la criopreservación convencional ha dado mejores resultados en la mayoría de tipos celulares (ya sean células independientes o embriones y tejidos). Por otro lado Martínez et al. (2006), Green et al. (2009) afirman que independientemente del sistema utilizado, la tasa de sobrevivencia de los embriones congelados o vitrificados, obtenidos por colecta (In vivo) o por cultivo (In vitro), son por lo general similares.

Según Baril et al. (2001), Papadopoulus et al. (2002), Guignot et al. (2006), Martínez et al. (2006), Bettencourt et al. (2009), Green et al. (2009) no habría diferencias significativas en la tasa de preñez cuando los embriones son congelados (38 al 73%), vitrificados (52 al 79%) o transferidos en fresco (50 al 90%). Green et al. (2009) afirman que la tasa de preñez de embriones ovinos congelados según el estadio embrionario (mórula o blastocisto) sería similar, mientras que García García et al. (2006) sostienen que sería superior para los estadios de mayor desarrollo; Baril et al. (2001) señala que puede variar según la edad de la donante de embriones.

2.5.1 Crioprotectores

Se trata de solutos orgánicos que protegen la membrana celular, núcleo y orgánulos citoplasmáticos durante el almacenamiento de larga duración en nitrógeno líquido. Son esenciales para mantener la viabilidad de la mayoría de las células criopreservadas (Schneider et al., 1984). Disminuyen el punto de fusión de las soluciones, reducen la concentración intra y extracelular de electrolitos y la excesiva deshidratación celular a temperaturas bajo cero (Ciba, 1977), reducen el hielo durante la congelación e influyen en su forma (Mazur,

1966). También inhiben la actividad de muchas enzimas disminuyendo o eliminando la actividad de radicales libres responsables de lisis celular, antes, durante y luego de la congelación y descongelación (Carpenter y Crowe, 1988), estabilizan proteínas celulares (Fahy et al., 1987), mantienen en equilibrio el potencial químico del agua intra y extracelular (Ciba, 1977), reemplazan las moléculas de agua removidas durante la congelación (Meryman, 1966) y bloquean la toxicidad de otros crioprotectores (Fahy et al., 1987).

Reducen el daño celular dado por el efecto solución y congelación pero se debe considerar que tienen características tóxicas para las células (directa o bioquímica y osmótica). Existen 2 grupos de crioprotectores: intracelulares, permeables o penetrantes de bajo peso molecular (glicerol y etilenglicol entre otros), y extracelulares, no permeables o no penetrantes, de bajo (sucrosa y trehalosa entre otros) o de alto (ficoll, polivinilpirrolidona y otros) peso molecular. Un buen crioprotector debe tener alta solubilidad y baja toxicidad a altas concentraciones y si es penetrante bajo peso molecular para entrar fácil y rápidamente a la célula y obtener el máximo efecto protector.

El tiempo de exposición de las células al crioprotector depende del crioprotector utilizado, su concentración, la temperatura, el tamaño y el tipo de célula o grupo celular que se va a criopreservar, por ende es que de dichos parámetros que depende la velocidad a la que un crioprotector intracelular penetra en una célula (Schneider et al., 1984).

El etilenglicol, comparado con otros crioprotectores penetrantes, tiene ventajas por su alta velocidad de penetración y muy baja toxicidad a las células embrionarias. Cocero et al. (1996) comprueba que la supervivencia lograda con etilenglicol (45,5%) es similar a la obtenida por embriones frescos (56,5%) y a la vez, significativamente mayor que para aquellos tratados con glicerol (Cocero et al., 2002), además, se logran mayores valores en términos de tasa de preñez y del número de corderos nacidos. Por otro lado, en la vitrificación el etilenglicol también ha demostrado ser el mejor crioprotector, la sucrosa permite deshidratación celular favoreciendo la vitrificación, la asociación de ambos posibilitaría obtener buenos porcentajes de sobrevivencia.

Para remover el crioprotector se utilizan crioprotectores no penetrantes y los embriones son colocados en PBS para que recuperen la isotonicidad y ser transferidos o llevados a cultivo (Schiewe et al., 1991).

2.5.2 Criopreservación convencional o tradicional (congelación por enfriamiento lento)

El proceso de congelación comienza en el espacio extracelular, con la formación de cristales de agua pura (hielo). Esto causa un aumento en la concentración (hipertonicidad) de la solución líquida extracelular restante respecto al medio intracelular, lo que perturba el equilibrio osmótico atrayendo agua intracelular al exterior quedando la célula parcialmente deshidratada. La tasa de enfriamiento (velocidad a la que disminuye la temperatura), debe ser suficientemente lenta para dar tiempo a que el agua intracelular salga al exterior de la célula y prevenir formación de cristales de hielo intracelular, y suficientemente rápida para minimizar la exposición de la célula al efecto solución. Debido a la alta concentración del líquido extracelular y a la adición del crioprotector, tiene lugar un fenómeno denominado "sobreenfriamiento", por el que el punto de congelación de la solución puede descender más de 10°C por debajo del original, (normalmente situado a -3°C). Para prevenir este sobreenfriamiento se lleva a cabo la inducción de la formación de hielo a temperaturas ligeramente sobreenfriadas (-6, -7°C), denominado seeding. De no realizar el seeding, la solución seguiría enfriándose hasta temperaturas del orden de -20°C, donde las células ya no son capaces de sufrir más deshidratación, por lo que se formarían grandes cristales de hielo en el interior y exterior celular, lo que sería altamente nocivo. Este método ha resultado ser el más efectivo y con mayores niveles de viabilidad y supervivencia en la producción de embriones In vivo (Cocero et al., 2002).

Dentro de las principales desventajas, la pérdida de viabilidad puede ser definida como la más importante, embriones que luego de ser descongelados parecen ser morfológicamente viables pueden producir preñeces fallidas una vez que son transplantados (Cocero et al., 1996).

Existen diferentes protocolos de congelación, a continuación se describirán los más utilizados (Cuadro No. 5), según la obtención de los embriones sea In vivo o In vitro y, el tipo y concentración de crioprotector utilizado. Cabe destacar que cada protocolo está acompañado de una curva de enfriamiento (gradual) hasta llegar a los -35°C aproximadamente y así luego introducir las pajuelas o los OPS en nitrógeno líquido (-196°C).

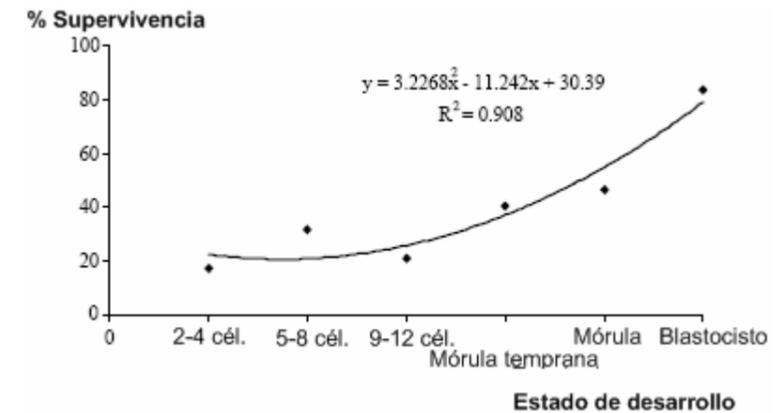
Cuadro No. 5. Protocolos de congelación tradicional.

AUTOR/ES	RAZA	OBTENCIÓN	CRIOPROTECTOR-	%SOBREVIVENCIA	%
----------	------	-----------	----------------	----------------	---

		DE LOS EMBRIONES	CONCENTRACIÓN	(Nº corderos nacidos/embriones transferidos)	PREÑEZ
Cocero et al. (1996, España).	Manchega	In vivo	Etilenglicol (ETG) en 3 pasos (temperatura ambiente): 0,5 y 1molar (M) por 10 min. Y luego a 1,5M por 20 min.	45,5	62,2
		In vivo	Glicerol (GLY) en 2 pasos (temperatura ambiente): 0,7 y 1,4M por 10 min. en cada paso	27,7	47,2
García-García et al. (2005, España).	Manchega	In vivo	32°C: 0,75M ETG 10 min., 1,5M ETG 10 min. (solución PBSS(PBS plus 20% FCS))	36/43 (83,7)	s.d.
Cocero et al. (2002, España).	s.d.	In vivo	GLY en 2 pasos: 0,7M (20 min.) y 1,4M (20 min.)	18,5	s.d.
	s.d.	In vivo	ETG en 3 pasos: 0,5M (10 min.), 1M (10 min.) y 1,5M (10 min.)	43,5	s.d.
Martínez et al. (2006, Argentina).	cruza Merino-Corriedale	In vivo	ETG en 3 pasos (0,5;1 y 1,5M) en PBSS y 1%AA, 10 min. en cada paso	s.d.	46,4
		In vitro		s.d.	27,6

Fuente: elaboración propia.

Figura No. 9. Supervivencia de embriones ovinos según el estado de desarrollo luego de su congelación y descongelación.



Fuente: Garcia Garcia et al. (2006).

2.5.3 Vitrificación (enfriamiento brusco)

En Uruguay, la primera comunicación de la aplicación del método de vitrificación en embriones ovinos fue realizada por Boggio Devincenzi en 2002, aunque los resultados obtenidos (13,3 % de supervivencia In vitro) deben y pueden ser mejorados.

Los embriones son sumergidos directamente en nitrógeno líquido luego de un corto período de equilibrio del material biológico en los medios de vitrificación, ya sea a temperatura ambiente o no, según sea el protocolo utilizado, sin dar tiempo a la deshidratación celular. Se fundamenta en que estos medios poseen concentraciones muy altas de crioprotectores (4-6 molar), que hace imposible la formación de cristales de hielo. Se produce una sobresaturación, y el paso a un estado altamente viscoso similar al vidrio que sin llegar a sólido reduce el movimiento molecular casi totalmente impidiendo la formación de cristales, lo que previene el daño causado por éstos (Dobrinsky 1996, Seidel 1996). Pese a esto, los daños producidos por la toxicidad del crioprotector se ven incrementados y para evitarlos o reducirlos, se recurre a: reducir los tiempos de exposición, disminuir la temperatura a la que se añade el crioprotector, reducir la concentración del crioprotector, a la utilización de crioprotectores poco tóxicos, así como al uso de mezclas de crioprotectores (Rall, 1987).

El tiempo de exposición al crioprotector y la temperatura, son los parámetros más importantes a tener en cuenta para el logro de una supervivencia aceptable tras la vitrificación, por lo que deben ser muy bien

controlados. La descongelación debe ser rápida (pocos segundos) para que no se formen cristales de hielo (devitrificación) letales para la célula (Rall, 1987).

En el cuadro siguiente se detallan algunos protocolos de vitrificación tanto para embriones obtenidos In vivo como In vitro.

Cuadro No. 6. Protocolos de vitrificación.

AUTOR/ES	RAZA	OBTE NCIÓN DE LOS EMBRI ONES	CRIOPROTECTOR- CONCENTRACIÓN	% SOBREVIVE NCIA (Nº corderos nacidos/emb riones transferidos)	%PRE- ÑEZ
Zhu et al. (2001, China).	Romney,cru za Romney, Suffolk y Dorset	In vitro	EFS40 (40% etilenglicol (ETG)+18% ficoll+0,5M sacarosa) 1 min.	39/50 (78)	35,7
			EFS40 2 min.	26/52 (50)	
			10% ETG 5 min., EFS40 30 seg.	70/75 (93,3)	
			EFS20 2 min., EFS40 30 seg.	46/48 (92)	
	Dorset y Suffolk	In vivo	10% GLY 5 min., GFS40 (40% glicerol+18% ficoll+0,5M sacarosa)30 seg.	34/50 (68)	58,3
			EFS40 (40% ETG+18% ficoll+0,5M sacarosa) 1 min.	72/76 (94,7)	
EFS40 2 min.	45/60 (75)				
10% ETG 5 min., EFS40 30 seg.	54/55 (96,4)				
Vladimir Isachenko et al. (2003, España e Italia).	Aragonesa (España) y Sarda (Italia)	In vivo	10%GLY (5min.), 10%GLY+20%ETG (5min.) y 25%GLY+25%ETG (30seg.)	s.d.	25
			10%ETG+10%DMSO (3min.), 20%ETG+20%DMSO+0,3Mtrehalos a (30seg.). ULTRA-RÁPIDA.	s.d.	60
Papadopoul os et al. (2002, Irlanda).	cruza Suffolk	In vivo	medio Holding+20%ETG+20%DMSO	35	50
		In vitro	medio Holding+20%ETG+20%DMSO	2,5	5
Martínez et al. (2006, Argentina).	cruza Merino- Corriedale	In vitro	25% glicerol+25%propilenglicol, en PBSS y 1%AA, 30 seg. a 4-12°C	31,1	s.d.
			40%ETG+18%ficoll70+0,3Msacaros a (EFS) en PBSS y 1%AA, 30 seg. a temp. ambiente	51,1	s.d.
			25% ETG+25%glicerol, en PBSS y	87,3	s.d.

			1%AA, 30 seg. a temp. ambiente		
Gibbons y Cueto (2010).	Merino	In vivo	MCS (Medio comercial (Bovi-pro®)+20% suero fetal bovino)+25%GLY+25%ETG, 30 seg.	41,2 (mórula) 50,0 (bl.)	47,1 (mórula) 50,0 (bl.)
Baril et al. (2001, Francia).	Lacaune-Ile de France	In vivo	25%GLY+25%ETG, en PBS-NBCS (30 seg.)	50	72

Fuente: elaboración propia.

Esta técnica parece ser mejor aprovechada en la congelación de ovocitos y embriones producidos In vitro, ya que debido a sus diferencias morfológicas y fisiológicas con los embriones producidos In vivo, los porcentajes de sobrevivencia logrados con la congelación tradicional y/o convencional no son muy buenos con respecto a los logrados con la vitrificación en embriones producidos In vitro. Por otro lado, si la producción de embriones fue realizada In vivo, resulta que la congelación supera a la vitrificación en cuanto a la sobrevivencia de los mismos.

La vitrificación no se ha utilizado masivamente, debido a la falta de una estandarización de los protocolos, para cada especie de interés zootécnico (Gibbons y Cueto, 2010).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LOCALIZACIÓN

Los ensayos se realizaron en el Centro de Investigación y Experimentación “Dr. Alejandro Gallinal” (CIEDAG) el cual pertenece al Secretariado Uruguayo de la Lana (SUL), ubicado en la ruta 7, Km 140, Cerro Colorado, en el departamento de Florida, Uruguay, (33°52' latitud sur, 55°34' longitud oeste).

3.2 SUELOS

El establecimiento comprende un total de 1114 ha distribuidas en dos padrones de 314 y 800ha respectivamente. Los suelos predominantes se incluyen en la unidad San Gabriel Guaycurú en la carta a escala 1:1.000.000 (D.S.F.), existiendo principalmente Brunosoles Subéutricos Háplicos. El Índice Coneat promedio es de 96, siendo los grupos de suelos principales el 5.02b con un 43,3% del área, el grupo 5.4 abarcando un 37,6%. La superficie restante comprende los grupos 2.11a y 2.13 en un 19,1%. Predominan suelos de uso pastoril aunque en suelos del grupo 5.4 existe algún área bajo cultivo (URUGUAY. MGAP. PRENADER, 2010).

El grupo de suelo 5.02b es el que predomina en el predio, así como en los departamentos de Florida y Flores (Puntas del San José). Presenta relieve ondulado y ondulado fuerte, con pendientes que varían y llegan hasta un 5 a 7 %. Los suelos de dicho grupo son Brunosoles Subéutricos Háplicos moderadamente profundos y superficiales, a éstos se le asocian Inceptisoles (Litosoles) a veces muy superficiales. La textura es franca, franco gravillosa o arenoso franca con gravillas abundantes. La fertilidad es media, ocasionalmente bajas, la rocosidad es moderada y varía entre un 2 al 10% del área con afloramientos. (URUGUAY. MGAP. PRENADER, 2010).

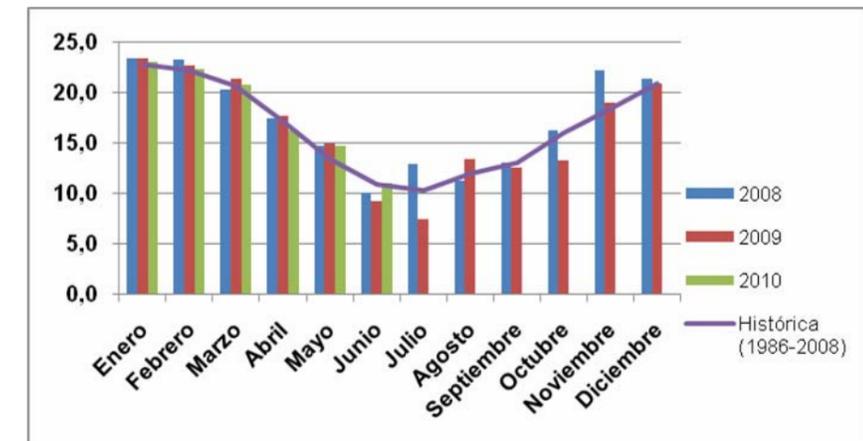
El suelo que le sigue en orden de importancia es el del grupo 5.4. Este ocurre en posiciones de interfluvios donde existen pequeñas antiplanicies, a veces con ojos de agua. Las pendientes llegan al 3 y 5%. Los suelos se desarrollaron de materiales cristalinos, y en parte, de sedimentos limo-arcillosos poco potentes y discontinuos que los recubren. Son moderadamente profundos y superficiales, de textura franca. La fertilidad es media, a veces baja y son moderadamente bien a bien drenados. También existen suelos de color negro o

pardo muy oscuro, de textura franca a franco arcillosa, de fertilidad alta y moderadamente bien drenados. Se asocian a este grupo, suelos de diferenciación mínima, de colores muy oscuros, pesados, con drenaje imperfecto y de fertilidad alta, su uso es en general pastoril aunque existen áreas bajo cultivo. (URUGUAY. MGAP. PRENADER, 2010).

3.3 CONDICIONES CLIMÁTICAS

Durante el ensayo, las condiciones climáticas imperantes fueron registradas en la estación agrometeorológica del CIEDAG. La temperatura promedio y las precipitaciones se presentan los gráficos No. 10 y No. 11, respectivamente.

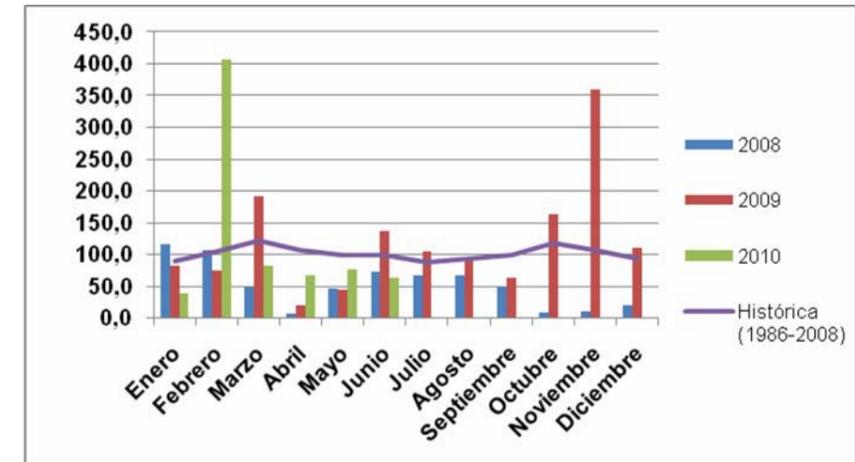
Figura No. 10. Temperatura media mensual según el año e histórica nacional (°C).



Fuente: Estación meteorológica CIEDAG².

² SUL. Centro de Investigación y Experimentación Doctor Alejandro Gallinal. s.f. Datos agroclimáticos (2008, 2009, 2010) (sin publicar)

Figura No. 11. Precipitaciones acumuladas mensualmente según el año e histórica nacional.



Fuente: Estación meteorológica CIEDAG².

Pese a que en general las temperaturas registradas durante el experimento no difieren en forma importante, se puede afirmar que en los meses de Junio, Julio y Octubre del año 2009 fueron más fríos que el promedio histórico nacional. Al mismo tiempo, durante casi todo el 2008 y comienzos del 2009 se registraron precipitaciones por debajo de la media histórica, por ende, durante los ensayos de dicho año las condiciones climáticas no fueron las más apropiadas, lo que podría haber afectado parcialmente los resultados finales.

3.4 ANIMALES

Se trabajó con un total de 32 hembras y 5 Machos de la raza Corriedale Booroola. Los animales que poseen el gen "Booroola" en forma homocigota (dos copias del mismo gen) son la totalidad de los machos y dos de las hembras utilizadas. Las hembras pesaron en el promedio de todo el periodo 43,1 Kg, con un rango de 28 a 62 Kg, mientras que la condición corporal promedio de hembras y machos fue de $2,5 \pm$ y $3 \pm$ respectivamente.

3.4.1 Hembras dadoras

Las hembras dadoras promedian los 3 años de edad (de 2 a 5 años), son multíparas y sin antecedentes de enfermedades reproductivas como prolapsos, distocias. Se aseguró la no existencia de problemas de ubres ni la presencia de

endo o exoparasitosis previo al experimento. Respecto a esto último, al tratarse de animales propios del SUL, éstos mantienen el control sanitario según el cronograma propio de sanidad.

Las ovejas fueron seleccionadas para cada ensayo según los antecedentes en términos del número de cuerpos lúteos observados por laparoscopia. Se eligieron aquellas que presentaran por lo menos dos cuerpos lúteos en los días previos al comienzo de cada tratamiento, excepto en los dos últimos ensayos donde no fue posible realizar laparoscopia.

3.5 ALIMENTACIÓN

Los animales estuvieron sobre pasturas naturales y campo natural mejorado con Lutus Maku. La vegetación dominante sobre estos suelos de Basamento Cristalino son las gramíneas estivales, siendo las más abundantes: *Andropogon ternatus*, *Paspalum plicatulum*, *Coelorachis selloana*, *Panicum milioides*, *Axonopus affinis*, *Eragrostis neesii*, *Paspalum notatum* y *Sporobolus platensis*; mientras que las gramíneas invernales son escasas; *Piptochaetium montevidensis*, *Piptochaetium stipoides*, *Calotheca fragilis*, *Vulpia australis* y *Briza minor*. La *Stipa charruana* (gramínea invernal) de fruto agresivo y punzante, puede tornarse un problema para el pastoreo, sobre todo para el ganado ovino (Formoso et al., 2001).

Según Formoso et al. (2001), la disponibilidad de forraje estimada mediante la producción primaria neta aérea es en promedio 4218 Kg MS/ha/año (1984-2001), con un máximo de 6061 y un mínimo de 2314 Kg MS/ha/año respectivamente para el campo natural. Durante el período en el que se llevó a cabo el experimento la disponibilidad estuvo más cerca del mínimo, incluso inferior durante el período invierno 2008 a otoño 2009 explicado por el severo déficit hídrico. La carga en promedio fue de 9,33 animales/ha. Dicho valor de carga estuvo sujeto a las variaciones importantes de la oferta de forraje, dado que en estos suelos existe gran variabilidad productiva, más acentuada en las estaciones de invierno y verano.

Cabe aclarar que debido a las condiciones de extrema sequía que devenía desde el invierno del año 2008, la alimentación de los animales no llegó a cumplir los requerimientos necesarios para ganar peso, por lo que existió una disminución del mismo (desnutrición), recuperándose lentamente a partir del otoño-invierno de 2009.

3.6 TRATAMIENTOS

Se realizaron en total seis colectas de embriones, en cada una de ellas se aplicaron tratamientos de superovulación diferentes. Los dos primeros ensayos fueron en el año 2008, en las estaciones de invierno y primavera (junio y octubre). Luego, durante el 2009, se realizaron tres ensayos en las mismas estaciones, en los meses de julio, agosto y octubre; finalmente en el 2010, se culmina el trabajo de campo con una última colecta en otoño (abril). La duración de cada uno de los ensayos fue de 22-24 días, comprendidos desde la colocación de los pesarios vaginales impregnados con progestágenos hasta la colecta de embriones propiamente dicha y su posterior criopreservación.

Se evaluaron un total de 8 tratamientos combinando diferentes dosis y momentos de administración de FSH (NIH-FSH-P1; Folltropin; Bioniche, Belleville, ON, Canadá), eCG (eCG, PMSG; Inducel 5000; Universal Lab, Uruguay), manteniéndose constante la dosis de GnRH (buserelina; Receptal; Intervet International GmbH, Alemania) y progestágenos (acetato de medroxiprogesterona, Synthex). Se clasificaron en tratamientos con dosis decrecientes de FSH al 100, 86 y 30% de la dosis tomada como base (156mg), con dosis única de FSH (75%-117mg-) aplicada de una sola vez y otro donde no se aplicó FSH. En el cuadro No. 7 se detalla cada uno de los tratamientos respecto a las hormonas, dosis y número de animales (n):

Cuadro No. 7. Descripción de los tratamientos según tipo y cantidad de hormona.

No.	Nombre	FSH	eCG	GnRH	P ₄	n
T1	Dosis decreciente (100% dosis)	156 mg	200 UI	30ug	60 mg	14
T2	Dosis decreciente (86% dosis)	134,2 mg	200UI	30ug	60 mg	5
T3	Dosis decreciente (30% dosis)	46,8 mg	200 UI	30ug	60 mg	6

T4	Dosis única (75% dosis) 36h antes de eCG	117 mg	400UI	30ug	60 mg	3
T5	Dosis única (75% dosis) 24h antes de eCG	117 mg	400UI	30ug	60 mg	10
T6	Dosis única (75% dosis) 12h antes de eCG	117 mg	400UI	30ug	60 mg	4
T7	Dosis única (75% dosis) simultáneo con eCG	117 mg	400UI	30ug	60 mg	3
T8	Sin FSH		1400UI	30ug	60mg	4

Fuente: elaboración propia.

A su vez, también se realizaron dos tratamientos a forma de prueba, utilizando un animal para cada uno de ellos, denominándose T9 y T10. Consistieron en la aplicación de una dosis única de FSH, similares a los tratamientos T6 y T7 pero sin la administración de eCG, es decir a las 12h y simultáneo con respecto al retiro de los pesarios vaginales, respectivamente.

Cada uno de los tratamientos se llevó a cabo respetando el protocolo en donde se tenía en común la duración del mismo (23-24 días), el inicio de la sincronización con la colocación de los pesarios vaginales impregnados con 60mg de acetato de medroxiprogesterona, el momento y dosis de la administración de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), el periodo de ayuno previo a la colecta de embriones, el momento del servicio y la colecta de los embriones propiamente dicha (metodología utilizada). En todos los casos las hormonas fueron administradas por vía intramuscular.

El momento de la colocación de los pesarios vaginales se consideró como el "día cero" para cada protocolo. Se sustituyeron los pesarios por otros

nuevos en la mañana del día 9 y se retiraron definitivamente el día 15. La GnRH fue administrada el día 16 (18:00h) pasadas 35h luego de haber retirado los pesarios.

El servicio a las ovejas dadoras comenzó siempre en la mañana del día 16 y consistió en una monta dirigida o a corral y, luego de asegurar el coito, se mantuvieron en un potrero apartado con alimento y agua ad-libitum durante aproximadamente 6 días. Hubo un período de ayuno completo previo a la colecta de embriones con una duración de 1,5 días. En los ensayos de invierno del año 2009, además de realizar el servicio mediante monta natural, se hizo también inseminación artificial por vía cervical con semen fresco a aquellas ovejas en las cuales no se tenía la certeza de que habían sido efectivamente fertilizadas. La colecta de embriones se realizó pasados 6-7 días del servicio.

3.6.1 Tratamientos con dosis decrecientes de FSH

Consistieron en administrar 4 dosis de FSH (cada una dos veces en el día con un intervalo de 12h) en forma decreciente comenzando en la mañana (8:00 a.m.) del día 12. La eCG se aplicó el día 15 luego de ser retirados los pesarios vaginales con una dosis de 200UI. Siguiendo el procedimiento del tratamiento T1, con dosis decrecientes de FSH, el cual contenía un total de 156mg de FSH, se realizaron dos sub-dosis de FSH del 86% (T2) y 30% (T3) de la cantidad administrada en el mismo, es decir 134,2 y 46,8mg respectivamente. La secuencia de las dosis fue cada 12h de la siguiente manera: 30-30, 20-20, 16-16 y 12-12mg (T1), 25,8-25,8; 17,2-17,2; 13,8-13,8 y 10,3-10,3mg (T2), y 9-9; 6-6; 4,8-4,8 y 3,6-3,6mg (T3). Para estos ensayos se utilizaron 14, 5 y 6 ovejas para cada uno de ellos respectivamente. En el cuadro No. 8 se presenta el protocolo a seguir según los días y horarios.

Cuadro No. 8. Protocolo de tratamientos con dosis decrecientes de FSH.

DIA	Horario	Tratamiento	Dosis
DIA 0	8.00 a.m.	Colocación de pesarios	1mL oxitetraciclina (20%) por pesario
DIA 9	8.00 a.m.	Cambio de pesarios	
DIA 12	8.00 a.m.	FSH	30/25,8/9mg
	8.00 p.m.	FSH	30/25,8/9mg
DIA 13	8.00 a.m.	FSH	20/17,2/6mg
	8.00 p.m.	FSH	20/17,2/6mg
DIA 14	8.00 a.m.	FSH	16/13,8/4,8mg

	8.00 p.m.	FSH	16/13,8/4,8mg
DIA 15	8.00 a.m.	Retiro pesarios	
		eCG	200 UI
		FSH	12/10,3/3,6mg
	8.00 p.m.	FSH	12/10,3/3,6mg
DIA 16	6.00 p.m.	GnRH	Buserelina (30ug)
	10.00 a.m.	Servicio por carneros	
DIA 22		Ayuno	
DIA 23	8.30 a.m. - 1.30 p.m.	Colecta de embriones	

Fuente: elaboración propia.

3.6.2 Tratamientos de única dosis de FSH

En estos tratamientos se aplicó una única dosis concentrada de FSH (117mg) variando el momento de su administración. En el cuadro No. 9 se detalla el protocolo a seguir según el tratamiento, identificándolos como: T4, T5, T6 y T7 respectivamente, según el momento de la administración de la FSH.

Cuadro No. 9. Protocolo de tratamientos de única dosis de FSH.

DIA 0	8.00 a.m.	Colocación de pesarios	1mL oxitetraciclina (20%) por pesario
DIA 9	8.00 a.m.	Cambio de pesarios	
DIA 13	8.00 p.m.	FSH	Dosis única (T4) -117 mg-
DIA 14	8.00 a.m.	FSH	Dosis única (T5) -117 mg-
	8.00 p.m.	FSH	Dosis única (T6) -117 mg-
DIA 15	8.00 a.m.	Retiro pesarios	
		eCG	400 UI
		FSH	Dosis única (T7) -117 mg-
DIA 16	7.00 p.m.	GnRH	Buserelina (30ug)
	10.00 a.m.	Servicio por carneros	
DIA 22		Ayuno	
DIA 23	8.30 a.m.- 1.30 p.m.	Colecta de embriones	

Fuente: elaboración propia.

3.6.3 Tratamiento sin FSH

De igual forma que los demás tratamientos, es decir respetando el mismo protocolo en términos de su duración, administración de progestágenos,

aplicación de GnRH y servicio, se realizó un ensayo en invierno y otoño, con 4 ovejas sin la utilización de la hormona folículo estimulante. Este tratamiento consistió en aplicar una sola dosis concentrada de eCG (1400UI) al momento de retirar los pesarios vaginales (mismo momento que el resto de los demás tratamientos) y fue identificado como T8.

3.7 SERVICIOS

Los servicios se realizaron mediante monta dirigida o a corral desde las 9:00 a.m. a 20:00 p.m., verificando la cópula a través de observación se semen en la vagina de la hembra donante. En aquellos casos en los que la monta no se pudo concretar de forma efectiva, se procedió a la extracción de semen de un carnero y se realizó inseminación artificial por vía cervical con semen fresco (en los dos primeros ensayos del 2009) o bien, no se logró realizar el servicio (último ensayo) debido a que algunas de las hembras presentaron celo silente.

3.8 COLECTA

Como ya se mencionó, ésta se realizó a los 6-7 días, de manera que el estado de desarrollo de los embriones sea entre mórula y blastocisto. La técnica que se utilizó es del tipo australiana y consistió en hacer un lavado o flushing de los cuernos uterinos por vía quirúrgica o semi-laparoscópica. La operativa de colecta se realizó con la oveja colocada en decúbito dorsal, sujeta en una camilla a 45° aproximadamente. Como ya se mencionó, las ovejas dadoras permanecieron en ayuno absoluto previo a la colecta, con el fin específico para la realización de la cirugía.

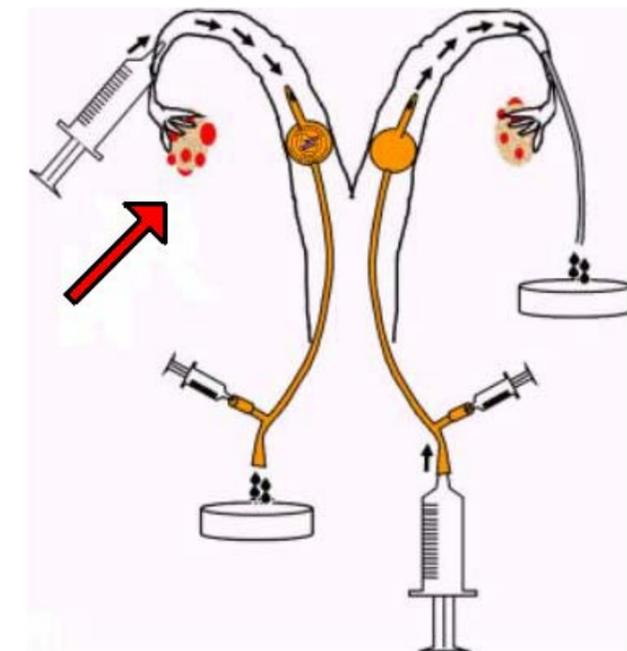
3.8.1 Metodología de colecta y materiales utilizados

En primer lugar se anestesió con 2cc de sedante (Acedan, Holliday Scott S. A.) y se le administró 4mL de antibiótico (Calimicina, 1mL contiene 200mg de oxitetraciclina en solución con polivinil-pirrolidona, Calier S. A.) a cada animal, se lavó con esponja la zona inguinal con agua y yodo, colocando un filtro poroso (0,20µm) no pirogénico con un orificio cuadrado (10x10cm) utilizado como campo de trabajo.

Luego de afeitar la zona de incisión, se procedió a realizar el corte de 3-4cm aproximadamente en la línea blanca o media con un bisturí, manteniendo libre de sangre la herida con una gasa limpia. Se observaron los ovarios cuantificando el número de cuerpos lúteos haciéndose el lavaje o flushing al

cuerno que poseía 3 o más de éstos, extrayendo hacia el exterior cada cuerno uterino y oviducto correspondiente con ayuda de un abre panzas. A partir de este momento se roció paulatinamente con una piceta de suero fisiológico heparinizado (20000UI/L) para evitar la posible formación de adherencias. Con una aguja suplente o secundaria de croché se penetró el cuerno en la base, en ese orificio se introdujo una sonda Foley N°8 (pediátrica) haciendo llenar el balón con suero, heparina (20000UI/L) y aire de manera que no retorne el líquido de colecta (solución buffer ringer lactato, Lab. Fármaco Uruguayo). Se introdujo un catéter retráctil de G18 en la unión útero tubal mediante el cual se conectaba una jeringa de 20mL conteniendo la solución buffer lactato a 40°C y se procedió al lavado del cuerno uterino desde dicha unión hasta la parte basal del mismo recogiendo dicha solución junto con los embriones, ovocitos no fertilizados y otra materia en una caja de Petri estéril. En la figura No. 12 se muestra en forma esquemática la metodología de colecta (flecha roja) mediante la inyección continua anterógrada.

Figura No. 12. Esquema de la técnica de colecta.



Fuente: CURSO MULTIOVULACIÓN Y TRANSFERENCIA DE EMBRIONES³.

La cantidad de líquido introducido no fue nunca menor de 40mL, variando

³ CURSO MULTIOVULACIÓN Y TRANSFERENCIA DE EMBRIONES (2009, Cerro Colorado, Florida) Material de apoyo (sin publicar).

el volumen según la cantidad esperada de embriones a colectar (cuerpos lúteos observados en el ovario previamente). Finalmente, se introdujo en la cavidad pélvica 250mL de suero fisiológico heparinizado (20000UI/lit) para luego realizar una sutura doble (peritoneo y cuero) con aguja e hilo de lino. Por último, se roció la herida con cura-bichera. La duración aproximada de cada cirugía fue de 5 a 15 minutos, dependiendo de la cantidad de cuerpos lúteos observados al inicio de la operación.

Todo el instrumental utilizado en la cirugía fue previamente esterilizado con cloruro de benzalconio al 1%. Antes de dejar en libertad a la oveja, se le administró 2mL de antibiótico, 1mL de prostaglandina (Clopostenol, 1mL contiene 250ug de D-L coprostenol) con el fin de lisar el o los cuerpos lúteos que sobrevivieran por la presencia de un embrión no colectado y cura-bichera (Cibeles, Uruguay).

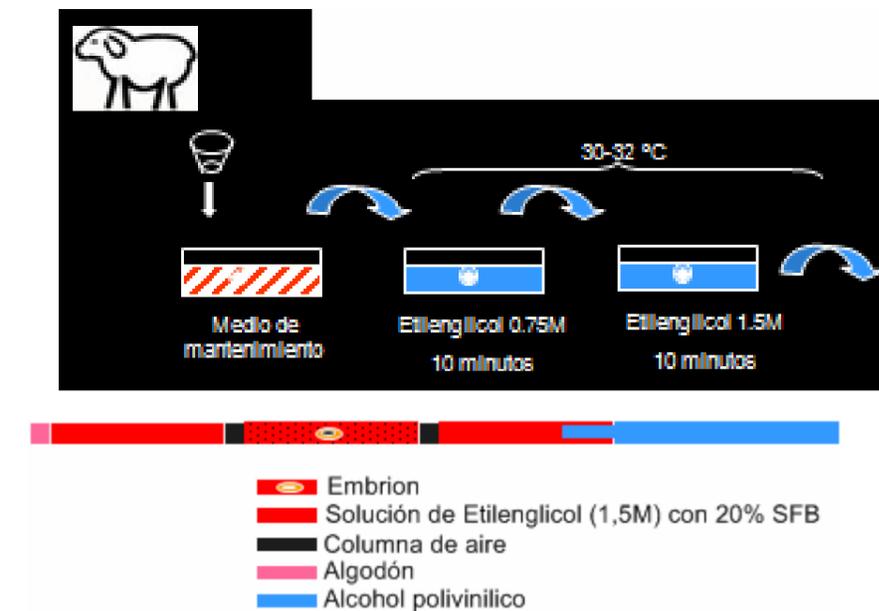
3.9 CRIOPRESERVACIÓN

Inmediatamente después de ser recogido el líquido de colecta, se observó bajo lupa (Olympus SZ60) utilizando 10-20 aumentos para la búsqueda, identificación y manipulación de embriones y aumentos más grandes (40 a 60X) para la evaluación y clasificación de los mismos. Posteriormente, se trasladaron al medio de mantenimiento "Holding" (Minitub, USA) compuesto por una solución isotónica de PBS (fosfato buffer salina) con albúmina bovina y antibiótico (0,4%) y se determinó el estado de desarrollo y calidad de cada embrión. La evaluación de calidad fue realizada según la IETS (International Embryo Transfer Society)¹, la cual supone cuatro grados: grado 1: excelente o buena, grado 2: regular, grado 3: pobre y grado 4: degenerado o muerto. Solamente fueron congelados aquellos embriones que presentaban la calidad referente a los grados 1 y 2, en un estado de desarrollo de mórula y blastocisto.

El crioprotector utilizado fue etilenglicol (ETG) en una concentración final de 1,5 molar (M) siguiendo la metodología de M^a Jesus Cocero (Garcia Garcia et al., 2005, 2006). Se procedió a trasladar los embriones desde el medio de mantenimiento (Holding) al crioprotector en dos pasos, a temperatura ambiente: 1) ETG en una concentración de 0,75 molar (M) durante 10 minutos y 2) ETG en una concentración de 1,5M durante 10 minutos. Luego de esto, los embriones fueron cargados en pajuelas plásticas de 0,25mL (dos embriones por pajuela) dentro de una columna ubicada en el centro con el crioprotector (1,5M) y medio PBSS (PBS más 20% de suero fetal bovino), separada hacia ambos

lados (por burbujas de aire) de otras dos columnas conteniendo la misma solución (PBSS). En la figura No. 13 se presenta a modo de esquema la metodología utilizada y en qué forma queda la pajueta para ser llevada a la máquina congeladora programable (Cryocell 1200, Minitub), la cual utiliza como refrigerante nitrógeno líquido.

Figura No. 13. Pasos a seguir previo a colocar los embriones en la pajueta.



Fuente: CURSO MULTIOVULACIÓN Y TRANSFERENCIA DE EMBRIONES³.

El sistema de enfriamiento lento utilizado fue el descrito por Cocero et al. (1996, 2005, 2006), el cual consistió en disminuir la temperatura (1°C por minuto) hasta -7°C, posteriormente realizar el seeding, continuar bajando la temperatura (0,3°C por minuto) hasta -30°C y luego hasta -35°C a 0,1°C por minuto, para finalmente sumergir las pajuelas en nitrógeno líquido (-196°C).

3.10 DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental fue completamente aleatorio ya que se origina por la asignación aleatoria de tratamientos a un conjunto de unidades experimentales previamente determinado. Este diseño puede constituir la disposición más factible para verificar ciertos tipos de tratamientos en animales (Little y Hills, 1976).

Se compararon tratamientos diferentes en cuanto a la aplicación de FSH, su forma de administración (dosis decrecientes y dosis única) y cantidad de eCG. Por otro lado se compararon tratamientos que diferían únicamente en el momento de la administración de eCG, respecto al retiro de los pesarios vaginales en 36, 24 y 12h antes, y también aplicando la eCG al mismo momento del retiro.

3.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La variable analizada fue tasa ovulatoria, medida como el número de cuerpos lúteos y se estudió utilizando la distribución Poisson mediante el uso de modelos lineales generalizados, incluyendo los efectos fijos de tratamiento y época del año.

El análisis estadístico fue realizado mediante el procedimiento GENMOD del programa SAS, publicado en 2002. Fueron obtenidas las medias de mínimos cuadrados ajustadas por el método de Tukey utilizando un nivel de significancia del 5 y 10%.

Respecto al número de embriones colectados y congelados, el análisis estadístico utilizado fue el de prueba no paramétrica de porcentajes (Dagnielle, 1971).

En cuanto al porcentaje de respuesta y eficiencia, el análisis estadístico fue el de prueba no paramétrica (Chi cuadrado).

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo se utilizaron ovejas portadoras del gen Booroola, más allá de que se trate de un genotipo prolífico, Azzarini (1992) afirma que la variación genética de la tasa ovulatoria evidenciada en condiciones naturales de reproducción, puede no estar controlada por los mismos genes que determinan la respuesta a los métodos artificiales de multiovulación. Es por esto que la discusión se centra en la respuesta a distintos tratamientos de superovulación y sus efectos sobre la actividad ovárica y producción embrionaria.

Existen factores como la raza, edad y cantidad de partos previos de la oveja donante, lugar geográfico (fotoperíodo, temperatura, régimen de precipitaciones, condiciones alimenticias y de manejo), que podrían explicar la alta variabilidad respecto a las respuestas diferenciales de tratamientos de superovulación.

Globalmente y tomando en cuenta con lo revisado en la bibliografía, existen diferencias en los distintos tratamientos que pueden explicar las posibles causas de por qué difieren los resultados a veces tan notablemente con los obtenidos en este trabajo. Entre ellos se pueden citar: dosis parciales y totales de FSH, dosis de GnRH y/o eCG, como también el tipo de hormona folículo estimulante (origen, pureza, otros) o bien el protocolo de sincronización y tipo de progesterona utilizada (CIDER vs pesarios vaginales).

4.1 TRATAMIENTOS CON DOSIS DECRECIENTES DE FSH

4.1.1 Respuesta ovárica

Cuadro No. 10. Actividad ovárica de cada animal según tratamiento e indicación de casos donde se realizó la colecta de embriones.

		Dosis decrecientes de FSH			
TRATAMIENTO	n	Cuerpos lúteos			Colecta
T1	14	O.I	O.D	T.O.	
		1fol	2fol	0	NO
		8	9	17	SI
		5	1	6	SI
		11	7	18	SI
5	5	10	SI		

		19	15	34	SI
		1+1fol	3+1fol	4	SI
		6	7	13	SI
		2	2	4	SI
		0	0	0	NO
		4	5	9	SI
		0	0	0	NO
		3 *	3 (1*)	6	NO
		3fol	4fol	0	NO
TOTAL	14	64	47	121	64,3%
T2	5	5	1	6	SI
		0	0	0	NO
		3+1fol	7	10	SI
		1fol	2	2	NO
		9	8	17	SI
TOTAL	5	17	18	35	60%
T3	6	0	3	3	SI
		0	0	0	NO
		4	6	10	SI
		0	0	0	NO
		3	3	6	SI
		0	0	0	NO
TOTAL	6	7	12	19	50%

*en regresión o de mala calidad.

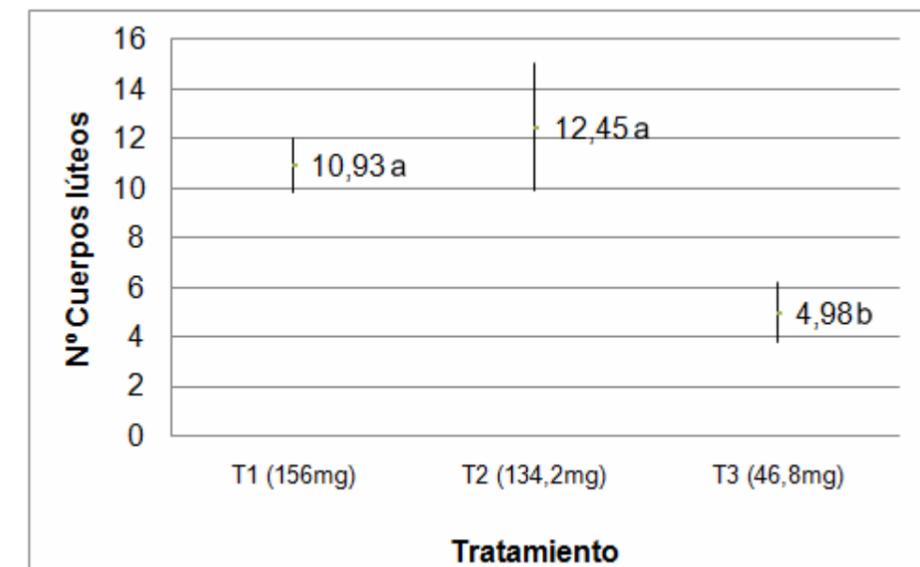
Fuente: elaboración propia.

Como se puede observar en el cuadro No. 10, hubo en todos los casos una actividad ovárica significativa, realizándose colecta únicamente en aquellos casos donde la tasa ovulatoria fue mayor a 3, excepto para un animal donde igualmente se le sometió a cirugía con 3 CL en el ovario derecho con el fin de observar la calidad de los embriones. El porcentaje de animales a los cuales se les realizó colecta para los tres casos fue similar, con un valor promedio del 58% aproximadamente.

Respecto al número de animales que respondieron a los diferentes tratamientos con dosis decrecientes de FSH, es decir que presentaron 3 o más cuerpos lúteos, el porcentaje de respuesta fue de 71,4 (10/14); 60 (3/5) y 50 (3/6) para T1, T2 y T3, respectivamente, no habiendo diferencias significativas.

Esta magnitud de respuesta es similar a las alcanzadas por Jabbour y Evans (1991) con un rango de 70-100%, Rexroad y Powell (1991) con 75%, Aké López et al. (2003) con 70% y Menchaca et al. (2009) con un 85,9% (ovejas con 2 o más cuerpos lúteos). La falta de respuesta de algunas ovejas podría ser debido a las variaciones individuales al efecto inhibitorio de las altas concentraciones de FSH utilizadas, lo cual Jabbour y Evans (1991) sugieren que actué a través de factores de regulación intra-ováricos del crecimiento folicular.

Figura No. 14. Tasa ovulatoria promedio (número de cuerpos lúteos) según el tratamiento con dosis decrecientes de FSH y sus respectivos desvíos estándar.



Nota: $P \leq 0,05$

Fuente: elaboración propia.

Tal como se observa en el gráfico anterior, los tratamientos T1 y T2 presentaron mayor actividad ovárica reflejada en una tasa ovulatoria de $10,93 \pm 1,08$ y $12,45 \pm 2,57$ respectivamente y no difieren significativamente entre ellos, pero sí del tratamiento T3, del cual se obtuvo un nivel ovulatorio de $4,98 \pm 1,23$ ($P \leq 0,05$). Al compararlos con lo reportado en la bibliografía (ver cuadro No. 4), si bien no se han encontrado protocolos de superovulación que coincidan exactamente con los realizados, éstos resultados son similares a los trabajos realizados por Bonino et al. (1989) en ovejas Corriedale con 8,0 y 8,6

CL (con rangos muy amplios, de 2-15 y 4-12, respectivamente), Jabbour y Evans (1991) en Merino ($11,1 \pm 2,1$ y $11,4 \pm 1,8$ CL), González Bulnes et al. (2002, 2003b, 2005) en la raza Manchega, obteniendo para cada caso según el año, $11,4 \pm 1,4$; $11,1 \pm 1,1$; 12,2 y 10,5 CL respectivamente, Aké López et al. (2003) en Pelibuey ($12,41 \pm 8,10$ y $8,28 \pm 7,78$ CL), Menchaca et al. (2009) en Merino ($10,3 \pm 0,7$ y $13,5 \pm 1,4$ CL).

Las diferencias más relevantes a destacar con respecto a los antecedentes encontrados, son el uso de FSH combinado con eCG administrado al momento de retirar los pesarios vaginales y la aplicación y/o dosis de GnRH, así como también, la dosis total de FSH, la cual fue siempre marcadamente superior en este trabajo (todos los tratamientos).

Cabe aclarar que tampoco se han encontrado en la bibliografía antecedentes de este tipo de tratamientos en ovejas portadoras del gen Booroola. Pese a esto, se puede afirmar que existió respuesta a los tratamientos ya que las tasas ovulatorias fueron muy superiores a las observadas en condiciones normales (sin tratamiento) 4,3 y 5,0 (Fernández Abella, 1995).

No se observaron diferencias según época del año, en la respuesta ovulatoria ni en el porcentaje de ovejas que responden.

En términos de evaluar los efectos de aplicar la FSH en forma decreciente, se corrobora para esta variedad lo enunciado por Jabbour y Evans (1991), Batt (1993). Estos autores señalan la mayor eficiencia en cuanto a resultados en el nivel ovulatorio cuando se utilizan en forma combinada dosis decrecientes de FSH y una sola aplicación de eCG (dado su vida media más larga), logrando una menor perturbación en los niveles y patrones pre-ovulatorios de secreciones de estrógenos y LH, al mismo tiempo se logra un ambiente más favorable para la fertilización y desarrollo embrionario temprano dentro del tracto reproductivo de la hembra. Si llegara a interrumpirse la secreción de estrógenos en cualquier etapa, provocaría atresia de folículos (Hafez y Hafez, 2002), lo cual es muy indeseable para lograr una adecuada multiovlación.

La utilización de GnRH mejora la respuesta al tratamiento superovulatorio (Azzarini, 1992), estimulando la liberación de la descarga preovulatoria de LH (Godinsky et al., Scaramuzzi et al., Karsh y Foster, citados por Gordon 1989, Evans y Maxwell 1990, Cavestany y Durán del Campo 1993). La administración de GnRH 35h luego de haber retirado los pesarios vaginales

supone hacer coincidir una descarga brusca de LH con el pico preovulatorio de LH provocado por la alta concentración de estrógenos lograda por los folículos reclutados y seleccionados (de mayor tamaño) que estimulan al hipotálamo a liberar GnRH en forma natural. Eppleston et al. (1991) verificó mediante su aplicación, 36 y 44h luego de retirar los pesarios, el rápido aumento de LH luego de las 4h del tratamiento, al mismo tiempo concluyó que el momento de la ovulación se adelanta aplicando eCG 24h antes de retirar los pesarios y que el uso de GnRH acorta el período durante el cual ocurre la ovulación. Al mismo tiempo Wolff et al. (1994) administrando también un análogo de GnRH a las 36h del retiro de pesarios, obtuvieron una tasa de fertilización del 70-80% al realizar la inseminación artificial indistintamente a las 42 o 55h post retiro de las esponjas. Pese a que en trabajos anteriores se haya utilizado esta hormona con el fin de asegurar y sincronizar la ovulación, Eppleston et al. (1991), Batt et al. (1993), Menchaca et al. (2009), lo hicieron con una dosis diferente a la utilizada en este trabajo (30ug de busarelina), de 40 y 50ug de gonadorelina y 8ug de acetato de busarelina, respectivamente, siendo ambos compuestos análogos sintéticos de GnRH.

4.1.2 Colecta de embriones

Cuadro No. 11. Clasificación y evaluación de calidad de los embriones según tratamiento, y cantidad de embriones colectados y congelados por oveja.

TRATAMIENTO	T1	T2	T3
2 Células			
4 Células			
Mórula	1(G1)1(G2) 1(G3)	3 (G1)	8 (G1)
Blastocisto Temprano			
Blastocisto	2(G1)	11(G1)	1(G1)
Blastocisto Expandido	24(G1)2(G2)	1(G1)	1(G1)
Blastocisto Colapsado	6		
Formas Inmaduras			4
No Fertilizados	8	4	
Formas Totales	45	19	14
No. Embriones colectados y congelados/oveja colectada	4,11 (37/9)*	5 (15/3)*	3,33 (10/3)*
No. Embriones colectados y congelados/oveja total	2,64 (37/14)*	3 (15/5)*	1,67 (10/6)*

*Sin diferencias significativas.

Fuente: elaboración propia.

Como puede apreciarse en el cuadro No. 11, no es posible determinar cuál de los tratamientos fue el mejor en términos estadísticos respecto al número de embriones colectados, ya sea por oveja colectada como por oveja total, dado que no se encontraron diferencias significativas.

Si se toma el total de cuerpos lúteos observados previo al momento de la colecta (de animales colectados) como posibles embriones congelados para cada tratamiento, se podría hablar de la eficiencia del método de colecta y recurso humano utilizado en cada uno de ellos. De esta manera, para el tratamiento T1 fue de 37 embriones congelados en 115 cuerpos lúteos observados (32,17%), para el T2 fue de 15 en 33 (45,45%) y para el T3 fue de 10 en 19 (52,63%), para un total de ovejas colectadas de 9, 3 y 3, respectivamente, sin presentar diferencias significativas. El número de embriones transferibles por oveja colectada según los tratamientos (ver cuadro No. 4) es similar al alcanzado por Rexroad y Powell (1991) con $5,0 \pm 1,1$; Aké López et al. (2003) en la raza Pelibuey con $4,00 \pm 4,86$; González Bulnes et al. (2003b) en Manchega con $4,3 \pm 1,4$ y por Menchaca et al. (2009) en Merino con $3,6 \pm 0,5$ o $3,2 \pm 0,5$ según si aplicaba 200 o 300UI de eCG, respectivamente, siempre para tratamientos con dosis decrecientes de FSH.

Respecto a la evaluación de calidad de los embriones, éstos fueron de muy buena calidad (grados 1 y 2 según la IETS) excepto por uno (mórula) obtenida en el tratamiento T1, la cual presentó calidad pobre (grado 3).

Para los tratamientos T1 y T2 se obtuvo mayor número de embriones en general, pese a que no se hayan encontrado diferencias significativas en términos estadísticos, pero se podría suponer que existen mayores chances de que haya habido una menor fertilización (8 y 4 ovocitos no fertilizados, respectivamente) y por ende más ovocitos reabsorvidos, de ahí que no aparezcan ni siquiera en el líquido de colecta. Lo anterior podría suponerse a que concentraciones muy elevadas de FSH podrían tener un efecto negativo respecto al grado de fertilización y desarrollo embrionario temprano o bien por las condiciones imperantes al momento del servicio (estrés) dado que se implementó la monta a corral y/o dirigida y a situaciones climáticas desfavorables (bajas temperaturas, lluvia y viento).

4.2 TRATAMIENTOS DE ÚNICA DOSIS DE FSH

4.2.1 Respuesta ovárica

Cuadro No. 12. Actividad ovárica de cada animal según tratamiento e indicación de casos donde se realizó la colecta de embriones.

TRATAMIENTO	n	Cuerpos lúteos			Colecta
		O.I	O.D	T.O.	
T4	3	0	0	0	NO
		2fol	0	0	NO
		0	1	1	NO
TOTAL	3	2	1	1	0%
T5	10	1	7	8	SI
		2	2	4	NO
		5	9	14	SI
		3	2	5	SI
		0	2fol	0	NO
		2	5	7	SI
		5*	4 (2*)	9	SI
		5	7	12	SI
		2	8	10	SI
		8	2+1fol	10	SI
TOTAL	10	33	46	79	80%
T6	4	5	5	10	SI
		4	4	8	SI
		2	1	3	SI
		0	0	0	NO
TOTAL	4	11	10	21	75%
T7	3	6	7	13	SI
		3*	3*	6	SI
		4	2	6	SI
TOTAL	3	13	12	25	100%

*en regresión o de mala calidad.

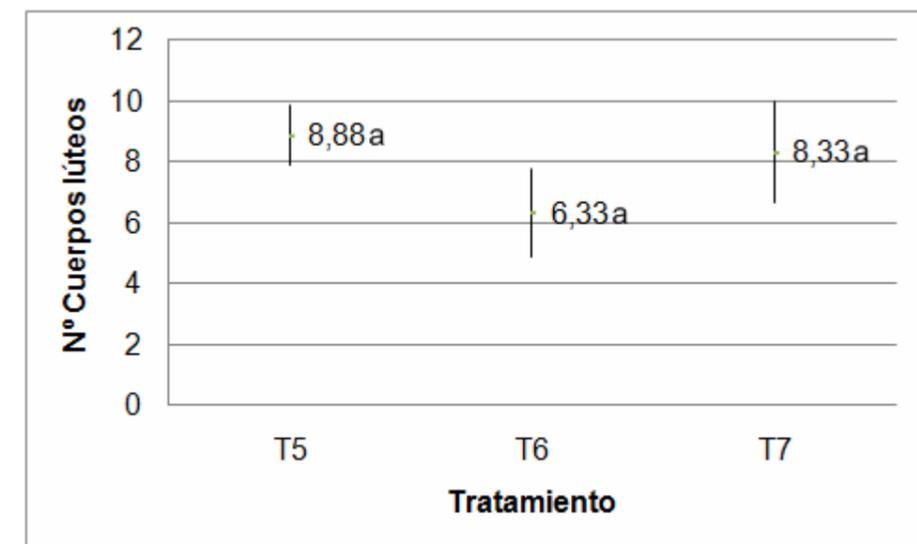
Fuente: elaboración propia.

Respecto al tratamiento T4, éste no amerita a ser incluido en la presente discusión ni en el análisis estadístico ya que hubo solamente un animal que

efectivamente ovuló y lo hizo mostrando un único cuerpo lúteo, por ende se descarta como posible tratamiento superovulatorio. Podría suponerse que la FSH aplicada 36h antes de retirar los pesarios y administrar eCG es demasiado tiempo, dado su corta vida media.

Los niveles de respuesta, es decir, la proporción de ovejas que mostraron 3 o más cuerpos lúteos fue de 90, 75 y 100% para T5, T6 y T7, respectivamente, no siendo significativas las diferencias, siendo estos valores similares o bien superiores a los encontrados en la bibliografía (ver ítem anterior).

Figura No. 15. Tasa ovulatoria promedio (número de cuerpos lúteos) según el tratamiento con dosis única de FSH y sus respectivos desvíos estándar.



Nota: $P \geq 0,05$

Fuente: elaboración propia.

Tal como se observa en la figura No. 15, existen dos tratamientos (T5 y T7) que se destacan en su nivel ovulatorio logrado, con $8,88 \pm 0,99$ y $8,33 \pm 1,68$ cuerpos lúteos, respectivamente, aunque no sea correcto afirmar que son mejores ya que no difieren significativamente del tratamiento T6, el cual resultó en $6,33 \pm 1,47$.

En lo que refiere a lo revisado en la bibliografía, no se encontraron

resultados de ninguno de estos tratamientos o similares, es decir que consistan en la administración de FSH en forma de una única dosis concentrada en ovinos, por lo que no es posible elaborar una discusión concreta. Existe, sin embargo, un estudio realizado por Batt et al. (1993) en cabras, donde se evaluó la respuesta de tratamientos con la utilización de dos tipos de FSH de diferente origen (porcino y ovino (Ovagen)) aplicando una sola dosis en combinación con eCG, obteniendo un número variable de cuerpos lúteos y embriones (ver cuadro No. 4). Dentro de los tratamientos realizados por Batt et al. (1993) los resultados que más se asemejan a los evaluados aquí son los que combinan una dosis única de 12mg de FSH porcina aplicada 48h antes de retirar los pesarios vaginales, con 200 o 400UI de eCG al mismo momento, obteniendo tasas ovulatorias de 8,7 y 9,9, respectivamente.

4.2.2 Colecta de embriones

Cuadro No. 13. Clasificación y evaluación de calidad de los embriones según tratamiento, y cantidad de embriones colectados y congelados por oveja.

TRATAMIENTO	T4 (36h antes de eCG)	T5 (24h antes de eCG)	T6 (12h antes de eCG)	T7 (simultáneo eCG)
2 Células	0	0	1	1
4 Células	0	0	0	1
Mórula	0	1 (G2)	2(G1)	4(G1)
Blastocisto Temprano	0	4(G1)+1(G2)	0	1(G1)
Blastocisto	0	2(G1)+1(G2)	1(G1)	0
Blastocisto Expandido	0	10(G1)+2(G2)	3(G1)	0
Blastocisto Colapsado	0	2	3	0
Formas Inmaduras	0	3	3	0
No Fertilizados	0	3	0	0
Formas Totales	0	29	13	7
No. Embriones colectados y congelados/oveja colectada	0 (0/0)	2,88 (23/8)*	4,5 (9/2)*	1,67 (5/3)*
No. Embriones colectados y congelados/oveja total	0 (0/3)	2,3 (23/10)*	2,25 (9/4)*	1,67 (5/3)*

*Sin diferencias significativas.

Fuente: elaboración propia.

Según los resultados del cuadro No. 13, dentro de los tratamientos que produjeron embriones (T5, T6 y T7) no existen diferencias significativas en términos estadísticos respecto a la cantidad obtenida por oveja colectada ni por oveja total. Pese a esto, parece ser que el tratamiento T6 fue el más efectivo en producir embriones en términos del número alcanzado por oveja colectada, sin embargo, si se toma en cuenta el número total de ovejas tratadas, es el tratamiento T5 el que logra mejores resultados ya que se colectan un mayor número de animales. En términos de contabilizar los embriones congelados (por su estado y calidad que corresponde) respecto a los cuerpos lúteos observados previo a la colecta, se demostró una mayor eficiencia en el método y recurso humano en el tratamiento T6 con un 42,9% (9 embriones congelados de 21 cuerpos lúteos), respecto a un 30,7% (23/75) y 20% (5/25) obtenidos en los tratamientos T5 y T7, respectivamente, pese a que no existan diferencias significativas entre estos tres tratamientos.

Cabe destacar que no se encontraron similitudes en cuanto a estos tratamientos con lo reportado en la bibliografía para ovinos, por lo que quedará en manos de futuras investigaciones validar o no la eficacia de los mismos.

4.3 TRATAMIENTO SIN FSH

Cuadro No. 14. Actividad ovárica según tratamiento de dosis única de eCG.

		T8 (Sin FSH)			
FECHA	N	Cuerpos lúteos			Colecta
		O.I.	O.D.	T.O.	
INVIERNO	2	2fol	2fol	0	NO
		1	2	3	NO
OTOÑO	2	2+2fol	1	3	NO
		2+1fol	1+1fol	3	NO
TOTAL	4	5	4	9	0%

Fuente: elaboración propia.

Pese a que se evidencia actividad ovárica, este tratamiento no se considera efectivo ya que las tasas ovulatorias registradas son normales para la

raza en cuestión. Esto coincide con lo revisado en la bibliografía, donde Evans et al. (2001) con cruza Suffolk, obtuvo valores similares de tasas ovulatorias ($2,5\pm 0,3$ y $2,0\pm 0,3$) variando los días con progestágenos, aunque utilizando una dosis menor de eCG (500UI). Por otro lado, Armstrong y Evans en 1983 aplicaron este tratamiento utilizando una dosis de 1500-2000UI y obtuvieron tasas ovulatorias e incluso de recolección de embriones superiores, de $7,7\pm 1,4$ y $3,5\pm 1,6$, respectivamente para la raza Suffolk.

Los mejores resultados fueron los de Jabbour y Evans en 1991 en la raza Merino, quienes aplicaron la única dosis (1200UI) 48h antes de retirar los pesarios vaginales, con $11,4\pm 1,8$ cuerpos lúteos promedio por animal. Es decir, administrando una dosis similar como la del ensayo en estudio, podrían obtenerse mejores respuestas adelantando el momento de aplicación, aunque esto estará sujeto a posterior investigación.

4.4 OTROS TRATAMIENTOS

4.4.1 Dosis concentrada de FSH sin aplicación de eCG

Cuadro No. 15. Actividad ovárica según tratamientos de dosis única de FSH sin la administración de eCG.

FECHA	T9 (Única 12h antes de retirar pesarios)				T10 (Única simultáneo al retiro de pesarios)					
	n	Cuerpos lúteos			Colecta	n	Cuerpos lúteos			Colecta
INVIERNO		O.I.	O.D.	T.O.		O.I.	O.D.	T.O.		
		1	2	1	3	SI	1	0	2	2

Fuente: elaboración propia.

Pese a que las tasas ovulatorias de estos tratamientos no son lo suficientemente elevadas como para catalogarlos como “efectivos”, igualmente se decidió a realizar la colecta con el fin de observar la calidad de los embriones.

La respuesta observada puede agregar evidencia de que es necesario utilizar en forma conjunta las dos hormonas (FSH y eCG) en tratamientos de superovulación.

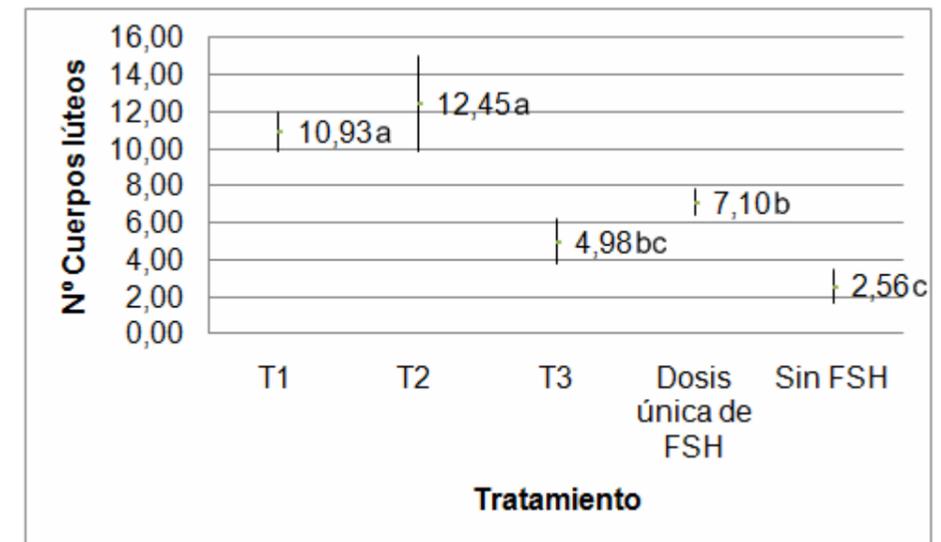
Respecto al número y evaluación de la calidad de los embriones

colectados, se obtuvieron 2 embriones en estado de blastocisto y blastocisto expandido, ambos de calidad excelente (G1) en el tratamiento T9, y 2 embriones en estado de mórula en el tratamiento T10.

4.5 COMPARACIÓN ENTRE TRATAMIENTOS

Si comparamos los tratamientos que difieren en forma importante respecto a la FSH, es decir, si se administra o no dicha hormona, y en qué forma (dosis decrecientes vs. única), se podría determinar cuál de ellos es más efectivo en términos generales. De esta manera, en el siguiente gráfico se muestran los resultados de tasa ovulatoria, con sus respectivos desvíos estándar.

Figura No. 16. Tasa ovulatoria promedio (número de cuerpos lúteos) según el tratamiento y sus respectivos desvíos estándar.



Nota: $P < 0,05$

Fuente: elaboración propia.

Tal como se observa en la figura No. 15, la respuesta es diferente según los tratamientos, siendo mayor la del tratamiento T2 ($P < 0,05$), cuando se aplicó un total de 134,2mg de FSH en forma decreciente, con un total de $11,19 \pm 2,31$ cuerpos lúteos promedio y una tasa ovulatoria de $12,45 \pm 2,57$. El supuesto inicial podría haber sido que la mayor respuesta iba a ser del tratamiento T1 con

una dosis total de 156mg de FSH también en forma decreciente, dado por una mayor estimulación de folículos pequeños en cuanto a su crecimiento y desarrollo, y en consecuencia, una mayor producción de estrógenos, pero esto no resultó así, ya que el número promedio de cuerpos lúteos de este último fue de $7,45 \pm 0,73$ y su tasa ovulatoria de $10,93 \pm 1,08$.

Cuadro No. 16. Resultados de actividad ovárica y producción de embriones según el tratamiento de superovulación.

	T1	T2	T3	D. única	Sin FSH
No. donantes	14	5	6	20	4
No. donantes $c/\geq 3CL$ (%)	10 (71,4)	3 (60)	3 (50)	15 (75)	3 (75)
CL/donante (P \square 0,10)	$7,45 \pm 0,73b$	$11,19 \pm 2,31a$	$2,14 \pm 0,53d$	$5,57 \pm 0,55c$	$1,76 \pm 0,61d$
Tasa ovulatoria (P \square 0,05)	$10,93 \pm 1,08^a$	$12,45 \pm 2,57a$	$4,98 \pm 1,23bc$	$7,10 \pm 0,70b$	$2,56 \pm 0,89c$
No. embriones/ ov. total*	2,64	3,00	1,67	1,85	0
No. emb./ov. colectada*	4,11	5,00	3,33	2,85	0
Emb. congelados/ CL ov. colectada (%)*	4,11/12,78 (32,17)	5,00/11 (45,5)	3,33/6,33 (52,6)	2,85/8,64 (33,0)	0 (0)

*No se encontraron diferencias significativas.

Fuente: elaboración propia.

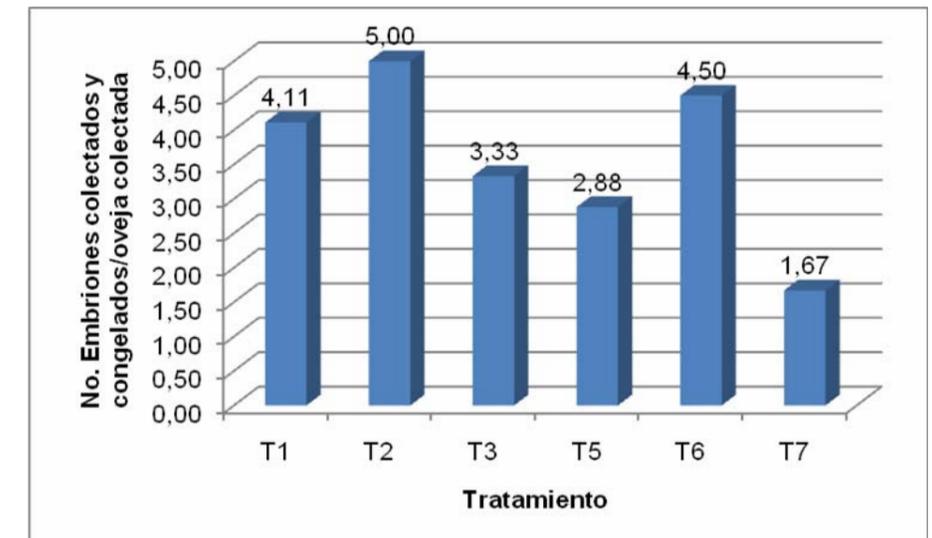
En cuanto al nivel de respuesta, sí hubo diferencias significativas entre los tratamientos de dosis decrecientes de FSH (T1, T2 y T3) y aquellos de única dosis (P<0,07) presentando 64 y 88%, respectivamente. Por el contrario, en lo que respecta al porcentaje de eficiencia, no hubieron diferencias significativas entre los tratamientos (todos).

Respecto al número y calidad de embriones colectados y congelados,

fueron en general de muy buena calidad (grados 1 y 2 según la IETS) excepto por uno (mórula) del tratamiento T1, el cual mostró según la evaluación un grado 3 (calidad pobre). Al mismo tiempo no se determinó una interacción definida entre el estado de desarrollo de los embriones y tratamiento.

En el siguiente gráfico se muestran los resultados en términos del número de embriones colectados y congelados según el tratamiento.

Figura No. 17. Número de embriones colectados y posteriormente congelados según el tratamiento de superovulación.



Fuente: elaboración propia.

Pese a que no es posible afirmar diferencias significativas en términos estadísticos entre los distintos tratamientos, puede observarse una superioridad en la producción de embriones por parte del tratamiento T2, seguido por el T6, así como una menor eficiencia por parte del tratamiento T7.

Según los resultados obtenidos en este trabajo, se debería profundizar a nivel experimental aquellos tratamientos de dosis única de FSH dado que por un lado no existen reportes en la bibliografía para la especie ovina y por otro, implicaría hacer más práctica la implementación de un programa MOTE.

5 CONCLUSIONES

Combinando diferentes hormonas como FSH, eCG y GnRH junto con una adecuada sincronización utilizando progestágenos en un tratamiento de superovulación para la producción de embriones, se logra una respuesta efectiva. La variabilidad en la respuesta a los diferentes tratamientos de este tipo aparece como un aspecto común en la mayor parte de los estudios relacionados al tema.

Los tratamientos de superovulación más eficientes ya sea en términos de tasa ovulatoria como en el número y calidad de embriones colectados y congelados, son aquellos en los que se utiliza FSH en forma de dosis decreciente. En segundo lugar, en los que se la administra en forma de una única dosis a 24, 12h antes y simultáneo al momento de retirar los pesarios vaginales, aunque se podría sugerir posterior investigación en este tipo de tratamiento a los efectos de simplificar protocolos de programas MOTE.

En términos generales se puede afirmar que ovejas portadoras del gen Booroola se comportan como animales no prolíficos respecto a la respuesta ovulatoria.

Respecto a los embriones producidos, se puede afirmar que fueron de muy buena calidad, lográndose colectar y posteriormente congelar en forma eficiente gran proporción de los mismos y en los estados de desarrollo cronológicamente correctos.

Este trabajo utiliza la técnica de multiovulación y transferencia de embriones con la excepción de la última fase (transferencia propiamente dicha a la oveja receptora), por lo que quedará en manos de futuras investigaciones validar el grado de viabilidad y/o degeneración de embriones trasplantados (% preñez y supervivencia, entre otros aspectos) que hayan sido originados a partir de este tipo de tratamiento y su posterior criopreservación.

6 RESUMEN

El experimento se llevó a cabo en el Centro de Investigación y Experimentación "Dr. Alejandro Gallinal" (CIEDAG), en el departamento de Florida, en los años 2008, 2009 y 2010, utilizando 32 hembras de 3 años de edad promedio y 5 machos Corriedale Booroola, con una condición corporal media de 2,5 y 3, respectivamente, alimentados a base de campo natural y campo natural mejorado. Se evaluaron 8 tratamientos de superovulación para la producción de embriones (midiendo el nivel ovulatorio, y número y calidad de embriones) combinando diferentes dosis y momentos de aplicación de FSH (aplicada en forma decreciente y en una única dosis), y eCG, manteniendo constante el protocolo en términos de la duración del mismo, del método de sincronización (pesarios vaginales con 60mg de medroxiprogesterona durante 14 días, sustituyendo por nuevos el día 9), aplicación de GnRH, servicio, colecta y criopreservación de los embriones. Tres tratamientos denominados T1, T2 y T3 consistieron en administrar 156, 134,2 y 46,8mg de FSH en forma decreciente (4 dosis decrecientes aplicadas cada una de ellas, dos veces al día con un intervalo de 12h), respectivamente. Se obtuvieron diferencias significativas ($P < 0,05$) en términos de la tasa ovulatoria entre los tratamientos T1 y T2 respecto a T3, con $10,93 \pm 1,08$ y $12,45 \pm 2,57$ versus $4,98 \pm 1,23$, respectivamente. Respecto a los tratamientos de una única dosis de FSH, se realizaron cuatro, variando el momento de aplicación de la misma, sea 36, 24, 12h antes y simultáneo con el retiro de los pesarios, correspondientemente a T4, T5, T6 y T7. No se encontraron diferencias significativas entre T5, T6 y T7 en cuanto a tasa ovulatoria, obteniendo $8,88 \pm 0,99$, $6,33 \pm 1,47$ y $8,33 \pm 1,68$ cuerpos lúteos, respectivamente. El tratamiento T4 resultó ser inviable dado que solamente ovuló una oveja mostrando un sólo cuerpo lúteo, de ahí que se excluya del análisis. En lo que refiere a la colecta y criopreservación de embriones, se logró colectar y congelar buena parte de ellos (79,5% para tratamientos con dosis decrecientes y 75,5% con dosis única de FSH), lo que significa que la calidad y estados de desarrollo embrionario alcanzados cronológicamente correctos, obteniendo en general mórulas y blastocitos de calidad excelente y buena (grados 1 y 2).

Palabras clave: Booroola; Superovulación; FSH; eCG; Embriones.

7 SUMMARY

The experiment was conducted at the “Dr. Alejandro Gallinal” Centre of Experimentation and Research (CIEDAG), in the department of Florida, between 2008 and 2010. The group of animals used for the investigation consisted in 32 three year old average female sheep, and five male Corriedale Booroola, with a physical condition mean of 2,5 and 3 respectively, the animals diet was based on natural grass and natural improved pasture. Eight different treatments of superovulation were evaluated for embryo production (measuring ovulatory levels, number and quality of embryo) combining diverse doses and application timing of FSH (applied decreasingly and in a single dose) and eCG, maintaining constant the protocol in terms of its duration, the synchronization method (intravaginal progestagen pessaries containing 60 mg of medroxyprogesterone acetate during 14 days, replacing them for new ones the ninth day), application of GnRH, service, collection and cryopreservation of the embryo. Three treatments called T1, T2 and T3 consisted in the administration of 156, 134,2 y 46,8mg of FSH applied in a decreasing way (4 doses applied decreasingly, each of them twice a day, 12 hours apart), respectively. There were significant differences ($P < 0,05$) in terms of the ovulatory rate, between T1 and T2 compared to T3, with $10,93 \pm 1,08$ y $12,45 \pm 2,57$ versus $4,98 \pm 1,23$, respectively. In relation to the FSH single dose treatments, four of them were performed, varying its application timing, from 36, 24, or 12 hours before the the removal of the pessaries, and the forth simultaneously with the removal, namely T4, T5, T6, and T7. No significant differences were found between T5, T6 and T7 regarding ovulatory rate, obtaining 8.88 ± 0.99 , 6.33 ± 1.47 and 8.33 ± 1.68 corpora lutea, respectively. T4 treatment was found to be unworkable as a sheep ovulated only showing a single corpus luteum, hence its exclusion from the analysis. Regarding the collection and cryopreservation of embryo most of them were successfully frozen (79,5% for treatments with decreasing doses and 75,5% with a single FSH dose), which means that the quality and embryonic development stages reached chronologically correct, obtaining in general morulae and blastocysts with excellent and good quality (grade 1 and 2).

Key words: Booroola; Superovulation; FSH; eCG; Embryos.

8 BIBLIOGRAFIA

1. AKÉ LÓPEZ, J. R.; HEREDIA, M.; ALFARO GAMBOA, M.; CENTURIÓN CASTRO, F.; ROJAS RODRIGUEZ, O. 2003. Effect of hormone in the superovulatory response and synchrony of estrus on pregnancy rate in Pelibuey ewes. *Veterinaria México*. 34(3): 225-233.
2. ALILA, H.W.; DOWD, J.P. 1991. The control of corpus luteum function in domestic animals. *Reviews of Reproductive Biology*. 13: 203-237.
3. ARMSTRONG, D. T.; EVANS, G. 1983. Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. *Theriogenology*. 19: 31-42.
4. AZZARINI, M. 1992. Contribución de la tecnología reproductiva al mejoramiento genético de la especie ovina. In: Seminario de Producción Ovina (3º., 1992, Uruguay). Trabajos presentados. s.n.t. pp. 185-195.
5. _____. 2003. Potencial reproductivo de los ovinos. *Producción Ovina*. no. 16: 5-17.
6. BARI, F. KHALID, M.; HARESIGN, W.; MURRAY, A.; MERRELL, B. 2000. Effect of mating system, flushing procedure, progesterone dose and donor ewe age on the yield and quality of embryos within a MOET program in sheep. *Theriogenology*. 53: 727-742.
7. BARIL, G.; TRALDI, A. L.; COGNIÉ, Y.; LEBOEUF, B.; BECKERS, J. F.; MERMILLOD, P. 2001. Successful direct transfer of vitrified sheep embryos. *Theriogenology*. 56: 299-305.
8. BATT, P. A.; KILLEN, I. D.; CAMERON, A. W. N. 1993. Fertility of superovulation ewes after intrauterine or oviducal insemination with low numbers of fresh or frozen-thawed spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*. 5: 49-56.
9. BETTENCOURT, E. M.; BETTENCOURT, C. M.; CHAGAS E SILVA, J.; FERREIRA, P.; PEREIRA MATOS, C.; ROMA OA, R. J.; ROCHAD, A. 2009. Fertility rates following the transfer of ovine embryos cryopreserved using three protocols. *Small Ruminant Research*. 82: 112-116.

10. BINDON, B. M.; PIPER, L. R.; EVANS, R. 1982. Reproductive biology of de Booroola Merino. In: Piper, L. R.; Bindon, B.M.; Nehtery, R.D. eds. The Booroola Merino. Melbourne, CSIRO. pp. 21–34.
11. _____.; _____.; HILLARD, M. A. 1996. Reproductive physiology and endocrinology of prolific sheep. In: Fahmy, M. H. ed. Prolific sheep. Cambridge, CAB International. pp. 453–470.
12. BOGGIO DEVINCENZI, J. C. 2001. Vitricación y congelación convencional de embriones ovinos; comparación de ambos métodos según sobrevivencia y desarrollo embrionario in vitro. Tesis de Maestría. Valdivia, Chile. Universidad de Valdivia. 280 p.
13. BONINO, J.; SIENRA, R. 1986. Modernos procedimientos tecnológicos de la reproducción ovina. Transplante embrionario; métodos, ventajas y limitantes. Cartilla de Divulgación Técnica (SUL). 26: s.p.
14. _____.; HUGHES, P; VILLAMIL, A.; AZZARINI, M.; VALLEDOR, F. 1989. Multiovulación y transplante embrionario en ovinos. Resumen de experiencias realizadas en Uruguay. Producción Ovina. no. 1: 11-22.
15. BROADBENT, P.J.; STEWART, M.; DOLMAN, D. F. 1991. Recipient management and embryo transfer. Theriogenology. 35 (1): 125-139.
16. CAMPBELL, B. K.; BAIRD, D. T.; SOUZA, C. J.; WEBB, R. 2003. The FecB (Booroola) gene acts at the ovary; in vivo evidence. Reproduction. 1: 101-111.
17. CARDELLINO, R.; ROVIRA, J. 1987. Mejoramiento genético animal. Montevideo, Hemisferio Sur. 253 p.
18. CAVESTANY, D.; HUGHES, P.; CASH, R.; DURAN DEL CAMPO, A. 1979. Transplante de embriones en ovinos en Uruguay: relato de una experiencia realizada a campo. Jornada de Ovinos (1º, 1979, Uruguay) Trabajos presentados. s.n.t., s.p.
19. _____.; DURAN DEL CAMPO, A. 1993. Fisiología reproductiva de la oveja. In: Duran Del Campo, A. ed. Manual práctico de reproducción e inseminación artificial en ovinos. Montevideo, Hemisferio Sur. pp. 21-42.

20. COCERO, M. J.; LOPEZ SEBASTIAN, A.; BARRAGAN, M. L.; PICAZO, R. A. 1996. Differences on post-thawing survival between ovine morulae and blastocyst cryopreserved with ethylene glycol or glycerol. *Cryobiology*. 33: 502-507.
21. _____.; MORENO DÍAZ DE LA ESPINA, S.; AGUILAR, B. 2002. Ultrastructural characteristics of fresh and frozen-thawed ovine embryos using two cryoprotectants. *Biology of Reproduction*. 66: 1244-1258.
22. COGNIÉ, Y. 1999. State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology*. 51: 105-116.
23. _____.; BARIL, G; POULIN, N; MERMILLOD, P. 2003. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*. 59: 171-188.
24. CHEMINEAU, P.; CHUPIN, D.; COGNIÉ, Y; THIMONIER, J. 1991. La maîtrise de la reproduction des mammifères domestiques. In: La reproduction chez les mammifères et l'homme. Paris, INRA. s.p.
25. DAGNELIE, P. 1970. Théorie et méthodes statistiques; applications agronomiques. Paris, Gembloux Agricola Prensa. v. 2, 451 p.
26. DAVIS, G. H.; MONTGOMERY, G. W.; ALLISON, A. J.; KELLY, R. W.; BRAY, A. R. 1982. Segregation of a major gene influencing fecundity in progeny of Booroola sheep. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. 25: 525–529.
27. _____.; MCEWAN , L. C.; FANNESSY, P. F.; DODDS, K. G.; FARQUHAR, P. A. 1991. Evidence for the presence of a major gene influencing ovulation rate on the X – chromosome of sheep. *Biology of Reproduction*. 44: 620–624.
28. _____.; _____.; _____.; _____.; MCNATTY, K.P. 1992. Infertility due to bilateral ovarian hypoplasia in sheep homozygous (FecXI FecXI) for the Inverdale prolificacy gene located on the X chromosome. *Biology of Reproduction*. 46: 636–640.
29. _____.; DODDS, K. G.; WHEELER, R.; JAY, N. P. 2001. Evidence that an imprinted gene on the X chromosome increases ovulation rate in sheep. *Biology of Reproduction*. 64: 216–221.

30. _____; GALLOWAY, S. M.; ROSS, I. K.; GREGAN, S. M.; WARD, J.; NIMBKAR, B. V.; GHALSASI, P. M.; NIMBKAR, C.; GRAY, G. D.; INOUNU, I.; TIESNAMURTI, B.; MARTYNIUK, E.; EYTHORSDDOTTIR, E.; MUSLSANT, P.; LECERF, F.; HANRAHAN, J. P.; BRADFORD, G. E.; WILSON, T. 2002. DNA tests in prolific sheep from eight countries provide new evidence on origin of the Booroola (FecB) mutation. *Biology of Reproduction*. 66: 1869–1874.
31. _____. 2004. Fecundity genes in sheep. *Animal Reproduction Science*. 83: 247–253.
32. _____. 2005. Major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genetic Evolution*. 11: 11–23.
33. _____.; BALAKRISHNAN, L.; ROSS, I. K.; WILSON, T.; GALLOWAY, S. M.; LUMSDEN, B. M.; HANRAHAN, J. P.; MULLEN, M.; MAO, X. Z.; WANG, G. L.; ZHAO, Z. S.; ZENG, Y. Q.; ROBINSON, J. J.; MAVROGENIS, A. P.; PAPACHRISTOFOROU, C.; PETER, C.; BAUMUNG, R.; CAEDYN, P.; BOUJENANE, I.; COCKETT, N. E.; EYTHORSDDOTTIR, E.; ARRANZ, J. J.; NOTTER, D. R. 2006. Investigations of the Booroola (FecB) and Inverdale (FecXI) mutations in 21 prolific breed and strains of sheep sampled in 13 countries. *Animal Reproduction Science*. 92: 87-96.
34. DOBRINSKY, J. R. 1996. Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology*. 45: 17-26.
35. DRIANCOURT, M. A.; CAHILL, L. P.; BINDON, B. M. 1985. Ovarian follicular populations and preovulatory enlargement in Booroola and control Merino ewes. *Journal of Reproduction and Fertility*. 73: 93-107.
36. _____. 2000. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animal. Implications for manipulation of reproduction. s.n.t. pp. 1211-1231.
37. EPPLESTON, J.; EVANS, G.; ROBERTS, E. M. 1991. Effect of time of PMSG and GnRH on the time of ovulation, LH secretion and reproductive performance after intrauterine insemination with frozen ram semen. *Animal Reproduction Science*. 26: 227-237.

38. EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. 1990. Fisiología de la reproducción en ovejas y cabras. In: Evans, G.; Maxwell, W.M.C. eds. Inseminación artificial en ovejas y cabras. Zaragoza, Acribia. pp. 41-57.
39. EVANS, A. C. O.; FLYNN, J. D.; QUINN, K. M.; DUFFY, P.; QUINN, P.; MADGWICK, S.; CROSBY, T. F.; BOLAND, M.; BEARD, A. P. 2001. Ovulation of aged follicles does not affect embryo quality or fertility after a 14-Day progestagen estrus synchronization protocol in ewes. *Theriogenology*. 56: 923-936.
40. FABRE, S.; PIERRE, A.; MULSANT, P.; BODIN, L. ; DI PASQUALE, E. ; PERSANI, L. ; MONGET, P.; MONNIAUX, D. 2006. Regulation of ovulation rate in mammals: contribution of sheep genetic models. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 4: 20–31.
41. FERNÁNDEZ ABELLA, D. 1987. Booroola; ¿un gen milagroso? *Lana Noticias (SUL)*. 86: 34–35.
42. _____. 1991. The Booroola sheep in Uruguay. In: International Workshop on Major Genes for Reproduction in Sheep (2º., 1991, Toulouse). *Proceedings*. Paris, INRA. pp. 27-29.
43. _____. 1993. Principios de fisiología reproductiva ovina. Montevideo, Hemisferio Sur. 247 p.
44. _____. 1994. Manual de inseminación artificial por vía cervical en ovinos. Montevideo, Hemisferio Sur. 77 p.
45. _____. 1995a. Evaluación de la presencia del gen Booroola en la fecundidad de apareamiento en primavera. *Boletín Técnico de Ciencias Biológicas*. 5: 35–42.
46. _____. 1995b. Temas de reproducción ovina e inseminación artificial en bovinos y ovinos. Montevideo, Facultad de Agronomía. 206 p.
47. _____. 1996. Use of prolific sheep; South America. In: Fahmy, M. H. ed. *Prolific sheep*. Cambridge, CAB Internacional. cap. 12, pp. 407–412.
48. _____.; BARÚ, V.; LÓPEZ, O.; MAILHOS DEL REY, M.; URIOSTE, M.; VILLEGAS, N. 1998. Estudio de la duración del celo en ovejas

a campo. Producción ovina. Salto, Estación Experimental de la Facultad de Agronomía en Salto. pp. 53-62.

49. _____. 2006. Transferencia de embriones. Montevideo, Facultad de Agronomía. 10 p.
50. FOGARTY, N. M. 2009. A review of the effects of the Booroola gene (FecB) on sheep production. *Small Ruminant Research*. 85: 75-84.
51. GARCIA GARCIA, R. M.; GONZALEZ BULNES, A.; DOMINGUEZ, V.; VEIGA LOPEZ, A.; COCERO, M. J. 2005. Culture of early stage ovine embryo to blastocyst enhances survival rate after cryopreservation. *Theriogenology*. 63: 2233-2242.
52. _____.; _____.; _____.; _____.; _____. 2006. Survival of frozen-thawed sheep embryos cryopreserved at cleavage stages. *Cryobiology*. 52: 108-113.
53. GIBBONS, A.; CUETO, M. 1995. Transferencia de embriones en ovinos y caprinos. Bariloche, INTA. Area de Investigación en Producción Animal. Grupo de Reproducción y Genética. 32 p.
54. _____.; _____. 2010. Transferencia y vitrificación de embriones. In: Curso de Actualización en Producción Ovina (8º., 2010, San Carlos de Bariloche). Actualización en producción ovina. Rio Negro, Feher. pp. 79-96.
55. GIRARD, A. 1971. Le corps jaune. *Elevage Insemination*. 125:8-12.
56. GONZALEZ BULNES, A.; GARCIA GARCIA, R. M.; SANTIAGO MORENO, J.; LOPEZ SEBASTIAN, A.; COCERO, M. J. 2002. Effect of follicular status on superovulatory response in ewes influenced by presence of corpus luteum at first FSH dose. *Theriogenology*. 58: 1607-1614.
57. _____.; CARRIZOSA, J. A.; DÍAZ DELFA, C.; GARCIA GARCIA, R. M.; URRUTIA, B.; SANTIAGO MORENO, J.; COCERO, M. J.; LOPEZ SEBASTIAN, A. 2003a. Effects of ovarian follicular status on superovulatory response of dairy goats to FSH treatment. *Small Ruminant Research*. 48: 9-14.

58. _____.; GARCIA GARCIA, R. M.; CASTELLANOS, V.; SANTIAGO MORENO, J.; ARIZNAVARRETA, C.; DOMINGUEZ, V.; LOPEZ SEBASTIAN, A.; TRESGUERRES, J. A. F.; COCERO, M. J. 2003b. Influence of maternal environment on the number of transferable embryos obtained in response to superovulatory FSH treatments in ewes. *Reproduction, Nutrition and Development*. 43: 17-28.
59. _____.; BERLINGUER, F.; COCERO, M. J.; GARCIA GARCIA, R. M.; LEONI, G.; NAITANA, S.; ROSATI, I.; SUCCU, S.; VEIGA LOPEZ, A. 2005. Induction of the presence of corpus luteum during superovulatory treatments enhances in vivo and in vitro blastocysts output in sheep. *Theriogenology*. 64: 1392-1403.
60. GONG, J. G.; WEBB, R. 1996. Control of ovarian follicle development in domestic ruminants: Its manipulation to increase ovulation rate and improve reproductive performance. *Animal Breeding Abstracts*. 64 (3): 195-204.
61. GORDON, I. 1989. Control de la crianza de los animales de granja. México, D.F., Continental. 444 p.
62. _____. 2006. Tecnología de la reproducción de los animales de granja. Zaragoza, Acribia. 441 p.
63. GREEN, R. E.; SANTOS, B. F. S.; SICHERLE, C. C.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; BICUDO, S. D. 2009. Viability of OPS vitrified sheep embryos after direct transfer. *Reproduction Domestic Animal*. 44: 406-410.
64. GUAN, F.; LIU, S. R.; SHI, G. Q.; YANG, L. G. 2007. Polymorphism of FecB gene in nine sheep breeds or strains and its effects on litter size, lamb growth and development. *Animal Reproduction Science*. 99: 44-52.
65. GUIGNOT, F.; BOUTTIERA, A.; BARIL, G.; SALVETTIA, P.; PIGNONA, P.; BECKERS, J. F.; TOUZÉ, J. L.; COGNIÉ, J.; TRALDI, A. S.; COGNIÉ, Y.; MERMILLOD, P. 2006. Improved vitrification method allowing direct transfer of goat embryos. *Theriogenology*. 66: 1004-1011.
66. HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. 2002. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7ª. ed. México, Mc Graw-Hill Interamericana. 519 p.

67. ISACHENKO, V.; ALABART, J. L.; DATTENA, M.; NAWROTH, F.; CAPPAL, P.; ISACHENKO, E.; COCERO, M. J.; OLIVERA, J.; ROCHE, A.; ACCARDO, C.; KRIVOKHARCHENKO, A.; FOLCH, J. 2003. New technology for vitrification and field (microscope-free) warming and transfer of small ruminant embryos. *Theriogenology*. 59: 1209-1218.
68. JABBOUR, H. N.; EVANS, G. 1991. Ovarian and endocrine responses of Merino ewes to treatment with PMSG and/or FSH-P. *Animal Reproduction Science*. 26: 93-106.
69. JOYCE, I. M.; KHALID, M.; W. HARESING. 1998. Growth hormone priming as an adjunct treatment in superovulatory protocols in the ewe alters follicle development but has no effect on ovulate rate. *Theriogenology*. 50: 873-884.
70. KENNEDY, J. P.; WORTHINGTON, C. A.; COLE, E. R. 1974. The post-natal development the ovary and uterus of Merino lamb. *Journal of Reproduction and Fertility*. 36: 275-282.
71. LIER, E. V. 2009. *Bioteconlogías reproductivas*. Montevideo, UDELAR. 70 p. (Teórico no. 10).
72. LITTLE, T. M.; HILLS, J. 1976. *Métodos estadísticos para la investigación en la agricultura*. México, D. F., Trillas. 270 p.
73. MC KELVEY, W. A. C.; ROBINSON, J. J.; ROBERTSON, I. S. 1986. Repeated recoveries of embryos from ewes by laparoscopy. *Theriogenology*. 25: 855-865.
74. MC NATTY, K. P.; HUDSON, N. L.; GIBB, M.; BALL, K.; HENDERSON, K. M.; HEATH, D. A.; LUN, S.; KIEBOOM, L. E. 1985. FSH influences Follicle viability, oestradiol biosynthesis and ovulation rate in Romney ewes. *Journal of Reproduction and Fertility*. 75: 121-131.
75. _____; JUN, S.; HEATH, D. A.; BALL, K.; SMITH, P.; HUDSON, N. L.; MCDIARMID, J.; GIBB, M.; HENDERSON, K. M. 1986. Differences in ovarian activity between Booroola x Merino ewes which were homozygous, heterozygous and non – carrier of a major gene influencing their ovulation rate. *Journal of Reproduction and Fertility*. 77: 193-205.

76. MARTÍNEZ, L. M. 2001. La criopreservación embrionaria en la especie equina. *Medicina Veterinaria*. 18(9): 527-546.
77. MARTÍNEZ, A. G.; VALCÁRCEL, A.; FURNUS, C. C.; DE MATOS, D. G.; IORIO, G.; DE LAS HERAS, M. A. 2006. Cryopreservation of in vitro-produced ovine embryos. *Small Ruminant Research*. 63: 288-296.
78. MAZUR, P. 1977. The role of intracellular freezing in the death of cells at supraoptimal rates. *Cryobiology*. 14(3): 251-272
79. MENCHACA, A.; VILARIÑO, M.; PINCZAK, A.; KMAID, S.; SALDAÑA, J. M. 2009. Progesterone treatment, FSH plus eCG, GnRH administration, and Day 0 Protocol for MOET programs in sheep. *Theriogenology*. 72: 477-483.
80. _____.; _____.; CRISPO, M.; DE CASTRO, T.; RUBIANES, E. 2010. New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*. 22: 113-118.
81. MONTGOMERY, G. W.; CRAWFORD, A. M.; PENTY, J. M.; DODDS, K. G.; EDE, A. J.; HERNRY, H. M.; PIERSON, C. A.; LORD, E. A.; GALLOWAY, S. M.; SCHMACK, A. E.; SISE, J. A.; SWARBRICK, P. A.; HANRAHAN, V.; BUCHANAN, F. C.; HILL, D. F. 1993. The ovine Booroola fecundity gene (FecB) is linked to markers from a region of human chromosome 4q. *National Genetic*. 4: 410-414.
82. _____.; PENTY, J. M.; LORD, E. A.; HENRY, H. M. CAMBRIDGE, L. M.; BROAD, T. E. 1994. Mapping production traits in farm animals: the Booroola (FecB) locus. *In: World Congress on Genetics Applied to Livestock Production (5th, 1994, August, Canadá). Proceedings. Guelph, s.e. pp. 17-20.*
83. _____.; GALLOWAY, S. M.; DAVIS, G. H.; MCNATTY, K. P. 2001. Genes controlling ovulation rate in sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*. 121: 843-852.
84. MOORE, N.W. 1982. Egg transfer in the sheep and goat; Preparation of recipients. *In: Adams, C.E. ed. Mammalian egg transfer. Florida, CRC. pp.126-127.*

85. MULSANT, P.; LECERF, F.; FABRE, S.; SCHIBLER, L.; MONGET, P.; LANNELUC, I.; PISSELET, C.; RIQUET, J.; MONNIAUX, D.; CALLEBAUT, I.; CRIBIU, E.; THIMONIER, J.; TEYSSIER, J.; BODIN, L.; COGNIE, Y.; CHITOUR, N.; ELSEN, J. M. 2001. Mutation in the bone morphogenetic protein receptor-1B is associated with increased ovulation rate in Booroola ewes. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98: 5104–5109.
86. O'CALLAGHAN, D.; YAAKUB, H.; HYTTEL, P.; SPICER, L. J.; BOLAND, M. P. 2000. Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone concentrations in ewes. *Journal of Reproduction and Fertility*. 118: 303-313.
87. PAPADOPOULOS, S.; RIZOS, D.; DUFFY, P.; WADE, M.; QUINN, K.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. 2002. Embryo survival and recipient pregnancy rates after transfer of fresh or vitrified, in vivo or in vitro produced ovine blastocysts. *Animal Reproduction Science*. 74: 35-44.
88. PARSONS, S.; HUNTER, G.; RAYNER, A. 1967. Use of probit analysis in a study of the effect of the ram on time of ovulation in the ewe. *Journal of Reproduction and Fertility*. 14: 71-80.
89. PHILIP, G. 2003. Factores correguladores del crecimiento y diferenciación folicular independiente de gonadotropinas. (en línea). Montevideo. s.n.t. Consultado 3 mar. 2009. Disponible en <http://www.portalveterinaria.com/modules>
90. PIPER, L. R.; BINDON, B. M. 1982. The Booroola Merino and the performance of medium non-Peppin crosses at Armidale. *In: Workshop The Booroola Merino (1980, Armidale, NSW). Proceedings*. Melbourne, Australia, CSIRO. pp. 9–19.
91. _____.; _____.; DAVIS, G. H. 1985. The single gene inheritance of the prolificacy of the Booroola Merino. *In: Land, R. B.; Robinson, D. W. eds. Genetics of reproduction in sheep*. London, Butterworths. pp. 115–125.
92. _____.; _____. 1988. The genetics and endocrinology of the Booroola sheep F gene. *In: International Conference of*

Quantitative Genetics (2^o, 1988, s.l.). Proceedings. s.n.t. pp. 270-280.

93. _____.; _____. 1996. The Booroola Merino. In: Fahmy, M.H. ed. Prolific sheep. Oxford, CAB International. pp. 152–160.
94. RAMÓN UGALDE, J. P. s.f. Inseminación artificial y transferencia de embriones como herramientas biotecnológicas aplicadas a los ovinos de pelo. Yucatán, México, CeSyRO. s.p.
95. REXROAD, C. E.; POWELL, A. M. 1991. FSH injections and intrauterine insemination in protocols for superovulation of ewes. *Journal of Animal Science*. 69: 246-251.
96. RUBIANES, E.; UNGERFELD, R.; MENCHACA, A. 2002. Sincronización de celos en ovinos; bases fisiológicas y distintas técnicas de manejo hormonal. In: Congreso Latinoamericano de Buiatría (10^o), Jornadas Uruguayas de Buiatría (30as., 2002, Paysandú). Memorias. Paysandú, CMVP. pp. 117-122.
97. _____.; MENCHACA, A. 2003. The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats. *Animal Reproduction Science*. 78: 271-287.
98. SCARAMUZZI, R.; TURNBULL, K. 1980. Studies on the populations of Graafian follicles growth and development of the membrane granulose in relation to the number of ovulations. *Proceeding of the Australian Society of Reproductive Biology*. 12: 24.
99. SCHIEWE, M. C.; RALL, W. F.; STUART, L. D.; WILDT, D. E. 1991. Analysis of cryoprotectant, cooling rate and in situ dilution using conventional freezing or vitrification for cryopreserving sheep embryos. *Theriogenology*. 36: 279-293.
100. SCHNEIDER, U.; MAZUR, P. 1984. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. *Theriogenology*. 21(1): 68-79.
101. SENGER, P. L. 2003. Pathways to pregnancy and parturition. 2th. ed. Washington, D. C., Current Conceptions. 368 p.

102. SOUZA, C. J. H.; MORAES, J. C. F.; CHAGAS, L. M. 1994. Effect of the Booroola gene in time of ovulation and ovulatory dynamics. *Animal Reproduction Science*. 37: 7-13.
103. _____.; CAMPBELL, B. K.; WEBB, R.; BAIRD, D. T. 1997. Secretion of Inhibin A and follicular dynamic throughout the estrous cycle in the sheep with and without the Booroola gene (FecB). *Endocrinology*. 138: 5333-5340.
104. _____.; MACDOUGALL, C.; CAMPBELL, B. K.; MacNEILLY, A. S.; BAIRD, D. T. 2001. The Booroola (FecB) is associated with a mutation in the bone morphogenetic protein receptor type 1b (BMPR1B) gene. *Journal Endocrinology*. 169: R1–R6.
105. _____.; CAMPBELL, B. K.; MCNEILLY, A. S.; BAIRD, D. T. 2003. Bone morphogenetic proteins and folliculogenesis; lessons from the Booroola mutation. *Journal of Endocrinology*. 61: 361-370.
106. _____.; GONZÁLEZ BULNES, A.; CAMPBELL, B. K.; MCNEILLY, A. S.; BAIRD, D. T. 2004. Mechanisms of action of the principal prolific genes and their application to Sheep Production. *Reproduction, Fertility and Development*. 4: 395-401.
107. STAPLES, L.D.; WHYLIE, P.A. 1984. Contribution of the utero-ovarian lymphatic network to the control of corpus luteum function in the ewe. *In*: Lindsay, D. R.; Pearce, D. T. eds. *Reproduction in sheep*. Cambridge, University Press. pp.122-124.
108. TERVIT, H. R.; THOMPSON, J. G.; MC MILLAN, W. H.; AMYES, N. C. 1991. Repeated surgical embryo recovery from Texel donor ewes. *Theriogenology*. 35: 282.
109. TURNER, H. N. 1982. Origin of the CSIRO Booroola. *In*: Piper, L. R.; Bindon, B. M.; Nethery, R. D. eds. *Booroola Merino*. Melbourne, CSIRO. pp. 1-8.
110. URIBE, L.F.; OBA, E.; SOUZA, M. 2008. Población folicular y concentraciones plasmáticas de progesterona (P4) en ovejas sometidas a diferentes protocolos de sincronización. *Archivo Medico Veterinario*. 40: 83-88.

111. URUGUAY. MINISTERIO DE GANADERÍA, AGRICULTURA Y PESCA. DIRECCIÓN GENERAL DE SERVICIOS GENERALES. DICOSE. 2009. Declaración jurada de DICOSE; datos generales y de lechería. Total General. (en línea). Montevideo. s.n.t. Consultado 17 ago. 2010. Disponible en http://www.mgap.gub.uy/DGSG/DICOSE/Informe2009/DJ_TotalNacional2009.pdf
112. WALLING, G. A.; DODDS, K. G.; GALLOWAY, S. M.; BEATTIE, A. E.; LORD, E. A.; LUMSDEN, J. M.; MONTGOMERY, G. W.; MCEWEN, J. C. 2000. The consequences of carrying the Booroola fecundity (FecB) gene on sheep live weight. *Proceedings of British Society of Animal Science*. 43: 83-99.
113. WILSON, T.; WU, X.; JUENGEL, J.; ROSS, I. K.; LUMSDEN, J. M.; LORD, E. A.; DODDS, K. G.; WALLING, G. A.; MCEWAN, J. C.; O'CONNELL, A. R.; MCNATTY, K. P.; MONTGOMERY, G. W. 2001. Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein IB receptor (ALK – 6) that is expressed in both oocytes and granulosa cells. *Biology of Reproduction*. 64: 1225 – 1235.
114. WOLFF, M.; GIBBONS, A.; CUETO, M.; WILLEMS, P.; ARRIGO, J. 1994. Result of artificial insemination with frozen semen in Australian Merino ewes multiovulated with FSHp. *In: World Merino Conference (4º, 1994, Montevideo, Uruguay). Producing Merinos to meet market demands*. Montevideo, s. e. 269 p.
115. ZUH, S. E.; ZENG, S. M.; YU, W. L.; LI, S. J.; ZHANG, Z. C.; CHEN, Y. F. 2001. Vitrification of in vivo and in vitro produced ovine blastocysts. *Animal Biotechnology*. 12 (2): 193-203.