



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Postgrados**

**SUPLEMENTACIÓN PROTEICA FOCALIZADA PREVIO A  
SERVICIOS DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL A TIEMPO FIJO EN  
OVINOS SINCRONIZADOS CON PROSTAGLANDINAS**

**JOSÉ NICOLÁS ERRANDONEA LÓPEZ**

**TESIS DE MAESTRIA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL**

**URUGUAY**

**2018**





**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**SUPLEMENTACIÓN PROTEICA FOCALIZADA PREVIO A  
SERVICIOS DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL A TIEMPO FIJO EN  
OVINOS SINCRONIZADOS CON PROSTAGLANDINAS**

**JOSÉ NICOLÁS ERRANDONEA LÓPEZ**

---

**Julio Olivera, DMV. PhD.**

**Director de Tesis**

---

**Georget Banchemo, DVM. PhD.**

**Co-director**

**2018**

# **INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS**

# **ACTA DE DEFENSA DE TESIS**

## **INFORME DEL TRIBUNAL**

## **AGRADECIMIENTOS**

Este proceso de formación fue largo y dificultoso, pero muy gratificante al momento de valorar la formación lograda. Muchas son las personas que me ayudaron en el camino y a todas ellas les doy mi gratitud:

A mis padres por darme la posibilidad de formarme, guiarme y apoyarme desde siempre.

A Karina, mi querida esposa, por bancarme todo este tiempo de forma incondicional y motivarme en los momentos complicados.

A mi hijo que es la principal inspiración para todo en la vida.

A mi abuelo Pepe quien posibilitó mis estudios y me apoyó en todo siempre.

A mi director de tesis, tutor y amigo, Julio, a quien le tengo un agradecimiento especial ya que, de no ser por su dirección, motivación y ayuda en todo momento mucho más allá de su función, este logro no hubiera sido posible.

A la Dra. Georgget Banchemo por la co-dirección del trabajo y poder contar con ella siempre que fue necesario.

A la Dra. Carolina Viñoles, el Dr. Sergio Fierro, Dr. Jorge Gil e Ing. Martin Claramunt por la colaboración en la realización del trabajo.

A las compañeras en el trabajo de campo Dra. Paula Ortiz y Dra. Eloísa Osorio.

A el Tec. Agr. Martin Hitateguy por colaborar en los trabajos de campo con una disposición y responsabilidad admirable.

A mis primeros mentores en los estudios de posgrado Dra. Cecilia Cajarville y Dr. José Luis Repetto por orientarme en este camino.

A mis amigos Yamila Filonenco, Germán Calvo y Mauro Minteguiaga por su ayuda invaluable en diferentes momentos de este proceso.

Al Sr. Luis Albarenga por su colaboración en el trabajo de campo.

A mis hermanos que me permitieron realizar el trabajo en el predio familiar.

Debo agradecer también al Programa de Posgrados de Facultad de Veterinaria por darme esta oportunidad de formación.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

|                                                                                                    |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>INTRODUCCIÓN.....</b>                                                                           | <b>1</b>  |
| <b>Desarrollo folicular durante el ciclo estral en la oveja .....</b>                              | <b>2</b>  |
| <b>Estrategias para incrementar la TO y la prolificidad: alimentación focalizada .....</b>         | <b>3</b>  |
| <b>Mecanismo de acción de la alimentación focalizada .....</b>                                     | <b>5</b>  |
| <b>Protocolos de inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) en ovinos .....</b>                  | <b>7</b>  |
| <b>Protocolos en base al uso de progestágenos y gonadotrofinas .....</b>                           | <b>7</b>  |
| <b>Protocolos de IATF en base al uso de prostaglandina .....</b>                                   | <b>8</b>  |
| <b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>                                     | <b>10</b> |
| <b>ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN .....</b>                                                           | <b>12</b> |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>                                                                   | <b>12</b> |
| <b>Animales y manejo sanitario .....</b>                                                           | <b>12</b> |
| <b>Diseño experimental.....</b>                                                                    | <b>12</b> |
| <b>Protocolos de sincronización estral.....</b>                                                    | <b>13</b> |
| <b>Manejo nutricional. Evaluación de consumo y composición.....</b>                                | <b>14</b> |
| <b>Colecta, evaluación y dilución del semen. Inseminación artificial. Servicio de repaso .....</b> | <b>15</b> |
| <b>Respuesta estral y ovárica, no retorno al estro y evaluaciones de fertilidad .....</b>          | <b>15</b> |
| <b>Análisis estadístico.....</b>                                                                   | <b>16</b> |
| <b>Valoración económica .....</b>                                                                  | <b>16</b> |
| <b>RESULTADOS.....</b>                                                                             | <b>17</b> |
| <b>Respuesta estral, ovárica y reproductiva .....</b>                                              | <b>17</b> |
| <b>Respuesta reproductiva final.....</b>                                                           | <b>18</b> |
| <b>Valoración económica .....</b>                                                                  | <b>19</b> |
| <b>DISCUSIÓN.....</b>                                                                              | <b>23</b> |
| <b>CONCLUSIONES .....</b>                                                                          | <b>26</b> |
| <b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                                                            | <b>27</b> |
| <b>ANEXOS .....</b>                                                                                | <b>34</b> |

### **Publicación I**

**“Short term protein supplementation during a long interval prostaglandin-based protocol for timed AI in sheep”. Errandonea et al. 2018. *Theriogenology* 114. 34-39**

## LISTA DE FIGURAS

| <b>Figura</b> | <b>Contenido</b>                       | <b>Página</b> |
|---------------|----------------------------------------|---------------|
| <b>I</b>      | <b>Diseño experimental del trabajo</b> | <b>13</b>     |

## LISTA DE TABLAS

| <b>Tabla</b> | <b>Contenido</b>                                                                                                                                                                                                                                                                    | <b>Página</b> |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>I</b>     | <b>Respuesta reproductiva observada en ovejas multíparas Merino Australiano en estro espontáneo pre-sincronizado o inducido con PG, con o sin suplementación con harina de soja previo al servicio de inseminación artificial (IA) cervical utilizando semen fresco</b>             | <b>17</b>     |
| <b>II</b>    | <b>Respuesta reproductiva final observada (Inseminación Artificial -IA- + servicio de repaso con carneros) en ovejas multíparas Merino Australiano en estro espontáneo pre-sincronizado o inducido con PG, con o sin suplementación con harina de soja previo al servicio de IA</b> | <b>18</b>     |
| <b>III</b>   | <b>Análisis económico comparativo al primer servicio (IA) de alternativas ensayadas</b>                                                                                                                                                                                             | <b>20</b>     |

## RESUMEN

El objetivo de esta tesis fue la comparación, en términos reproductivos y económicos, de ovejas que recibieron una suplementación focalizada previo al servicio de IATF utilizando un protocolo de sincronización basado en prostaglandinas (PG), con ovejas servidas en estro espontáneo pre-sincronizado detectado. La hipótesis de trabajo fue que la suplementación focalizada genera una respuesta mayor en TO, prolificidad y fecundidad en ovejas con estro inducido por PG, que la observada en ovejas en estro espontáneo. Se utilizaron 437 ovejas multíparas Merino Australiano en estación reproductiva, mantenidas en condiciones pastoriles (oferta de forraje de 6 kg de materia seca/100 kg de peso vivo; proteína cruda: 10,8%, energía metabólica: 2,1 Mcal/kg de materia seca). Las ovejas fueron asignadas a un diseño factorial 2 x 2, tipo de estro: espontáneo (EE) o sincronizado con PG (PG15), con o sin suplementación focalizada previo al servicio (+SF; harina de soja desde el Día -10 a -3; proteína cruda: 51,9%, energía metabólica: 2,8 Mcal/kg de materia seca; consumo promedio 0,9% del peso vivo/oveja/día materia seca). Todas las ovejas recibieron IA cervical con semen pool de cinco carneros Merino Dohne (Día -2 a -3 en ovejas en estro espontáneo; Día 0= IATF en ovejas con estro sincronizado con PG), y servicio de repaso con carneros a campo desde el Día 11 al 23. La TO, el no retorno al servicio al Día 23 (NRR23), la concepción, fertilidad y fecundidad fueron mayores en ovejas del grupo EE en comparación con el grupo PG15 ( $P<0,05$ ). Sin embargo, no se observaron diferencias en prolificidad entre estos grupos ( $P>0,05$ ). La suplementación focalizada incrementó la TO, prolificidad y fecundidad, pero no NRR23, la concepción o fertilidad en ovejas del grupo EE+SF. La suplementación ofrecida a ovejas del grupo PG15+SF incremento la TO, la prolificidad y fecundidad a niveles comparables con ovejas del grupo EE+SF ( $P>0,05$ ). La magnitud de la respuesta en TO fue mayor en ovejas del grupo PG15+SF que en las del grupo EE+SF ( $P<0,05$ ). Sin embargo, NRR23, la concepción y la fertilidad permanecieron similares en ovejas de los grupos de PG15 y PG15+SF ( $P<0,05$ ). El servicio de repaso con carneros igualo la fertilidad final entre todos los grupos, manteniéndose las diferencias de prolificidad y fecundidad generadas por la suplementación dentro de cada tipo de estro ( $P<0,05$ ), pero igualando la fecundidad entre tipos de estros ( $P>0,05$ ). El uso de una suplementación proteica focalizada en ovejas del grupo PG15+SF generó costos por cordero a ecografía inferiores a los de ovejas del grupo EE+SF (17% menos). Se concluye que: a) una suplementación proteica focalizada previo a un servicio de IATF en ovejas sincronizadas con PG incremento los indicadores reproductivos equiparando a ovejas en estro espontáneo, sin aumentar los costos por cordero producido; b) la fertilidad y fecundidad son mayores cuando se emplean ovejas en estro espontáneo, pero tiende a equipararse luego de dos servicios; c) un manejo reproductivo de servicio de IATF y seis días de repaso con carneros (19 días totales) alcanzó valores de fertilidad similares a los de servicios extendidos (38 días).

## SUMMARY

The objective of this thesis was to compare ewes that either received a focused supplementation prior to the IATF service using a synchronization protocol based on prostaglandins (PG), or ewes served after a spontaneous presynchronized detected estrus. The hypothesis was that the focused supplementation will generate a greater response in ovulation rate (TO), prolificacy and fecundity in PG oestrus induced ewes compared to that observed in ewes under spontaneous estrus. A total of 437 Australian Merino multiparous ewes in breeding season were used, maintained under pastoral conditions (forage allowance of 6 kg dry matter/100 kg live weight, 10.8% of crude protein and 2.1 Mcal of metabolizable energy per kg dry matter). The ewes were assigned to a 2 x 2 factorial design, type of estrus: spontaneous (EE) or induced with PG (PG15), with or without pre-service focused supplementation (+ SF; soybean meal (crude protein: 51.9%, metabolizable energy: 2.8 Mcal/kg of dry matter, average consumption 0.9% of live weight/sheep/day) from Day -10 to -3. All the ewes were cervical AI with a semen pool from five Dohne Merino rams (Day -2 to -3 in spontaneous estrus ewes; Day 0 = IATF in ewes with PG induced estrus), and direct mounting in case of a second service (Day 11 to 23). The TO, no return to service at Day 23 (NRR23), conception, fertility and fecundity were higher in sheep of the EE group compared to the PG15 group ( $P < 0.05$ ). However, no differences in prolificacy between these groups were observed ( $P > 0.05$ ). Focused supplementation increased TO, prolificacy and fecundity, but not NRR23, conception or fertility in ewes of group EE + SF. Supplementation increased TO, prolificacy and fecundity of PG15 + SF group at comparable levels with ewes from group EE + SF ( $P > 0.05$ ). The magnitude of the TO response was higher in PG15 + SF ewes compared to EE + SF ewes ( $P < 0.05$ ). However, NRR23, conception and fertility remained similar in ewes of PG15 and PG15 + SF groups ( $P < 0.05$ ). The second service with rams equalized the final fertility among all the groups, maintaining the differences of prolificacy and fecundity generated by supplementation within each type of estrus ( $P < 0.05$ ), but equalizing the fertility between types of estrus ( $P > 0.05$ ). The use of a protein-based supplementation in PG15 + SF ewes generated costs per ultrasound fetus-lamb lower than that of EE + SF ewes (17% less). It is concluded that: a) a focused protein-supplementation prior to an IATF service in sheep synchronized with PG increased reproductive indicators by matching sheep in spontaneous estrus, without increasing costs per lamb produced; b) Fertility and fecundity are greater when ewes are used in spontaneous estrus, but tend to be equal after two services; c) a reproductive management service of IATF and six days of direct mounting with rams (19 total days) reached fertility values similar to those of extended services (38 days).

## INTRODUCCIÓN

Los indicadores reproductivos globales de nuestro país en las últimas décadas muestran que cada oveja encarnerada desteta en promedio 0,72 corderos al año, fruto de parir entorno al 90% de ellas 1,1 corderos y perder hasta el destete entre un 15 y un 30% de los mismos (en base a DICOSE). Esto posibilita visualizar los momentos donde el potencial de la especie permitiría generar grandes impactos: incremento del número de corderos nacidos por incremento de la prolificidad de las ovejas, y mejora de la supervivencia de ellos. La prolificidad, asociada a la tasa ovulatoria (TO) es el mayor determinante del desempeño reproductivo de las ovejas, y el componente que ofrece las mayores posibilidades de mejora, ya que fertilidad y supervivencia no pueden ser superiores a uno (Azzarini, 1992). Con el principal objetivo de incrementar el procreo de nuestras majadas, y adoptando manejos tendientes a mejorar la supervivencia de los corderos, es imperioso intentar incrementar el número de ovejas melliceras a parir, aunque la supervivencia de los corderos nacidos como mellizos sea en promedio un 20% inferior a los de parto simple (Azzarini, 2000).

El uso de cruzamientos con biotipos prolíficos es una alternativa comprobada en nuestro país para aumentar la tasa mellicera y por ende el número de corderos nacidos (Banchero et al. 2006; Bianchi et al. 2013; Ciappesoni et al. 2014). Sin embargo, no parece una propuesta fácil de viabilizar en muchos de nuestros predios debido a los requerimientos que estos biotipos tienen para expresar su potencial (Banchero et al. 2006), la dificultad de generar los mismos, y la importancia económica relativa de la lana de calidad en estos sistemas. Descartada esta opción, y dadas las condiciones extensivas donde se desarrollan la mayoría de nuestros sistemas ovinos (base pastoril, bajo porcentaje de recursos forrajeros de calidad, infraestructura limitante, escasez de recursos humanos; DIEA, 2014), sería favorable para seguir avanzando en la mejora del procreo, seleccionar aquellas medidas tecnológicas con posibilidades de aplicabilidad inmediata.

Se destacan en este sentido estrategias que contemplan los efectos de la suplementación de ovinos sobre campo natural y su impacto reproductivo, como ser el “flushing” tradicional de varias semanas de duración (con mejora del peso vivo -PV-; Stewart & Oldham, 1986), o la suplementación de “corta duración o focalizada”, en determinados momentos del ciclo productivo (Martin et al. 2004). Éste último efecto es posible de alcanzar con períodos cortos de alimentación de buena calidad (4 a 6 días), si se hace coincidir con un estatus de desarrollo folicular adecuado previo al servicio (Stewart & Oldham, 1986; Viñoles et al. 2005). Por ello, y para que estas estrategias se puedan desarrollar en forma eficiente y sean económicamente viables, los servicios deberían estar lo más concentrados posible en el tiempo. La sincronización de estros permitiría generar esa fuerte concentración de eventos, evitando además la pérdida de estatus sanitario que conlleva el prolongado manejo de un servicio de inseminación artificial (IA) no sincronizado a estro detectado (Menchaca & Rubianes, 2004).

## ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

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

Desde el punto de vista funcional los folículos ováricos pueden ser clasificados en primordiales, comprometidos a crecer, sensibles a gonadotrofina, dependientes de gonadotrofina y ovulatorios (Scaramuzzi et al. 1993). Luego que la oveja alcanzó la pubertad, la transformación de un folículo primordial en ovulatorio puede llevar hasta 6 meses (Cahill, 1981). Cuando un folículo ha entrado en su fase de crecimiento tiene dos alternativas, ovular o degenerar (atresia). Más de 99% de los folículos ováricos sufren atresia (Hsueh et al. 1994). Los folículos sensibles a gonadotrofina se desarrollan respetando un orden jerárquico, encontrándose estos en diferente estado de desarrollo, los más avanzados de esos folículos emergen en respuesta al incremento de hormona folículo estimulante (FSH) para formar lo que se denomina la cohorte de folículos dependientes de gonadotrofina.

Los folículos sensibles a gonadotrofina crecen y regresan en un patrón regular secuencial, las ondas de crecimiento folicular (Scaramuzzi et al. 2011). Se reportan entre dos y cuatro ondas por ciclo estral en la oveja (Viñoles, 2003; Menchaca & Rubianes, 2004). Cada onda de crecimiento folicular es precedida por un aumento en la concentración de FSH (Souza et al. 1998). El nivel de FSH estimula un grupo de folículos sensibles a gonadotrofina para ser transformados en folículos dependientes de gonadotrofina (Viñoles et al. 1999). Dichos folículos creciendo secretan inhibina, la cual promueve una reducción en la concentración de FSH (Souza et al. 1998). La caída en la concentración de FSH limita el número de folículos que eventualmente ovularán (Baird, 1983). Uno o varios folículos desarrollan receptores de hormona luteinizante (LH) en las células de la granulosa y se hacen independientes de FSH. Este cambio a dependencia de LH provee al folículo seleccionado con la capacidad de sobrevivir y continuar creciendo con bajas concentraciones de FSH (McNeilly et al. 1991). La habilidad del folículo a responder a la variación en el soporte de gonadotrofina es el mecanismo central de selección folicular (Campbell et al. 1999). De esta forma la LH pasa a ser determinante para que, de varios folículos de una onda de crecimiento, se seleccione uno (denominado “dominante”) con la capacidad de crecer en un ambiente con bajas concentraciones de FSH (Ginther, 2000). Dicho folículo dominante sintetiza estradiol, que a través de la retroalimentación negativa disminuye el nivel de FSH impidiendo el reclutamiento de otros folículos en la misma onda, limitando así la cuota ovulatoria (Baird, 1983).

La oveja es capaz de desarrollar más de un folículo dominante, fenómeno denominado co-dominancia, lo que permite ovulaciones múltiples. Las ovulaciones múltiples pueden ocurrir por el reclutamiento de un mayor número de folículos dentro de una misma onda, o por la ovulación de folículos dominantes de dos ondas consecutivas (Scaramuzzi et al. 1993). La condición corporal (CC) afecta el número de ondas que se desarrollan durante el ciclo. Ovejas de buena CC ( $>3$ , escala 1 a 5; Russel et al. 1969) desarrollan un patrón constante de 3 ondas, mientras que ovejas de baja CC desarrollan 2 o 3 ondas (Viñoles et al. 2002). En

ovejas con un patrón de desarrollo folicular de 3 ondas se incrementa la velocidad de recambio folicular. Dado que ovejas en buena CC alcanzan una TO más alta que las de baja CC (Downing & Scaramuzzi, 1991), se plantea la asociación positiva entre el número de ondas foliculares y la TO. Al poseer un número variable de ondas de crecimiento folicular durante el ciclo estral, la emergencia de la onda ovulatoria ocurre también en forma variable entre los días 9 y 14 (Día 0= día de la ovulación; Viñoles et al. 2010a). Esto imposibilitaría el conocimiento de la fase de crecimiento folicular al momento de aplicar tratamientos nutricionales o de sincronización de estros.

### **Estrategias para incrementar la TO y la prolificidad: alimentación focalizada**

El número potencial de corderos que nacerán por oveja está determinado por la TO, siendo esta equivalente al número de ovocitos ovulados en cada ciclo estral (Banchero & Quintans, 2005). Es posible medir esta variable a través de la evaluación ecográfica del número de cuerpos lúteos visibles (Viñoles et al. 2010b). Uno de los factores que tienen más impacto en la TO de los ovinos es la nutrición (Lindsay et al. 1993). Es indiscutido que la nutrición estimula la foliculogénesis en rumiantes. Evidencia disponible sugiere que la nutrición incrementa el número de folículos sensibles a gonadotrofina de pequeño y mediano tamaño, y reduce la atresia de los grandes folículos dependientes de gonadotrofina, sin cambios en la concentración de FSH circulante, sugiriendo un incremento del número de folículos ovulatorios a través del incremento del tamaño de la cohorte de folículos sensibles a gonadotrofina (Scaramuzzi et al. 2011).

El efecto de la nutrición sobre la foliculogénesis ha sido categorizado de tres formas dependiendo de si se asocian o no con cambios en el PV y CC de los animales. Dicha categorización incluye los llamados “efecto estático”, “efecto dinámico” y “efecto inmediato”. El término “efecto estático” de la nutrición se refiere a que ovejas con mayor PV, en buena CC y que la mantienen constante, presentan mayor TO respecto a ovejas en baja CC (Downing & Scaramuzzi, 1991). Trabajando con animales de biotipo similar, se han reportado aumentos de 1,1 a 1,7% por cada kg de PV extra al servicio de encarnera (Kelly & Croker, 1990; Ganzabal et al. 2003). Con el término efecto estático nos estamos refiriendo al PV del animal al momento de la encarnera. Dada la importancia de este efecto, se ha demostrada la existencia de un PV crítico, siendo este el PV mínimo por debajo del cual la oveja no se reproduce con eficiencia. Ha sido determinado el PV crítico para diferentes razas ovinas, para Corriedale y Romney sería 42 a 43 kg, y para Merino 37 kg. El PV de la oveja no solo influye sobre la cantidad de ovejas gestantes sino también sobre la carga fetal (Azzarini & Ponzoni, 1971).

El término “efecto dinámico” se refiere al incremento en la TO debido al incremento de PV y CC durante cortos períodos (ejemplo tres a cuatro semanas) antes del apareamiento (Smith & Stewart, 1990). A este efecto también se lo denomina tradicionalmente como “flushing” nutricional. La respuesta se puede lograr con tan solo 20 días de buena alimentación previo a la encarnera dependiendo de la calidad de la comida. Se han

evidenciado incrementos en la TO de 1,17 a 1,74 en ovejas consumiendo diferentes niveles de oferta forrajera de lotus *Maku* (Fernández Abella et al. 2005). Se recomienda en la práctica mejorar la alimentación durante al menos las dos semanas previas y posteriores al inicio del servicio, por lo tanto, no se adecuaría a un servicio sincronizado de IA.

Sin embargo, se pueden obtener aumentos significativos en TO sin variaciones de PV o CC. Este efecto se ha denominado efecto “inmediato del nutriente” o “alimentación focalizada”. Se refiere al observado con una suplementación de tan solo 4 a 6 días con grano de lupino (un suplemento alto en energía y proteína), incrementando la TO sin cambios en el PV o en la CC (Stewart & Oldham, 1986; Downing et al. 1995a; Viñoles, 2003).

Se sabe que el efecto inmediato de la nutrición requiere del uso de suplementos con buenos aportes de energía y/o proteína, aunque aún hoy no es del todo claro cuál de estos factores nutricionales explica mejor la respuesta alcanzada o si es necesaria la sinergia de ambos (Scaramuzzi et al. 2010; Dupont et al. 2014). Para ello se han empleado, en ovejas pastoreando campo natural, concentrados energético-proteicos como lo es el grano de lupino (*Lupinus angustifolius*; Oldham & Lindsay, 1984; Stewarth & Oldham, 1986; Teleni et al. 1989; Pearce et al. 1994). Se ha logrado similar efecto sobre la TO de ovejas pastoreando sobre campo natural cuando les fue suministrado una mezcla de grano de maíz y harina de soja (relación 80/20, suplemento con alto nivel de energía; Viñoles et al. 2009). También con la administración oral durante cuatro días de una solución glucogénica (70% glicerol y 20% 1,2-propanediol) se ha logrado incrementar 46% la TO (Letelier et al. 2008). El resultado obtenido en estos estudios se debería a una rápida disponibilidad de nutrientes energéticos (Teleni et al. 1989).

Sin embargo, trabajos realizados en ovinos pastoreando campo natural utilizando suplementos proteicos como expeller de girasol, bloques proteicos comerciales logran también aumentos significativos en la TO. La mejor respuesta se obtuvo cuando la proteína ofrecida en el suplemento era más elevada que el nivel de proteína que las ovejas estaban consumiendo para mantenimiento de su CC. En estos trabajos, los mejores resultados se alcanzaron cuando el animal consumió alrededor de 100 a 110 gramos de proteína cruda diarios por encima de la proteína aportada por el campo natural, haciendo énfasis los autores que la energía de la dieta no debe ser limitante (Banchero et al. 2006).

Los resultados obtenidos mediante la suplementación con lupino podrían deberse a la baja degradación ruminal de la proteína del grano. En este sentido, se han realizado estudios utilizando harina de soja sola (concentrado proteico) como suplemento del campo natural o protegiéndola de la degradación ruminal mediante el agregado de taninos condensados (Banchero et al. 2012), obteniéndose incrementos de 15 y 28 % en la TO respectivamente. Algunos autores sostienen que la limitante para aumentar la TO es el nivel de proteína hasta que se alcanzan los 125 gr/animal/día de proteína digestible, y posteriormente la energía digestible pasa a ser el factor limitante. A un mismo nivel de proteína, existiría un incremento lineal en la TO a medida que la energía aumenta (Smith, 1985). En este sentido se ha

observado una mejor respuesta en crecimiento folicular a la suplementación focalizada cuando se utilizan dietas con alta energía (en base a maíz), más que alta energía y proteína (maíz y harina de soja), observando mejores niveles de glucosa, colesterol, insulina y estradiol en las dietas con alta energía (Habibizad et al. 2015).

Además de la importancia relativa en la dieta de los carbohidratos de fácil fermentación (precursores de ácido propiónico a nivel ruminal y finalmente de glucosa a nivel hepático), y de los aminoácidos que llegan a abomaso (cantidad y calidad), la energía proveniente de la oxidación de ácidos grasos parece también ser importante (Scaramuzzi et al. 2010). Por otro lado, los aportes de proteína en alimento también pueden ser una fuente importante de energía para el rumiante ya que, a través de neoglucogénesis, más de 35% de los requerimientos de glucosa pueden ser cubiertos a través de aminoácidos contenidos en las proteínas. Por lo tanto, el aumento en este componente de la dieta resultará en un incremento también de glucosa (Teleni et al. 1989). La harina de soja, con o sin protección con taninos condensados, o los bloques comerciales preparados en base a ella han sido las opciones más efectivas en nuestro medio para alcanzar respuestas en TO y prolificidad por sus elevados niveles de proteína cruda (40% o más; Banchemo et al. 2006; Viñoles et al. 2009; Banchemo et al. 2012), de allí su segura y práctica recomendación de uso.

Sin embargo, la efectividad de esta suplementación corta depende del momento del ciclo estral en que se realiza. Para ser efectivo, el suplemento debe ser administrado previo a la luteólisis, momento en el que ocurre la emergencia de la onda ovulatoria, y previo a la fase folicular del nuevo ciclo estral (Smith & Stewart, 1990; Downing et al. 1995a; Downing et al. 1995b). Algunos investigadores reportan efectos negativos cuando la suplementación se realiza los días muy cercanos a la ovulación (Smith & Stewart, 1990). Dado que es un momento crítico del ciclo estral donde la alimentación focalizada incrementa la TO, el estro de las ovejas debería estar lo más sincronizado posible para lograr este objetivo (Gherardi & Lindsay, 1982).

### **Mecanismo de acción de la alimentación focalizada**

Al estudiar el efecto estático de la nutrición sobre el desarrollo folicular en ovejas con alta CC, se encontró un incremento en la TO asociada a un aumento de FSH y disminución de la concentración de estradiol durante la fase folicular (Viñoles et al. 2002). La baja concentración de estradiol provocaría entonces una menor inhibición de los niveles de FSH, permitiendo un mayor crecimiento de los folículos sensibles a gonadotropina y de esa forma llegar a ser seleccionados para ovular (Viñoles et al. 2005). El incremento en la TO estaría firmemente asociado al efecto estático de la nutrición (Rhind & McNeilly, 1986; Rhind et al. 1989; Xu et al. 1989).

Sin embargo, a diferencia de efecto estático, la efectividad del efecto inmediato de la nutrición en incrementar la TO no es consistente. Cuando se suplementaron las ovejas durante seis días (días 9 a 14 del ciclo) no se registró aumento en la TO (Viñoles et al. 2005), sin

embargo, con siete días de suplementación (días 8 a 14) en la misma raza y estación se logró aumentar la TO en 14% (Viñoles, 2003). Esta inconsistencia en el efecto nutricional focalizado sobre la TO sugiere que el incremento en ésta última quizás depende también de otros factores como el estatus folicular al inicio del tratamiento nutricional. Aunque no se logró incrementar la TO con una suplementación corta (día 9 a 14), si se prolongó la vida media de los últimos folículos no ovulatorios, lo que disminuyó el número de ondas foliculares en el ciclo. Ese efecto no fue asociado con cambios en la concentración de FSH, pero si fue correlacionado con un incremento en la concentración circulante de glucosa, insulina y leptina (Viñoles et al. 2005). Se sugiere entonces que el efecto estático y el efecto inmediato de la nutrición sobre el desarrollo folicular no están mediados por mecanismos similares ya que, a diferencia del efecto estático, el efecto inmediato de la nutrición no es mediado por cambios en el sistema de feedback de FSH y estradiol, pero si a través del incremento en las concentraciones de glucosa, insulina y leptina (Viñoles, 2002; Viñoles et al. 2005).

La cantidad de folículos disponibles para la acción de la glucosa y hormonas metabólicas quizás juegue un papel decisivo en la respuesta a la estimulación e incremento de la TO. Las ovejas en alta CC tienen un mayor número de folículos dependientes de gonadotrofinas que aquellas ovejas en baja CC (Rhind & McNeilly, 1986, Rhind et al. 1989, Xu et al. 1989, Viñoles et al. 2002). Es de esperar entonces que las señales metabólicas actuando en un pool más grande de folículos quizá tenga mayor chance de rescatar folículos de la atresia lo que incrementaría la TO (Viñoles et al. 2005). Hay estudios afirmando que la respuesta a la suplementación focalizada es mejor en ovejas con alta CC comparada a las de baja CC (Leury et al. 1990). Cuando se suplementaron ovejas en baja CC, aumentó el número de folículos pequeños pero la TO no se vio afectada. Sin embargo, en ovejas con alta CC, la suplementación permitió que se seleccionaran mayor cantidad de folículos en la onda ovulatoria aumentando así la TO (Viñoles et al. 2010a).

La concentración de FSH no es entonces un mediador en el efecto de la suplementación focalizada, pero si la concentración de glucosa, insulina y leptina, las cuales actúan directamente a nivel ovárico. Este efecto es muy preciso, ya que la concentración disminuye al alcanzar un valor pico al tercer día de suplementación. El estatus del desarrollo folicular al momento de la máxima concentración de glucosa y hormonas metabólicas quizá sea uno de los factores que determinan que aumente o no la TO en respuesta al tratamiento nutricional (Viñoles et al. 2005). Un mecanismo alternativo del efecto inmediato de la nutrición sobre el crecimiento folicular quizá involucra acciones directas en el ovario de los niveles de glucosa y hormonas metabólicas como insulina, IGF-1 y leptina, debido a que las proteínas transportadoras de glucosa y receptores específicos para esas hormonas están presentes en los folículos (Williams et al. 2001; Muñoz-Gutiérrez et al. 2004).

## **Protocolos de inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) en ovinos**

La sincronización de estros asociados a la IATF en ovinos es una biotecnología reproductiva con muchas ventajas (Olivera-Muzante, 2018), aunque aún poco implementada en nuestro país (DIEA, 2014; Fernández Abella & Villegas, 2015). La IATF potencia las ventajas de la sincronización, permitiendo inseminar un alto número de hembras por día, con carneros de alto valor genético, y sin necesidad de detección de estros. Por otra parte, la concentración de eventos posibilita un uso más eficiente de los recursos humanos y materiales del predio, y de los escasos recursos nutricionales existentes (pre-servicio, parto y pos-parto). Además, la IATF favorecería el mantenimiento del estatus sanitario de las ovejas, ya que en una IA tradicional a estro visto los ovinos están sometidos a un prolongado manejo en bretes, realidad de difícil ponderación (Menchaca y Rubianes, 2004; Olivera & Gil, 2005). Finalmente, ayudaría a mejorar la eficiencia reproductiva mediante una parición concentrada y con posibilidades de un mejor control, obtención de corderos de edad y peso homogéneo, etc.

Para la implementación de IATF se requiere del uso de programas de sincronización de estros que permitan obtener una alta sincronía en la ovulación, asociados a una tasa de concepción elevada, sin desatender aspectos del bienestar animal y medio ambiental. Los protocolos de sincronización de estros que pueden ser utilizados en programas de IATF en ovinos se basan en el uso de progestágenos asociados con gonadotropinas o en el de análogos sintéticos de prostaglandina F2 alfa.

### **Protocolos en base al uso de progestágenos y gonadotrofinas**

Este método tiene como fundamento simular una fase luteal de duración normal, motivo por el cual los tratamientos tradicionales duran 12 a 14 días (Gordon, 1983). Los progestágenos naturales o sintéticos (P4) pueden ser usados tanto en anestro como en la estación reproductiva (Menchaca & Rubianes, 2004). La forma de aplicación más frecuente es mediante el uso de dispositivos intravaginales asociados con tratamientos con gonadotrofinas al momento ó poco antes de retirar los mismos, la más utilizada es la gonadotrofina coriónica equina (eCG), cuya dosis varía de 200 y 500 UI, dependiendo de la raza y tamaño. Esto busca asegurar la sincronía de la ovulación, lo cual permite la realización de una IATF exitosa. La inseminación se debe realizar entre 48 a 60 horas luego de retirado el dispositivo liberador de P4, dependiendo de la vía de IA utilizada (cervical o intrauterina), y del tipo de preservación seminal utilizada (Cognie et al. 1970; Colas et al. 1973; Colas et al. 1974).

Aunque es el protocolo más aceptado para la sincronización de estros e IATF, la fertilidad obtenida con él es variable, lo cual ha sido asociado por algunos investigadores con el envejecimiento de los folículos ovulatorios debido en algunos casos a la duración del tratamiento (Viñoles et al. 2001). También se reporta un efecto negativo de la eCG sobre la tasa de preñez, dada su capacidad inmunogénica en cabras y ovejas, lo que ha sido atribuido a su origen heterólogo, a su alto peso molecular ó a su nivel de glicosilación (Menchaca &

Rubianes, 2004). Conjuntamente a su elevado costo, los tratamientos con P4 también presentan problemas prácticos, ya que muchos dispositivos se pierden o requieren ser acompañados con antibióticos para evitar adherencias y/o vaginitis (Durán del Campo, 1980; Viñoles et al. 2006; Fierro et al. 2013). Además de las desventajas mencionadas, los consumidores están preocupados por el uso de hormonas y antibióticos y sus residuos en carne y leche en los animales de consumo, y demandan productos más “limpios, verdes y éticos” (Martin y Kadokawa, 2006). Algunos países europeos han limitado el uso de estas hormonas por su repercusión en salud pública (Martemucci & D’Alessandro, 2011), y en el bienestar animal (González-Bulnes et al. 2005).

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

La prostaglandina F2 $\alpha$  y sus análogos sintéticos (PG) son poderosos agentes luteolíticos (McCracken, 1970), por lo tanto, su uso está restringido a la estación reproductiva. Esta hormona es rápidamente metabolizada por el pulmón y eliminada, no dejando residuos en el organismo (Piper, 1970; Moller-Holtkamp, 1980; Davis et al. 1980). Por lo tanto, los protocolos para IATF basados únicamente en PG podrían ser una alternativa a aquellos que utilizan P4 y eCG (P4-eCG).

Los protocolos en base a PG más difundidos consisten en dos inyecciones de PG con intervalos entre nueve a doce días e inseminación entre 20 y 72 horas luego de la segunda dosis (Hackett et al. 1981; Acritopoulou-Fourcroy et al. 1982). Aunque un porcentaje muy alto de animales muestran estro luego de la segunda dosis de PG, estos se dispersan en más de tres días. Al aplicar la segunda dosis en la mitad de la fase luteal no es posible determinar cuál de las ondas de crecimiento aportará los folículos capaces de ovular. En esta etapa existen folículos en diferente estado de desarrollo, razón por la cual se dispersan los estros (Houghton et al. 1995; Viñoles & Rubianes, 1998). Esta dispersión de tres a cuatro días en la manifestación de estros limitaría su uso en protocolos de IATF según algunos investigadores (Menchaca & Rubianes, 2004). La baja tasa de preñez obtenida ha llevado a no recomendar dichos protocolos para IATF (Gordon, 1983; Evans & Maxwell, 1990; Durán Hontou, 1993).

El avance en el conocimiento de la fisiología ovárica generado por la utilización de la ultrasonografía en tiempo real en rumiantes permitió crear un nuevo protocolo para IATF en ovinos que consiste en la aplicación de dos dosis de PG con intervalo de siete días de separación (Synchrovine®; Menchaca & Rubianes, 2004; Rubianes et al. 2004). Este protocolo sincroniza muy bien el estro y la ovulación sin embargo alcanza una menor fertilidad y fecundidad cuando lo comparamos con protocolos que utilizan P4-eCG (Olivera-Muzante et al. 2011a; Viñoles et al. 2011), o con estro natural (Fierro et al. 2011). Los inferiores resultados obtenidos utilizando Synchrovine® se explicarían por los bajos niveles de progesterona durante el desarrollo del folículo ovulatorio. Además, se vería afectada la tasa de crecimiento, el tamaño folicular y por lo tanto la TO (Fierro et al. 2011). Diversas alternativas se han planteado para mejorar el resultado de este protocolo. Por ejemplo, variar el momento de IATF, el intervalo entre dosis o la dosis de PG (Olivera-Muzante et al. 2011a;

Olivera-Muzante et al. 2011b), incorporar una dosis de GnRH 24 o 36 horas posterior a la segunda dosis de PG (Olivera-Muzante et al. 2013), asociar alimentación focalizada (Fierro et al. 2014), o incluir una dosis de eCG al momento de la segunda PG (Vilariño et al. 2017), sin obtener mejoras significativas del mismo.

En el trabajo de revisión de Fierro et al. (2013) se plantea la hipótesis de que una mayor separación entre las dosis de PG podría generar un desarrollo folicular en un ambiente con mejores niveles de progesterona plasmática, con mejor calidad de los ovocitos generados, esperando entonces mejores resultados reproductivos. Existen reportes internacionales previos que utilizan más días de separación entre las dosis de PG (Boland et al. 1978; Loubser & Van Niekerk, 1981; Hackett et al. 1981; Acritopoulou-Fourcroy et al. 1982), que parecerían tener mejores resultados reproductivos que con el protocolo Synchrovine®, e incluso equiparables al protocolo de P4-eCG en algunas situaciones. Sin embargo, el número de animales, las diferentes razas y condiciones de manejo empleadas no permiten sacar conclusiones válidas de ellos. Estudios recientes a nivel nacional permitieron confirmar que una mayor separación entre las dosis de PG (12, 14 ó 16 días vs. 7 ó 10) proporcionarían un mejor ambiente hormonal durante la formación del folículo preovulatorio, sumado a una concentración de estros importante, incrementando la fertilidad a la IATF (Fierro et al. 2016; Fierro et al. 2017).

Posteriormente se comparó el uso de PG con separaciones de 12, 13, 14, 15 o 16 días (protocolos “medios” o “largos”) con aquellos que utilizan P4-eCG. Las separaciones más amplias entre dosis de PG (protocolos “largos”: 14 a 16 días) superaron a las separaciones intermedias (protocolos “medios”: 12 y 13 días), equiparando la fertilidad obtenida a la IATF con el protocolo tradicional de P4-eCG (Fierro & Olivera-Muzante, 2017). A partir de estos resultados, los protocolos largos de PG se convierten en una alternativa para la sincronización de estros e IATF vía cervical más práctica, menos onerosa, más “limpia, verde y ética” que las tradicionales. Aunque en este último reporte se observaron diferencias significativas en la TO a favor del protocolo de P4-eCG, no las hubo finalmente en prolificidad, siendo de esperar que existieran dado que normalmente esta variable se incrementa al utilizar eCG. La TO y/o prolificidad son un tema controversial cuando se utiliza PG para sincronizar el estro ya que algunos autores reportan una disminución respecto al estro espontáneo (Fierro et al. 2011), pero otros no (Letelier et al. 2011).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Según el Censo General Agropecuario (2011), más del 90% de los productores con ovinos de nuestro país maneja al servicio majadas con menos de 550 ovejas de cría (pequeños y medianos productores), de baja prolificidad (biotipos laneros o doble propósito como raza predominante), congregando más del 60% del stock ovino. Esta escala y caracterización productiva, permitiría y requiere, de la aplicación de manejos reproductivos que tiendan a mejorar su eficiencia productiva y su simplificación.

Cada día es más frecuente la consulta de técnicos y productores acerca de cómo concentrar el período de servicios en majadas de este tamaño sin disminuir sus resultados reproductivos. Sin embargo, la adopción de este tipo de biotecnologías reproductivas es aún baja (DIEA, 2014; Fernández Abella & Villegas, 2015), siendo varios los motivos que llevan a ello. Se podría mencionar una mayor inversión económica, aspectos prácticos de implementación de los protocolos tradicionales de sincronización de estros (en base a P4-eCG; Fierro et al. 2013), el asumir inferiores resultados respecto al estro espontáneo, o el temor a tener partos muy concentrados. En este sentido, se han alcanzado recientemente buenos resultados en IATF utilizando los denominados protocolos “largos” de separación entre dosis de PG (de 14 a 16 días; Fierro et al. 2017), equiparando en fertilidad a los protocolos tradicionales de sincronización (Fierro & Olivera-Muzante, 2017). A partir de estos resultados, los protocolos largos en base a PG se convierten en una alternativa para la sincronización de estros y servicio con carneros o con IA vía cervical, más práctica y económica, más “limpia y verde” que los protocolos tradicionales. Sin embargo, la TO y/o la prolificidad obtenida son un tema aun controversial cuando se utiliza PG para sincronizar el estro (Fierro et al. 2011; Letelier et al. 2011). Esto constituye un desafío para tener en cuenta al querer utilizar servicios sincronizados en ovinos en base a PG buscando no afectar o aumentar la prolificidad.

La suplementación focalizada ha demostrado incrementar significativamente la TO y la prolificidad de ovejas en estro espontáneo por medio de un efecto “inmediato” de la alimentación cuando éstas se encuentran en un balance metabólico positivo (Viñoles, 2003; Scaramuzzi et al. 2010). La mayoría de los trabajos nacionales que han estudiado y validado la suplementación focalizada han utilizado protocolos de pre-sincronización de los estros, implementando la misma los días previos a la aparición del estro espontáneo posterior al inducido hormonalmente, y realizando el servicio con un porcentaje elevado de carneros (6 a 8%) o con IA sobre estro detectado (Viñoles et al. 2009; Banchero et al. 2012). Sin embargo, en este modelo experimental podrían no estar suplementándose todas las ovejas en el momento más preciso del ciclo estral y/o del estado de desarrollo folicular, ya que existe una importante dispersión de los estros espontáneos que se generan (de seis a diez días utilizando dos o una dosis de PG respectivamente; Olivera & Gil, 2005). Teniendo en cuenta lo expresado anteriormente, parece de gran interés estudiar el impacto reproductivo de una suplementación focalizada pre-servicio asociada al uso de protocolos largos de PG para realizar IATF. El resultado podría ser proporcionalmente mejor al observado en ovejas en

estro espontaneo pre-sincronizado, ya que la suplementación estaría siendo suministrada en un momento más preciso teniendo en cuenta la gran concentración de estros y ovulaciones que ellos generan (Fierro et al. 2016).

Esta tesis tuvo como objetivo general la comparación, en términos reproductivos y económicos, de ovejas que recibieron una suplementación proteica focalizada previo a un servicio vía cervical utilizando un protocolo de sincronización de estros basado en PG e IATF o servidas en estro espontaneo pre-sincronizado detectado. Se buscó también validar un paquete de manejo reproductivo que disminuya los días totales de servicio, incrementando los indicadores reproductivos.

La hipótesis de trabajo fue que la suplementación proteica focalizada previo al servicio incrementa la TO, prolificidad y fecundidad en ovejas con estro sincronizado en base a PG e IATF, y que la magnitud de la respuesta es mayor que la observada en ovejas en estro espontáneo pre-sincronizado, debido a una mejor sincronización entre el momento de suplementación y el estado de desarrollo folicular. Ello favorecería además una mejor relación insumo/producto de esta alternativa de manejo.

Los objetivos específicos fueron:

- 1) Determinar la respuesta estral, el número de ovejas que ovulan, la TO, la tasa de no retorno al servicio, y la fertilidad, prolificidad y fecundidad a 60 días pos-servicio en las alternativas planteadas.
- 2) Determinar los indicadores reproductivos globales alcanzados con un manejo reproductivo luego de dos servicios (IA más servicio de repaso con carneros).
- 3) Realizar una evaluación económica de las alternativas para una mejor recomendación técnica de su uso.

## ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN

A los efectos de dar respuesta a los objetivos generales y específicos del proyecto y desafiar la hipótesis mencionada se realizó un solo experimento *in vivo*, de carácter aplicado (evaluación reproductiva de respuesta) durante la estación reproductiva (marzo a junio), en el establecimiento comercial “El Recuerdo” de la familia Errandonea López, ubicado a 5 Km de la localidad de Tomás Gomensoro, Artigas, Uruguay (30,4° S - 57,4° O). Todos los procedimientos experimentales empleados fueron aprobados previamente por el Comité Honorario de Experimentación Animal de la Facultad de Veterinaria-Universidad de la República, Uruguay (Expediente N° 111400-000079-12).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales y manejo sanitario

Se utilizaron un total de 437 ovejas multíparas de raza Merino Australiano, de 2,5 a 5,5 años, con una CC de  $3,2 \pm 0,2$  (escala de 1 a 5, Russel et al. 1969) y  $40,6 \pm 4,9$  kg de PV promedio al inicio del experimento (evaluado con ayuno nocturno; balanza electrónica NQ&F® monitor AD-4406, Japón). Las ovejas fueron destetadas con dos meses de antelación, calificadas como clínicamente aptas para la reproducción, bañadas en forma preventiva contra ectoparásitos (Mixan®, Cipermetrina-Ethión; Laboratorio La Buena Estrella, Canelones, Uruguay), dosificadas contra nemátodos gastrointestinales (Tritom®, Naftalophos al 15%; Laboratorio Cibeles, Montevideo, Uruguay), e inmunizadas contra enfermedades clostridiales (Clostrisán®, Laboratorio Santa Elena, Montevideo, Uruguay) 20 días previos al inicio del experimento. Se emplearon para el servicio cinco carneros adultos de 1,5 a 2,5 años, de raza Merino Dohne, evaluados como clínicamente aptos para la reproducción (serología negativa a *Brucella ovis*), con igual manejo sanitario que las ovejas, y acostumbrados al uso de vagina artificial para la extracción de semen.

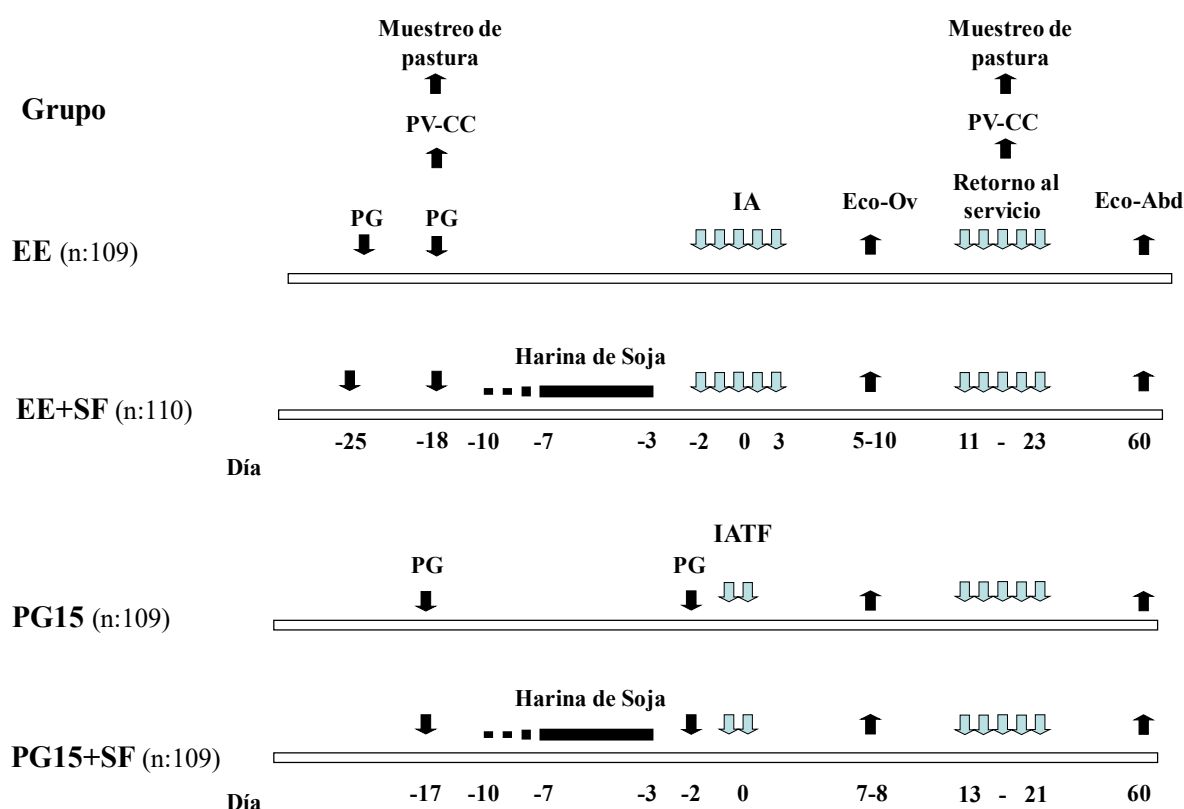
### Diseño experimental

En función de CC y PV al Día -17 (Día 0= IATF; ver Fig.1) las ovejas fueron asignadas aleatoriamente a uno de cuatro grupos en un diseño factorial 2x2 (tipo de estro - espontáneo o inducido con PG- con o sin suplementación proteica focalizada):

- 1) Grupo EE (n=109): ovejas en estro espontáneo e IA.
- 2) Grupo EE+SF (n=110): Ídem grupo EE más suplementación proteica focalizada pre-servicio.
- 3) Grupo PG15 (n=109): ovejas en estro inducido con PG15 e IATF.
- 4) Grupo PG15+SF (n=109): Ídem grupo PG15 más suplementación proteica focalizada pre-servicio.

## Protocolos de sincronización estral

A los efectos de obtener un gran número de ovejas en estro espontáneo al mismo tiempo que las ovejas que se inseminan a tiempo fijo, las ovejas de los grupos EE y EE+SF fueron pre-sincronizadas con dos inyecciones de PG separadas siete días (Día -25 y -18 respectivamente; D-L Cloprostenol, 125 µg por inyección, Estrumate®, Shering-Plough, Alemania). El comportamiento estral en estos grupos fue detectado dos veces al día (desde las 17:00 a las 07:00 h de la siguiente mañana y desde las 8:00 a las 15:00 h) durante seis días (16 a 21 días posteriores a la segunda PG;  $\approx$  Días -2 a 3, siendo el Día 0= día estimado del pico de estros) con capones androgenizados (ciclopropionato de testosterona 100 mg/semana/capón x 3 semanas; Testosterona Ultra Fuerte®, Laboratorios Dispert, Montevideo, Uruguay), pintados con tierra de color en el pecho, a un tasa de cinco capones/100 ovejas. Las ovejas de los grupos PG15 y PG15+SF fueron sincronizadas con dos inyecciones de PG separadas 15 días (D-L Cloprostenol, 125 µg por inyección, Estrumate®, Shering-Plough, Alemania; Día 0= IATF). Para considerar el efecto “día de servicio” en la IATF esta se realizó en dos días consecutivos. Para ello, la primera y segunda inyección de PG, y por lo tanto el comienzo y el final del período de suplementación en el grupo PG15+SF, fueron dadas en dos días diferentes, generando subgrupos de 55 y 54 ovejas/día/grupo respectivamente (Figura I).



**Figura I.** Diseño experimental del trabajo.

Grupo EE: ovejas en estro espontáneo pre-sincronizado con dos inyecciones de PG separadas siete días e IA cervical con semen fresco al momento de la detección del estro (16 a 21 días

posteriores a la segunda dosis de PG;  $\approx$  Días -2 a 3, Día 0= día estimado de pico de estros). Grupo EE+SF: Ídem grupo EE más suplementación proteica focalizada con harina de soja durante ocho días (8 a 15 días posteriores a la segunda PG;  $\approx$  Días -10 a -3). Grupo PG15: ovejas en estro inducido con dos inyecciones de PG separadas 15 días e IA a Tiempo Fijo (IATF) cervical con semen fresco (Día 0= IATF). Grupo PG15+SF: Ídem grupo PG15 más suplementación proteica focalizada con harina de soja durante ocho días previos al día de la segunda inyección de PG (Día -10 a -3). PV: peso vivo evaluado con balanza electrónica con ayuno previo nocturno. CC: condición corporal. Eco-Ov: ultrasonografía transrectal de ovarios. Retorno al servicio: evaluado con carneros pintados. Eco-Abd: ultrasonografía transabdominal al Día 60 para evaluar respuesta reproductiva al servicio de IA y final (IA más repaso).

### **Manejo nutricional. Evaluación de consumo y composición**

La disponibilidad de pasturas en el potrero a utilizar fue evaluada los Días -17 y 23 del experimento según la técnica descrita por Banchero et al. (2012). Las pasturas y el suplemento fueron analizadas según el porcentaje de materia seca (MS), proteína cruda (PC), fibra detergente ácida (FDA) y fibra detergente neutra (FDN) en el Laboratorio de Nutrición de INIA “La Estanzuela”, y el contenido de Energía Metabólica (EM) de los alimentos estimado usando el sistema AOAC (1984).

Las ovejas fueron manejadas siempre pastoreando campo natural en un potrero reservado con dos meses de antelación, de 18 ha de superficie, con una asignación de forraje de 6 kg de MS/100 kg de PV (disponibilidad inicial de 1300 kg/ha de MS; PC: 10,8%, FDA: 34,7%, FDN: 66,9%, EM: 2,1 Mcal/kg de MS), y agua fresca suministrada *ad libitum*. Los grupos de ovejas que fueron suplementados (EE+SF y PG15+SF) fueron separados en una parcela de 9 ha, dentro del mismo potrero, durante el período de alimentación diferencial. La suplementación proteica focalizada fue realizada con harina de soja peleteada (PC: 51,9%, FDA: 9,1%, FDN: 22,2% EM: 2,8 Mcal/kg de MS). Esta fue ofrecida gradualmente desde el Día -10 a -8 (0,4, 0,6 y 0,9% del PV/oveja/día de MS), logrando la cantidad final de suplemento durante los Días -7 a -3 (1,1% del PV/oveja/día de MS, grupos EE+SF y PG15+SF respectivamente. Ver Figura 1); alcanzando un consumo promedio de 0,9% del PV/oveja/día de MS durante el período total de suplementación.

La suplementación fue ofrecida en forma colectiva a las 8:00 am de cada mañana, en comederos de madera lineales ubicados en el potrero, con un frente de acceso de 0,35 m/oveja. Para confirmar el consumo de suplemento las ovejas fueron identificadas con números pintadas en el flanco. Todas las ovejas consumieron cada día el total del suplemento ofrecido. El consumo estimado promedio de PC entre los Días -7 a -3 (no considerando selección en el consumo de pasturas; Montossi et al. 2000) fue de 141 y 295 g/oveja/día para grupos no suplementados y suplementados respectivamente. Para calcular consumo de PC se asumió que las ovejas podían consumir entre el 3,1 y 3,2% de MS como porcentaje de su PV (NRC, 2007; Banchero et al. 2012). El consumo estimado de PC y EM de las ovejas, fuera del período de suplementación diferencial, estuvo dentro de los niveles descriptos para mantenimiento a moderada ganancia según el NRC (2007).

### **Colecta, evaluación y dilución del semen. Inseminación artificial. Servicio de repaso**

Cada día de IA el semen fue obtenido de cinco carneros Merino Dohne por el método de vagina artificial, según lo descrito por Evans & Maxwell (1987). Se colectaron en forma consecutiva dos eyaculados de cada carnero (con 10 minutos de descanso entre uno y otro), los cuales fueron evaluados para su aprobación ( $> 80\%$  de motilidad progresiva subjetiva), y unificados (pool) según su concentración espermática individual, de forma tal que cada carnero contribuyera al pool de semen con similar número de espermatozoides. Luego de esto el pool de semen fue diluido con leche descremada UHT con inclusión de antibióticos (enrofloxacin 250 mg/L, Baytril® 10%, Bayer, Uruguay), según la concentración espermática final convenida, y mantenido a temperatura ambiente protegido de la luz solar hasta el momento de inseminación. El mismo pool de semen fue utilizado para todas las ovejas a ser inseminadas ese día.

La IA fue realizada por la vía cervical por dos técnicos, en forma aleatoria, utilizando un vaginoscopio y una pistola de inseminar (Walmur®, Montevideo, Uruguay), según lo descrito por Evans & Maxwell (1987). La dosis de inseminación fue de 0,15 cc/oveja (semen + diluyente), conteniendo una media de  $160 \times 10^6$  espermatozoides, que fueron depositados en forma lenta lo más profundo del inicio de la cerviz posible. Las ovejas con estros inducidos con PG fueron inseminadas a tiempo fijo a  $56 \pm 1.5$  horas de la segunda inyección de PG (según Fierro et al. 2016), al mismo tiempo que las ovejas en estro espontáneo de ese día.

A partir del Día 11 y hasta el 23 se realizó el servicio de repaso con carneros Merino Dohne a campo en un solo potrero (2 carneros/100 ovejas). Estos fueron pintados en el pecho con tierra de color roja y grasa (2 carneros/100 ovejas) para identificar las ovejas que repetían estro.

### **Respuesta estral y ovárica, no retorno al estro y evaluaciones de fertilidad**

Se calculó la respuesta estral en los grupos con ovejas en estro espontáneo pre-sincronizado (ovejas en estro/total de ovejas en servicio  $\times 100$ ), y en todos los grupos el porcentaje de ovejas que ovulan (ovejas que ovulan/total de ovejas en servicio  $\times 100$ ) y la TO (número de cuerpos lúteos/oveja que ovula; los Días 5 a 10 o 7 y 8, grupos de estro espontáneo o inducido por PG respectivamente), por ecografía ovárica transrectal utilizando un transductor de 7.5 MHz (ALOKA SSD-500, Overseas Monitor Corp. Ltd., Tokyo, Japan), según la técnica descrita por Viñoles et al. (2010b). El no retorno al servicio al Día 23 (ovejas que no retornan al servicio/ovejas inseminadas  $\times 100$ ; NRR23) fue evaluado desde el Día 11 al 23 con los carneros del servicio de repaso. La concepción del servicio (ovejas preñadas/ovejas inseminadas  $\times 100$ ), la fertilidad (ovejas preñadas/total de ovejas en servicio  $\times 100$ ), la prolificidad (fetos/oveja preñada), y la fecundidad (fetos/oveja en servicio) fueron evaluadas al Día 60 por ecografía uterina transabdominal utilizando un transductor 3.5 MHz convexo y el mismo monitor, estimándose resultados del primer servicio (IA) y finales (IA más repaso con carneros).

## **Análisis estadístico**

Fue considerado para el análisis estadístico el efecto “día de IA” en la respuesta reproductiva de los diferentes grupos. Las variables categóricas fueron analizadas por regresión logística utilizando el procedimiento Genmode de SAS (SAS 9.2V; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), considerando una respuesta binaria (0 y 1 para NRR23, concepción o fertilidad, o 1 -simple- y 2 -múltiple- para TO y prolificidad), considerando el tratamiento como variable explicativa. El efecto de la suplementación en la evolución del PV y CC fue analizado mediante un ANOVA. Los datos de PV, CC, TO y prolificidad son presentados como medias  $\pm$  DS. La respuesta estral, el porcentaje de ovejas que ovulan, el NRR23, la concepción, la fertilidad y fecundidad se presentan como porcentajes. Se consideran diferencias significativas si  $P < 0.05$  y tendencia si  $0.05 > P > 0.1$ .

## **Valoración económica**

El análisis económico comparativo se realizó mediante el método de presupuestación parcial, definido como el cómputo anticipado de los ingresos y costos de una actividad o rubro (Rivera, 2002). El método considerará por un lado las ventajas de la alternativa de suplementación focalizada e IATF (ingresos de estas y costos de la IA a estro espontaneo), y por otro lado las desventajas (costos de la alternativa de suplementación focalizada e IATF e ingresos de la IA a estro espontáneo). El criterio de decisión es, cuando las ventajas superan a las desventajas, la o las alternativas evaluadas es o son viables. Es aconsejable que todo análisis económico sea acompañado además de un ítem denominado “otras consideraciones”, a los efectos de complementar la toma de decisiones no basando la misma solo en una suma aritmética.

El análisis comparativo se plantea en los hechos para un trabajo de IA cervical sobre estro espontaneo pre-sincronizado o de IATF con semen fresco, organizado por un profesional veterinario, sobre 437 ovejas de raza Merino Australiano. Se emplean como supuestos reproductivos los obtenidos en el este experimento. Los costos considerados incluyen el valor de alquiler de carneros, honorarios veterinarios, viáticos, sueldo de inseminador y/o ayudantes, costo ficto de alimentación del personal, y valor comercial en plaza de PG, harina de soja y demás insumos, con valores ajustados a diciembre del 2018.

## RESULTADOS

El PV y CC de las ovejas no se modificó a lo largo del experimento ( $40,6 \pm 4,9$  vs.  $41,4 \pm 4,8$ ;  $3,2 \pm 0,2$  vs.  $3,2 \pm 0,2$ , Día -17 and 17 respectivamente), permaneciendo similar dentro y entre grupos ( $P>0,05$ ).

### Respuesta estral, ovárica y reproductiva

La respuesta estral promedio acumulada en las ovejas con estro espontáneo pre-sincronizado fue del 95%, sin diferencias por efecto de la suplementación (93 y 98% grupo EE y EE+SF respectivamente), con un 84% agrupado entre los Días -1 y 1 (24, 44 y 16%; 16, 17 y 18 días posteriores a la segunda inyección de PG respectivamente). Solo diez ovejas de estos grupos no fueron detectadas en estro y por lo tanto no fueron inseminadas (4,6% y 4,5%, EE y EE+SF respectivamente); cuatro de ellas no ovularon (1,8 y 1,7%, EE y EE+SF respectivamente). Todas las ovejas con estro inducido por PG ovularon.

No se observó un efecto “día de IA” en la respuesta reproductiva de los diferentes grupos y/o subgrupos, por tanto, los datos de diferentes días fueron agrupados. Los resultados reproductivos obtenidos al servicio de IA y finales (IA más repaso con carneros) se pueden observar en la Tabla I y II respectivamente. La TO, el NRR23, la concepción, fertilidad y fecundidad al servicio de IA fueron mayores en ovejas del grupo EE que aquellas del grupo PG15 ( $P<0,05$ ). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en prolificidad entre estos grupos ( $P>0,05$ ). La suplementación proteica focalizada incrementó la TO, prolificidad y fecundidad ( $P<0,05$ ), pero no el NRR23, la concepción o la fertilidad de ovejas del grupo EE+SF ( $P>0,05$ ). La TO en ovejas del grupo EE+SF disminuyó en la medida que su estro ocurrió más distante del Día 0, alcanzando su máximo valor en aquellas ovejas que dejaron de consumir tres días antes de presentar estro (1,17,  $n=6$ ; 1,27,  $n=26$ ; 1,38,  $n=45$ ; 1,27,  $n=22$ ; 1,20,  $n=5$ ; 1,0,  $n=4$ ; Días -2 a 3 respectivamente;  $P>0,05$ ). La suplementación proteica focalizada suministrada a las ovejas del grupo PG15+SF incrementó la TO, prolificidad y fecundidad a niveles comparables con las ovejas del grupo EE+SF ( $P>0,05$ ). La magnitud del incremento en TO de las ovejas del grupo PG15+SF fue mayor que la observada en el grupo EE+SF (27 vs. 11%;  $P<0,001$ ). Sin embargo, el NRR23, la concepción y la fertilidad fueron similares entre las ovejas de los grupos PG15 y PG15+SF ( $P>0,05$ ).

**Tabla I.** Respuesta reproductiva observada en ovejas multíparas Merino Australiano en estro espontáneo pre-sincronizado o inducido con PG, con o sin suplementación con harina de soja previo al servicio de inseminación artificial (IA) cervical utilizando semen fresco.

| Grupo (n)     | TO                       | NRR23 (%)         | Concepción (%)    | Fertilidad (%)    | Prolificidad             | Fecundidad         |
|---------------|--------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------------|--------------------|
| EE (109)      | 1,17 ± 0,40 <sup>b</sup> | 81,7 <sup>a</sup> | 78,8 <sup>a</sup> | 75,2 <sup>a</sup> | 1,02 ± 0,16 <sup>b</sup> | 0,77 <sup>b</sup>  |
| EE+SF (110)   | 1,30 ± 0,45 <sup>a</sup> | 83,8 <sup>a</sup> | 82,9 <sup>a</sup> | 79,1 <sup>a</sup> | 1,18 ± 0,39 <sup>a</sup> | 0,94 <sup>a</sup>  |
| PG15 (109)    | 1,06 ± 0,25 <sup>c</sup> | 64,2 <sup>b</sup> | 61,5 <sup>b</sup> | 61,5 <sup>b</sup> | 1,01 ± 0,12 <sup>b</sup> | 0,62 <sup>c</sup>  |
| PG15+SF (109) | 1,35 ± 0,48 <sup>a</sup> | 65,1 <sup>b</sup> | 63,3 <sup>b</sup> | 63,3 <sup>b</sup> | 1,25 ± 0,43 <sup>a</sup> | 0,79 <sup>ab</sup> |

Grupo EE: ovejas en estro espontáneo pre-sincronizado con dos inyecciones de PG separadas siete días e IA cervical con semen fresco al momento de la detección del estro (16 a 21 días posteriores a la segunda dosis de PG;  $\approx$  Días -2 a 3, Día 0= día estimado de pico de estros). Grupo EE+SF: Ídem Grupo EE más suplementación proteica focalizada con harina de soja durante ocho días (8 a 15 días posteriores a la segunda PG;  $\approx$  Días -10 a -3). Grupo PG15: ovejas en estro inducido con dos inyecciones de PG separadas 15 días e IATF cervical con semen fresco (Día 0= IATF). Grupo PG15+SF: Ídem Grupo PG15 más suplementación proteica focalizada con harina de soja durante ocho días previos al día de la segunda inyección de PG (Día -10 a -3). TO: tasa ovulatoria evaluada por ultrasonografía vía transrectal los Días 5 a 10 o 7 y 8 en ovejas en estro espontáneo o inducido con PG respectivamente (número de cuerpos lúteos/oveja que ovula). NRR23: tasa de no retorno al servicio entre los Días 11 y 23 evaluado mediante la monta de carneros pintados (ovejas que no retornan al servicio/ovejas inseminadas x 100). Concepción (ovejas preñadas/ovejas inseminadas x 100), fertilidad (ovejas preñadas/total de ovejas en servicio x 100), prolificidad (fetos/oveja preñada) y fecundidad (fetos/oveja en servicio) evaluadas al Día 60 por ecografía uterina transabdominal. Valores de TO y prolificidad son presentados como medias  $\pm$  DS; NRR23, concepción y fertilidad son presentados como porcentajes. En la misma columna <sup>a</sup> vs. <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ . <sup>b</sup> vs. <sup>ab</sup>:  $P = 0.09$ .

### Respuesta reproductiva final

Se observa que luego de dos servicios (IA más repaso con carneros) la fertilidad final alcanzada se igualó entre los diferentes grupos ( $P > 0,05$ ; Tabla II). Las diferencias de prolificidad generadas por el uso de la suplementación proteica focalizada previo al servicio de IA se mantienen luego de dos servicios dentro de cada tipo de estro (espontáneo e inducido con PG;  $P < 0,05$ ), aunque sus valores numéricos tienden a acercarse. Los valores de fecundidad final mantienen diferencias significativas por el uso de la suplementación proteica focalizada dentro de cada tipo de estro ( $P < 0,05$ ), pero las diferencias existentes entre tipos de estros desaparecen ( $P > 0,05$ ).

**Tabla II.** Respuesta reproductiva final observada (Inseminación Artificial -IA- + servicio de repaso con carneros) en ovejas multíparas Merino Australiano en estro espontáneo pre-sincronizado o inducido con PG, con o sin suplementación con harina de soja previo al servicio de IA.

| Grupo (n)     | Fertilidad final (%) | Prolificidad final       | Fecundidad final  |
|---------------|----------------------|--------------------------|-------------------|
| EE (109)      | 89,0 <sup>a</sup>    | 1,03 ± 0,17 <sup>b</sup> | 0,92 <sup>b</sup> |
| EE+SF (110)   | 92,8 <sup>a</sup>    | 1,17 ± 0,38 <sup>a</sup> | 1,07 <sup>a</sup> |
| PG15 (109)    | 89,0 <sup>a</sup>    | 1,03 ± 0,17 <sup>b</sup> | 0,92 <sup>b</sup> |
| PG15+SF (109) | 90,0 <sup>a</sup>    | 1,18 ± 0,39 <sup>a</sup> | 1,06 <sup>a</sup> |

Grupo EE: ovejas en estro espontáneo pre-sincronizado con dos dosis de PG separadas siete días y servicio de IA con detección de estro durante seis días; Grupo EE+SF: Ídem grupo EE más suplementación proteica focalizada pre-servicio con harina de soja; Grupo PG15: ovejas sincronizadas con dos dosis de PG separadas 15 días e inseminadas a tiempo fijo; Grupo PG15+SF: Ídem grupo PG15 más suplementación proteica focalizada preservicio con harina de soja. Fertilidad final (ovejas preñadas/total de ovejas en servicio x 100), prolificidad final (fetos/oveja preñada) y fecundidad final (fetos/oveja en servicio) evaluadas al Día 60 por ecografía uterina transabdominal luego de dos servicios (IA + servicio de repaso con carneros al 3% desde el Día 11 al 23; Día 0= IATF). Valores de fertilidad son presentados como porcentajes; valores de prolificidad son presentados como medias ± DS. En la misma columna <sup>a</sup> vs. <sup>b</sup>: P< 0.05.

### Valoración económica

La valoración económica de las alternativas ensayadas al primer servicio se presenta en la Tabla III. Se observa que, independientemente del uso de suplementación, las ovejas de los grupos sobre estro espontáneo pre-sincronizado detectado e IA (EE y EE+SF) involucran un número significativamente mayor de días de trabajo (seis vs. uno), y generan costos totales, costo por oveja preñada y costos por cordero a ecografía superiores a los alcanzados por las ovejas de los grupos sobre estro inducido con PG e IATF (43, 17 y 19% superiores en promedio respectivamente). Sin embargo, el porcentaje de parición potencial o fecundidad (número de corderos a nacer en ese primer servicio) fue un 20% mayor en promedio en las ovejas de los grupos sobre estro espontáneo pre-sincronizado respecto a los de estro inducido con PG. Se observa también que, independientemente del tipo de estro empleado (espontáneo o inducido con PG), el uso de una suplementación proteica focalizada generó, en promedio, un 25% más de corderos respecto a no haberla usado, y solo menos de un 1% más de costo promedio por cordero a la ecografía (sin considera el valor genético de ese mayor número de corderos en ese primer servicio). El uso de suplementación proteica focalizada en ovejas con estro inducido con PG e IATF (grupo PG15+SF) generó costos totales, costo por oveja

preñada y costos por cordero a ecografía inferiores a los de ovejas sobre estro espontáneo pre-sincronizado detectado e IA (38, 11 y 17% menos respectivamente), aunque menor fertilidad (ovejas gestantes) y fecundidad (corderos potenciales), en ese primer servicio (25 y 18% menos respectivamente). Como se aprecia en la Tabla II estas diferencias reproductivas en fertilidad y fecundidad desaparecen luego del servicio de repaso ( $P>0,05$ ).

**Tabla III.** Análisis económico comparativo al primer servicio (IA) de alternativas ensayadas

| <b>ALTERNATIVA (Grupo)</b>              | <b>EE</b>   | <b>EE+SF</b> | <b>PG15</b> | <b>PG15+SF</b> |
|-----------------------------------------|-------------|--------------|-------------|----------------|
| N° de ovejas                            | 437         | 437          | 437         | 437            |
| Días de trabajo de IA                   | 6           | 6            | 1           | 1              |
| Carneros necesarios                     | 2           | 2            | 5           | 5              |
| Distancia al predio (km)                | 100         | 100          | 100         | 100            |
| <b>SUPUESTOS REPRODUCTIVOS</b>          |             |              |             |                |
| Fertilidad (%)                          | 75,2        | 79,1         | 61,5        | 63,3           |
| Prolificidad                            | 1,02        | 1,18         | 1,01        | 1,25           |
| <b>INGRESOS</b>                         |             |              |             |                |
| Corderos (n)                            | <b>335</b>  | <b>408</b>   | <b>271</b>  | <b>346</b>     |
| - respecto a EE (%)                     | <b>0</b>    | <b>+22</b>   | <b>-24</b>  | <b>+3</b>      |
| - respecto a PG15 (%)                   | <b>.</b>    | <b>.</b>     | <b>0</b>    | <b>+28</b>     |
| <b>COSTOS (U\$S)</b>                    |             |              |             |                |
| Sincronización                          | 437         | 437          | 437         | 437            |
| Suplementación *                        | 0           | 580          | 0           | 580            |
| Androgenización                         | 45          | 45           | 0           | 0              |
| Tierra de color                         | 18          | 18           | 0           | 0              |
| Alquiler de carneros                    | 1200        | 1200         | 500         | 500            |
| Sueldo de inseminador **                | 420         | 420          | 100         | 100            |
| Sueldo de ayudantes ***                 | 210         | 210          | 70          | 70             |
| Honorarios veterinarios ****            | 280         | 280          | 560         | 560            |
| Viáticos *****                          | 80          | 80           | 160         | 160            |
| Alimentación del personal               | 108         | 108          | 36          | 36             |
| <b>COSTOS TOTALES (U\$S)</b>            | <b>2798</b> | <b>3378</b>  | <b>1863</b> | <b>2443</b>    |
| - respecto a EE (%)                     | <b>0</b>    | <b>+21</b>   | <b>-50</b>  | <b>-14</b>     |
| - respecto a PG15 (%)                   | <b>.</b>    | <b>.</b>     | <b>0</b>    | <b>+31</b>     |
| <b>COSTO/Oveja Preñada (U\$S)</b>       | <b>8,5</b>  | <b>9,8</b>   | <b>6,9</b>  | <b>8,8</b>     |
| - respecto a EE (%)                     | <b>0</b>    | <b>+15</b>   | <b>-23</b>  | <b>+4</b>      |
| - respecto a PG15 (%)                   | <b>.</b>    | <b>.</b>     | <b>0</b>    | <b>+27</b>     |
| <b>COSTO/Cordero a ecografía (U\$S)</b> | <b>8,4</b>  | <b>8,3</b>   | <b>6,9</b>  | <b>7,1</b>     |
| - respecto a EE (%)                     | <b>0</b>    | <b>-1</b>    | <b>-22</b>  | <b>-18</b>     |
| - respecto a PG15 (%)                   | <b>.</b>    | <b>.</b>     | <b>0</b>    | <b>+3</b>      |

Grupo EE: ovejas en estro espontaneo pre-sincronizado con dos dosis de PG separadas siete días y servicio de IA con detección de estro durante seis días; Grupo EE+SF: Ídem grupo EE más suplementación focalizada pre-servicio con harina de soja; Grupo PG15: ovejas sincronizadas con dos dosis de PG separadas 15 días e inseminadas a tiempo fijo; Grupo PG15+SF: Ídem grupo PG15 más suplementación focalizada pre-servicio con harina de soja.

\*: harina de soja peleteada al 0,9% PV/oveja/día de MS por 8 días.

\*\* y \*\*\* para EE y EE+SF: un inseminador y un ayudante; para PG15 y PG15+SF: un inseminador y dos ayudantes.

\*\*\*\*: se considera una o dos jornadas técnicas para EE y EE+SF o PG15 y PG15+SF respectivamente.

\*\*\*\*\*: uno o dos viajes al predio para EE y EE+SF o PG15 y PG15+SF respectivamente.

No se consideran costos de mano de obra extra por detección de estros ni por suplementación diaria.

## DISCUSIÓN

La hipótesis de trabajo de que una suplementación proteica focalizada ofrecida previo al servicio de IATF mejora la respuesta reproductiva en ovejas con estro inducido en base a PG fue aceptada parcialmente. La respuesta reproductiva mejoró con la suplementación, pero la magnitud global de la misma no fue mayor a la observada en ovejas con estro espontáneo pre-sincronizado.

La suplementación proteica focalizada con harina de soja ofrecida previo al servicio de IA mejoró significativamente la TO, prolificidad y fecundidad de ovejas en estro espontáneo pre-sincronizado, y tuvo un efecto positivo en ovejas con estro inducido con PG, incrementando la TO y prolificidad en niveles que superaron a las ovejas de estro espontáneo sin suplementación (grupo EE), siendo comparables a los observados en ovejas en estro espontáneo suplementadas (grupo EE+SF). Este resultado confirma el impacto de la suplementación focalizada sobre la TO y la prolificidad en ovejas en estro espontáneo tal cual fue reportado previamente (Scaramuzzi et al. 1983; Banchero et al. 2012). Sin embargo, en nuestro conocimiento, este es el primer reporte que asocia una suplementación proteica focalizada previo a un servicio de IATF asociado a un protocolo de sincronización de estros en base a PG (protocolo “largo”; PG15), demostrando el impacto de la nutrición cuando es utilizado este protocolo. Una suplementación proteica focalizada aplicada durante un protocolo corto de separación entre dosis de PG (siete días; protocolo Synchron®) no mejoró los resultados reproductivos luego de la IATF (Fierro et al. 2014), confirmando que el intervalo de separación entre la dosis de PG es importante para mejorar estos resultados (Fierro et al. 2013).

La magnitud de respuesta en mejora de la TO obtenida con la suplementación proteica focalizada sobre el grupo PG15 fue, en términos porcentuales, mayor que la observada en ovejas del grupo EE. Este resultado confirma que para obtener una respuesta ovulatoria adecuada es importante realizar la suplementación entre los Días -8 a -4 antes del momento estimado de ovulación, incrementando así las concentraciones de glucosa, insulina y leptina cuando la selección de los folículos ováricos ovulatorios está por ocurrir (Smith & Stewart, 1990; Downing et al. 1995a; Downing et al. 1995b; Viñoles et al. 2005). Nuestros resultados evidencian que la dispersión estral observada en las ovejas del grupo EE (seis días), parece ser un factor muy importante afectando la TO ovulatoria alcanzada, al menos en el período de suplementación empleado en nuestro trabajo. Aquellas ovejas que consumieron suplemento hasta tres días antes de presentar estro presentaron la mayor respuesta en TO. En este sentido, el uso de un modelo denominado “primera onda follicular” (logrado a través de tres inyecciones de PG cada siete días), fue utilizado para estudiar en forma más precisa (dada la concentración de ovulaciones alcanzada), el efecto de la nutrición durante la fase de desarrollo de los folículos ováricos, tendiendo a incrementar la TO en ovejas de buena CC (1,3 vs. 1,7,  $P=0,07$ ; Viñoles et al. 2010a). Sin embargo, la suplementación proteica focalizada implementada en nuestro ensayo no promovió un incremento significativo en la TO y/o prolificidad de las ovejas del grupo PG+SF en comparación con las ovejas del grupo EE+SF (1,35 vs. 1,30; 1,25 vs. 1,18, TO y prolificidad respectivamente), tal cual se había hipotetizado

ocurriría, debido a una mejor sincronización entre el momento de suplementación y el estado de desarrollo folicular. Una explicación a esto quizás sea que, si bien existió una dispersión de los estros de seis días en el Grupo EE+SF, la gran mayoría de las ovejas mostró estro en tan solo tres días (85% del total en servicio), y casi la mitad de ellas el Día 0 (41% del total en servicio), recibiendo muchas de ellas el suplemento en el momento más adecuado. Por otra parte, efectos negativos reportados del estro inducido con PG sobre el proceso de fertilización, el ambiente uterino, la calidad y la supervivencia de los embriones generados, podrían estar impidiendo la mejora en prolificidad por suplementación esperada en este grupo (revisado por Fierro et al. 2013).

En un principio la TO de las ovejas del grupo EE fue mayor que la del grupo PG15 (1,17 vs. 1,06 respectivamente). Sin embargo, no se observaron finalmente diferencias en prolificidad entre estos grupos de ovejas (1,02 vs. 1,01; grupos EE y PG15 respectivamente). Estudios previos reportan una disminución de la TO y de la prolificidad en ovejas sincronizadas con un protocolo corto de separación entre dosis de PG e IATF (siete días de separación, protocolo Synchrovine®), en comparación con ovejas en estro espontáneo pre-sincronizado (Forichi et al. 2004; Fierro et al. 2011). Sin embargo, no se observaron efectos detrimentales sobre estas variables cuando la dosis de PG fue dada durante la fase lauteal media (Letelier et al. 2011). Este resultado no pudo ser confirmado posteriormente cuando se compararon protocolos cortos, medios o largos de separación entre dosis de PG para realizar IATF (Fierro et al. 2016; Fierro et al. 2017; Fierro & Olivera-Muzante, 2017), quizás porque no se incluyó como grupo control de los experimentos ovejas en estro espontáneo. Teniendo en cuenta el uso potencial en programas de mejora genética de los protocolos de intervalo largo entre dosis de PG para realizar IATF, más investigación en este sentido debería ser realizada para definir con más claridad si afecta o no la prolificidad de la raza en cuestión. Por otro lado, la suplementación proteica focalizada implementada no tuvo impacto sobre el NRR23, la tasa de concepción o de fertilidad en ovejas en estro espontáneo o inducido con PG. Este resultado sugiere que la suplementación focalizada previo al servicio podría mejorar el crecimiento y desarrollo de folículos sensibles a las gonadotropinas en ovejas en buena CC, como en nuestro experimento, genética o metabólicamente más aptas para responder (Juengel et al. 2013; Monniaux, 2016), pero no mejorar el proceso de fertilización en sí mismo, es decir el número de ovejas gestantes, tal cual ya ha sido reportado (Monget & Martin, 1997).

Por último, resulta interesante analizar la comparación reproductiva y económica de los dos métodos de sincronización de estros e IA cervical utilizados en este estudio: la pre-sincronización de estros espontáneos con detección de estros vs. la sincronización con protocolos largos en base a PG asociados a IATF, y su asociación a una suplementación proteica focalizada previo al servicio. Con el mismo costo hormonal de PG (dos inyecciones), pero mayor costo en aspectos relacionados a salarios, alimentación de inseminador y ayudantes, días de renta de carneros de valor genético, gastos de androgenización, tierra de color, etc., el primer método implica además mucho más manejo de las ovejas en el corral - con la consecuente pérdida de estado corporal, horas hombre, y riesgos sanitarios- en comparación con el segundo (seis días de detección dos veces al día de estros e IA vs. un solo día de IATF sin detección de estros). Todo ello sin perder de vista que el segundo método involucra en forma rentada al profesional veterinario (ingreso por jornadas técnicas). Del

análisis realizado resulta claro que en cualquiera de las alternativas planteadas (con o sin suplementación focalizada previa al servicio), los costos totales, por oveja gestante y por cordero potencial obtenido son siempre significativamente inferiores cuando se plantea la sincronización de estros con PG asociados a IATF. Si bien se partiría con esta alternativa de IATF de un menor número de ovejas gestantes y corderos potenciales al primer servicio, estos valores tienden a equipararse luego del servicio de repaso, mejorando aún más la relación insumo/producto (costos por oveja gestante o cordero a ecografía), y disminuyendo los días totales de servicio (19 vs 25 días, IATF y estro espontáneo pre-sincronizado respectivamente). Todo ello sin disminuir, en ninguna de las dos situaciones, los valores aceptados como normales de fertilidad para encarneradas tradicionales de 35 a 40 días de duración (Azzarini, 2000; Bordaberry, Marinho & García Pintos, 2018), e incluso pudiendo mejorar la prolificidad a través de una suplementación proteica focalizada eficiente como se plantea en este trabajo. Si el valor genético de los potenciales corderos obtenidos en el primer servicio es elevado, y no es posible de recuperar durante el servicio de repaso, la alternativa de elección sería la pre-sincronización de los estros espontáneos con detección de estos a pesar de la mayor relación insumo/producto, labor y manejo de ovejas involucrada. De lo contrario consideramos que, si las condiciones del predio lo permiten (escala productiva, organización previa, genética elegida presente y suficiente, etc.), la alternativa de elección a plantear por practicidad y costos sería la sincronización de estros con PG asociados a IATF. En ambas alternativas planteadas, la suplementación proteica focalizada ofrecida a las ovejas incrementó significativamente los resultados reproductivos obtenidos, determinado una mejora potencial del procreo -que se mantendría incluso luego del servicio de repaso-, sin incrementar los costos por cordero observado a la ecografía. A esta mejora reproductiva habría que sumarle el potencial valor genético superior de los corderos obtenidos en el primer servicio, aportados por los carneros seleccionados.

## CONCLUSIONES

- 1) La suplementación proteica focalizada aplicada a ovejas multíparas previo a un servicio de IATF vía cervical utilizando un protocolo de sincronización largo en base a PG incrementa la TO, prolificidad y fecundidad de esa alternativa. La respuesta reproductiva es similar a la obtenida con ovejas en estro espontáneo pre-sincronizado detectado e IA. Esa respuesta reproductiva diferencial se mantendría luego de dos servicios.
- 2) Independientemente del uso de suplementación, la respuesta reproductiva global de ese primer servicio es significativamente mayor cuando se emplean ovejas en estro espontáneo pre-sincronizado. Esas diferencias reproductivas entre métodos de sincronización desaparecen al considerar en forma conjunta la IA más el servicio de repaso con carneros.
- 3) La suplementación proteica focalizada incrementa el número de corderos obtenidos en el primer servicio sin aumentar los costos por cordero producido.
- 4) Con un manejo reproductivo de un día de servicio de IATF y seis de repaso es posible alcanzar, en tan solo 19 días cronológicos de servicio, valores de fertilidad similares a los observados en servicios extendidos en el tiempo de 38 días de duración.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acritopoulou-Fourcroy S, Papas V, Peclaris, G, Zervas N. (1982). Synchronization of oestrus in ewes with Provera sponges/PMSG, prostaglandin F2 $\alpha$  or the prostaglandin analogue, ICI80996, and fertility following natural mating or artificial insemination. *Reprod Nutr Dev* 22:345-354.
2. AOAC. (1984). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 14<sup>a</sup> ed. Arlington, VA.
3. Azzarini M, Ponzoni R. (1971). La fertilidad y fecundidad de las ovejas. En: Azzarini M, Ponzoni R. Aspectos Modernos de la Producción Ovina. Montevideo, Universidad de la República, pp.75-98.
4. Azzarini M. (1992). Reproducción en ovinos en América Latina. Algunos resultados de la investigación sobre los factores determinantes del desempeño reproductivo y su empleo en condiciones de pastoreo. *Prod Ovina* 5:7-56.
5. Azzarini M. (2000). Consideraciones y sugerencias para mejorar los procreos ovinos. Una propuesta para mejorar los procreos ovinos. Boletín de difusión SUL.
6. Baird DT. (1983). Factors regulating the growth of the preovulatory follicle in the sheep and human. *J Reprod Fertil* 69:343-352.
7. Banchemo G, Quintans G. (2005). Alternativas nutricionales y de manejo para aumentar la señalada en la majada en sistemas ganaderos extensivos. En: Seminario de Actualización Técnica: Reproducción Ovina. Serie Actividades de Difusión 401. INIA Treinta y Tres. INIA Tacuarembó, Uruguay, pp.17-31.
8. Banchemo G, Fernández M, Ganzábal A, Vázquez A, Quintans G. (2006). Manejo genético y nutricional para aumentar la tasa mellicera de nuestras majadas. En: XXXIV Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay, pp.71-76.
9. Banchemo G, Vázquez A, Vera M, Quintans G. (2012). Adding condensed tannins to the diet increases ovulation rate in sheep. *Anim Prod Sci* 52:853-856.
10. Bianchi G, Garibotto G, Bentancur O, Menchaca A. (2013). Evaluación de la Raza Finnish Landrace utilizando ovejas Merino Australiano y carneros Poll Dorset. Proyecto INIA FPTA 254. Serie FPTA 52.
11. Boland MP, Lemaingue F, Gordon IR. (1978). Comparison of lambing outcome in ewes after synchronization of oestrus by progestogens or prostaglandin treatment. *J Agric Sci* 91:765-766.
12. Bordaberry S, Marinho P, García Pintos JA. (2018). Diagnósticos de gestación ovina. En: 3° Taller de Gestación Ovina. Sociedad Rural de Durazno. [www.inia.uy/estaciones-experimentales/direcciones-regionales/inia-laestanzuela/iii-taller-de-preñez-en-ovinos](http://www.inia.uy/estaciones-experimentales/direcciones-regionales/inia-laestanzuela/iii-taller-de-preñez-en-ovinos)
13. Cahill LP. (1981). Folliculogenesis in the sheep as influenced by breed, season and oestrus cycle. *J Reprod Fertil Suppl* 30:135-142.
14. Campbell BK, Dobson H, Baird DT, Scaramuzzi RJ. (1999). Examination of the relative role of FSH and LH in the mechanism of ovulatory follicle selection in sheep. *J Reprod Fertil* 117:355-367.

15. Ciappesoni G, Vázquez A, Banchero G, Ganzábal A. (2014). Aumento de la prolificidad en la raza Corriedale: el caso uruguayo. En: 15° Congreso Mundial de Corriedale. 21 y 22, Julio, Buenos Aires, Argentina, pp.9-16.
16. Censo General Agropecuario (2011). En: DIEA 2014. Sitio web: [www.mgap.gub.uy/Diea](http://www.mgap.gub.uy/Diea).
17. Cognié Y, Mariana JC, Thimonier J. (1970). Etude du moment d'ovulation chez la brebis normale ou traitée par un progestagène associé ou non à une injection de PMSG. *An Biol Anim Bioch Bioph* 10:15-24.
18. Colas G, Thimonier J, Courrot M, Ortatavant R. (1973). Fertilité, prolificité et fécondité pendant la saison sexuelle des brebis inseminées artificiellement après traitement à l'acetate de fluorogestone. *Ann de Zootech* 22:441-451.
19. Colas G, Brice G, Guérin Y. (1974). Acquisitions récentes en matière d'insemination artificielle ovine. *Bull Tech Inf Minist Agric* 294:795-800.
20. Davis AJ, Fleet IR, Harrison FA, Walker FMM. (1980). Pulmonary metabolism of prostaglandin F2 $\alpha$  in the conscious non-pregnant ewe and sow. *J Physiol* 301:86.
21. DICOSE. (2015). Sitio web: [www.mgap.gub.uy/DGSG/DICOSE](http://www.mgap.gub.uy/DGSG/DICOSE).
22. DIEA. (2014). Sitio web: [www.mgap.gub.uy/Diea](http://www.mgap.gub.uy/Diea).
23. Downing JA, Scaramuzzi RJ. (1991). Nutrient effects on ovulation rate, ovarian function and the secretion of gonadotrophic metabolic hormones in sheep. *J Reprod Fertil* 43:209-227.
24. Downing JA, Joss J, Connell P, Scaramuzzi R J. (1995a). Ovulation rate and the concentrations of gonadotrophic and metabolic hormones in ewes fed lupin grain. *J Reprod Fertil* 103:137-145.
25. Downing JA, Joss J, Scaramuzzi RJ. (1995b). Ovulation rate and the concentrations of gonadotrophic and metabolic hormones in ewes infused with glucose during the late luteal phase of the oestrous cycle. *J Endocrinol* 146:403-410.
26. Dupont J, Scaramuzzi RJ, Reverchon M. (2014). The effect of nutrition and metabolic status on the development of follicles, oocytes and embryos in ruminants. *Animal* 8(7):1031-1044.
27. Durán del Campo A. (1980). Anatomía, Fisiología de la Reproducción e Inseminación Artificial en Ovinos. Ed. Hemisferio Sur. Montevideo.
28. Durán Hontou G. (1993). Sincronización de celos. En: Manual práctico de Reproducción e Inseminación artificial en Ovinos. Durán del Campo A. Ed. Hemisferio Sur, Uruguay, pp.165-174.
29. Evans G, Maxwell WMC, (1987). Handling and examination of semen. In: Maxwell WMC. Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. Butterworth Press & Co. Ltd., Sydney, Australia, pp.85-104.
30. Fernández Abella D, Formoso D, Lafourcade E, Rodríguez Monza P, Monza J, Aguerre J, Ibáñez W. (2005). Efecto del nivel de oferta de Lotus *uliginosus* cv. Maku previo al servicio sobre la fecundidad ovina. *SUL. Prod Ovina* 17:37-46.
31. Fernández Abella D, Villegas N. (2015). Capítulo VIII. Inseminación Artificial en ovinos. En: Tecnologías reproductivas bovinas y ovinas. Fernández Abella, D. (editor). Ed. Hemisferio Sur. Montevideo, pp.127-151.

32. Fierro S, Olivera J, Gil J, Viñoles C. (2011). Effects of prostaglandin administration on follicular dynamics, conception, prolificacy and fecundity in sheep. *Theriogenology* 76:630-639.
33. Fierro S, Gil J, Viñoles C, Olivera-Muzante J. (2013). The use of prostaglandins in controlling estrous cycle of the ewe: a review. *Theriogenology* 79:399-408.
34. Fierro S, Gil J, Viñoles C, Soca F, Banchemo G, Olivera-Muzante J. (2014). Protein supplementation during a short-interval prostaglandin-based protocol for timed AI in sheep. *Anim Reprod Sci* 149:158-162.
35. Fierro S, Viñoles C, Olivera-Muzante J. (2016). Concentrations of steroid hormones, estrous, ovarian and reproductive responses in sheep estrous synchronized with different prostaglandin-based protocols. *Anim Reprod Sci* 167:74-82.
36. Fierro S, Viñoles C, Olivera-Muzante J. (2017). Long term prostaglandin based-protocols improve the reproductive performance after timed artificial insemination in sheep. *Theriogenology* 90:109-113.
37. Fierro S, Olivera-Muzante J. (2017). Long interval prostaglandin as an alternative to progesterone-eCG based protocols for timed AI in sheep. *Anim Reprod Sci* 180:78-84.
38. Forichi S, Olivera J, Correa M, Gil J, Menchaca A, Rubianes E. (2004). Reproductive response to two different oestrus synchronization protocols using PGF2 $\alpha$  in sheep. *Reprod Fert Dev* 16(4):506.
39. Ganzabal A, Ruggia A, Miquelerena J. (2003). Producción de corderos en sistemas intensivos. Serie de Actividades de Difusión de INIA 342, pp.1-7.
40. Gherardi PB, Lindsay DR. (1982). Response of ewes to lupin supplementation at different times of the breeding season. *Aust J Exp Agric Anim Husb* 22:264-267.
41. Ginther OJ. (2000). Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Anim Reprod Sci* 60-61:61-79.
42. González-Bulnes A, Veiga-López A, García P, García-García RM, Ariznavarreta C, Sanchez MA. (2005). Effects of progestagens and prostaglandin analogues on ovarian function and embryo viability in sheep. *Theriogenology* 63:2523-2534.
43. Gordon I. (1983). Fixed-time sheep artificial insemination. In: *Controlled Breeding in Farms Animal*. Gordon, I. (editor). Prensa de Pergamon, Oxford, IK, pp.197-208.
44. Habibizad K, Riasi A, Kohram H, Rahmani H. (2015). Effect of long-term or short-term supplementation of high energy or high energy-protein diets on ovarian follicles and blood metabolites and hormones in ewes. *Small Rum Res* 132:37-43.
45. Hackett AJ, Langford GA, Robertson HA. (1981). Fertility of ewes after synchronisation of oestrus with a prostaglandin F2 $\alpha$  and artificial insemination. *Theriogenology* 15:599-603.
46. Houghton JAS, Liberati N, Schrick FN, Townsend EC, Dailey RA, Inskeep EK. (1995). Day of estrus cycle affects follicular dynamics after induced luteolysis in ewes. *J Anim Sci* 73:2094-2101.
47. Hsueh AJ, Billing H, Tsafiriri A. (1994). Ovarian follicle atresia: A hormonally controlled apoptotic process. *Endocrinol Rev* 15:707-724.
48. Juengel JL, Davis GH, McNatty KP. (2013). Using sheep lines with mutations in single genes to better understand ovarian function. *Reproduction* 146(4):111-123.

49. Kelly RW, Crocker KP. (1990). Reproductive wastage in Merino flocks in Western Australia: a guide for fundamental research. In: Reproductive Physiology of Merino Sheep. Concepts and consequences. Oldham, CM, Martin GB, Purvis IW (Editores). School of Agriculture (Animal Science). The University of Western Australia. Crawley, WA, pp.1-9.
50. Letelier C, Mallo F, Encinas T, Ros JM, González-Bulnes A. (2008). Glucogenic supply increases ovulation rate by modifying follicle recruitment and subsequent development of preovulatory follicles without effects on ghrelin secretion. *Reproduction* 136:65-72.
51. Letelier CA, Contreras-Solís I, García-Fernández RA, Sánchez MA, García-Palencia P, Sánchez B, Ariznavarreta C, Tresguerres JAF, Flores JM, González-Bulnes A. (2011). Effects of oestrus induction with progestagens or prostaglandin analogues on ovarian and pituitary function in sheep. *Anim Rep Sci* 126:61-69.
52. Leury BJ, Murray PJ, Rowe JB. (1990). Effect of nutrition on the response in ovulation rate in Merino ewes Following short-term lupin supplementation and insulin administration. *Aust J Agric Res* 41:751-759.
53. Lindsay D, Martin G, Williams I. (1993). Nutrition and reproduction. In: Reproduction in Domesticated Animals: World Animal Sciences Series. King GJ (editor). Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp.459-491.
54. Loubser PG, Van Niekerk CH. (1981). Oestrus synchronisation in sheep with progesterone-impregnated (MAP) intravaginal sponges and a prostaglandin analogue. *Theriogenology* 15:547-552.
55. Martemucci G, D'Alessandro AG. (2011). Synchronization of oestrus and ovulation by short time combined FGA, PGF2 $\alpha$ , GnRH, eCG treatments for natural service or AI fixed-time. *Anim Reprod Sci* 123:32-39.
56. Martin GB, Milton J, Davidson R, Banchero-Hunzicker G, Lindsay D, Blache D. (2004). Natural methods for increasing reproductive efficiency in small ruminants. *Anim Reprod Sci* 82-83:231-246.
57. Martin GB, Kadokawa H. (2006). "Clean, green and ethical" animal production. Case study: reproductive efficiency in small ruminants. *J Reprod Dev* 52(1):145-152.
58. McCracken JA, Glew ME, Scaramuzzi RJ. (1970). Corpus luteum regression induced by prostaglandin F2-alpha. *J Clin Endocrinol Metab* 30:544-546.
59. McNeilly A S, Picton H M, Campbell BK, Baird DT. (1991). Gonadotrophic control of follicle growth in the ewe. *J Reprod Fertil* 43:177-186.
60. Menchaca A, Rubianes E. (2004). New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reprod Fertil Dev* 16:403-413.
61. Moller-Holtkamp P. 1980. Conceptual e Iliren dos nuevas hormonas para combatir los trastornos de la reproducción en los animales. En: VIII Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay, pp.5-16.
62. Monget P, Martin GB. (1997). Involvement of insulin-like growth factors in the interactions between nutrition and reproduction in female mammals. *Hum Reprod* 12(1):33-52.

63. Monniaux D. (2016). Driving folliculogenesis by the oocyte-somatic cell dialog: lessons from genetic models. *Theriogenology* 86(1):41-53.
64. Montossi F, Pigurina G, Santamarina I, Berreta E. (2000). Estudios de selectividad animal en diferentes comunidades vegetales de la región de basalto y su importancia práctica en el manejo del pastoreo con ovinos y vacunos. Serie Técnica 113, pp.14-48.
65. NRC (National Research Council) (2007). Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids. Washington, DC: The National Academies Press.
66. Oldham CM, Lindsay DR. (1984). The minimum period of intake of lupin grain required by ewes to increase their ovulation rate when grazing dry summer pasture. In: Reproduction in sheep. Lindsay, D.R., Pearce, D.T. (Ed), Australian Academy of Science Australian Wool Corporation, pp.274-276.
67. Olivera J, Gil J. (2005). Estudio de diferentes alternativas para la sincronización de estros en ovinos: descripción y valorización económica. En: XXXIII Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay, pp.195-196.
68. Olivera-Muzante J, Fierro S, López V, Gil J. (2011a). Comparison of prostaglandin- and progesterone-based protocols for timed artificial insemination in sheep. *Theriogenology* 75:1232-1238.
69. Olivera-Muzante J, Gil J, Fierro S, Menchaca A, Rubianes E. (2011b). Alternatives to improve a prostaglandin-based protocol for timed artificial insemination in sheep. *Theriogenology* 76:1501-1507.
70. Olivera-Muzante J, Gil J, Viñoles C, Fierro S. (2013). Reproductive outcome with GnRH inclusion at 24 or 36 h following a prostaglandin F2 $\alpha$ -based protocol for timed AI in ewes. *Anim Reprod Sci* 138:175-179.
71. Olivera-Muzante J. (2018). Inseminación artificial cervical a tiempo fijo en ovinos empleando análogos de prostaglandina. Olivera-Muzante, J. (Editor). Serie Técnica INIA N° 67. Montevideo, Uruguay.
72. Pearce BHG, McMeniman NP, Gardner IA. (1994). Influence of body condition on ovulatory response to lupin (*Lupinus angustifolius*) supplementation of sheep. *Small Rum Res* 13:27-32.
73. Piper PJ, Vane JR, Wyllie JH. (1970). Inactivation of prostaglandins by the lungs. *Nature* 225:600-604.
74. Rhind SM, McNeilly AS. (1986). Follicle populations, ovulation rates and plasma profiles of FSH, LH and prolactin in Scottish Blackface ewes in high and low levels of body condition. *Anim Reprod Sci* 10:105-115.
75. Rhind SM, McMillen S, McKelvey WA, Rodriguez-Herrejon FF, McNeilly AS. (1989). Effect of the body condition of ewes on the secretion of LH and FSH and the pituitary response to gonadotrophin-releasing hormone. *J Endocrinol* 120:497-502.
76. Rivera C. (2002). Márgenes. En: Costos y Márgenes en Empresas Agropecuarias. Ed. Hemisferio Sur. Montevideo, pp.37-47.
77. Rubianes E, Menchaca A, Gil J, Olivera J. (2004). Reproductive performance of a new Timed Artificial Insemination protocol (Synchrovine™) in sheep. *Reprod Fertil Dev* 16(4):508.

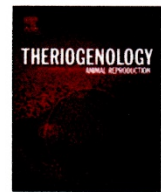
78. Russel AJF, Doney JM, Gunn RG. (1969). Subjective assessment of body fat in live sheep. *J Agric Sci* 72:451-454.
79. SAS Institute Inc. (2000). *SAS Procedures Guide*, Version 9.2, Cary, NC: SAS Institute Inc.
80. Scaramuzzi RJ, Radford HM. (1983). Factors regulating ovulation rate in the ewe. *J Reprod. Fertil* 69:353-367.
81. Scaramuzzi RJ, Adams NR, Baird DT, Campbell BK, Downing JA, Findlay JK, Henderson KM, Martin GB, McNatty KP, McNielly AS, Tsonis CG. (1993). A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reprod Fertil Dev* 5:459-478.
82. Scaramuzzi RJ, Brown HM, Dupont J. (2010). Nutritional and metabolic mechanisms in the ovary and their role in mediating the effect of diet on folliculogenesis: a perspective. *Reprod Domest Anim* 45:32-41.
83. Scaramuzzi RJ, Baird DT, Campbell BK, Driancourt MA, Dupont J, Fortune JF, Gilchrist RB, Martin GB, McNatty KP, McNeilly AS, Monget P, Monniaux D, Viñoles C, Webb R. (2011). Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. *Reprod Fertil Dev* 23:444-467.
84. Smith JF. (1985). Protein, energy and ovulation rate. In: *Genetics of Reproduction in sheep*. Land, R.B.; Robinson DW (Editor). New Zealand Ministry of Agriculture and Fisheries Research, pp.349-359.
85. Smith AJ, Stewarth RD. (1990). Effects of nutrition on the ovulation rate of ewes. In: *Reproductive Physiology of Merino Sheep. Concepts and consequences*. Oldham CM, Martin GB, Purvis IW (Editores). School of Agriculture (Animal Science). The University of Western Australia. Crawley, WA, pp.85-101.
86. Souza CJ, Campbell BK, Baird DT. (1998). Follicular waves and concentrations of steroids and inhibin a in ovarian venous blood during the luteal phase of the oestrus cycle in ewes with an ovarian autotransplant. *J Endocrinol* 156:563-572.
87. Stewarth R, Oldham CM. (1986). Feeding lupins to ewes for four days during the luteal phase can increase ovulation rate. *Proc Aust Soc Anim Prod* 16:367-370.
88. Teleni E, Rowe JB, Croker KP, Murray PJ, King WR. (1989). Lupins and energy-yielding nutrients in ewes. II. Responses in ovulation rate in ewes to increased availability of glucose, acetate and amino acids. *Reprod Fertil Dev* 1:117-125.
89. Vilariño M, Cuadro F, dos Santos-Neto PC, García-Pintos C, Menchaca A. (2017). Time of ovulation and pregnancy outcomes obtained with the prostaglandin-based protocol Synchrovine for FTAI in sheep. *Theriogenology* 90:163-168.
90. Viñoles C, Rubianes E. (1998). Origin of the preovulatory follicle after induced luteolysis during the early luteal phase in ewes. *Can J Anim Sci* 78:429-431.
91. Viñoles C, Meikle A, Forsberg M, Rubianes E. (1999). The effect of subluteal levels of exogenous progesterone on follicular dynamics and endocrine patterns during early luteal phase of the ewe. *Theriogenology* 51:1351-1361.
92. Viñoles C, Forsberg M, Banchero G, Rubianes E. (2001). Effect of long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. *Theriogenology* 55(4):993-1004.

93. Viñoles C, Forsberg M, Banchero G, Rubianes E. (2002). Ovarian follicular dynamics and endocrine profiles in Polwarth ewes with high and low body condition. *Anim Sci* 74:539-545.
94. Viñoles C. (2003). Effect of nutrition on follicle development and ovulation rate in the ewe. *Veterinaria* 165. Tesis Doctoral. Swedish University of Agricultural Science, Uppsala, Suecia.
95. Viñoles C, Forsberg M, Martín GB, Cajarville C, Repetto J, Meikle A. (2005). Short-term nutritional supplementation of ewes in low body condition affects follicle development due to an increase in glucose and metabolic hormones. *Reproduction* 129(3):299-309.
96. Viñoles C, Quadrelli R, Marinho P, Bareille S, Driancourt M. (2006). El agregado de antibióticos disminuye la cantidad de mucus y el olor de las esponjas al finalizar el tratamiento. En: XXXIV Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay, pp. 211-212.
97. Viñoles C, Meikle A, Martin B. (2009). Short-term nutritional treatments grazing legumes or feeding concentrates increase prolificacy in Corriedale ewes. *Anim Reprod Sci* 113:82-92.
98. Viñoles C, Paganoni B, Glover KMM, Milton JTB, Blache D, Blackberry MA, Martin GB. (2010a). The use of a 'first-wave' model to study the effect of nutrition on ovarian follicular dynamics and ovulation rate in the sheep. *Reproduction* 140:865-874.
99. Viñoles C, González de Bulnes A, Martin GB, Sales F, Sale S. (2010b). Sheep and Goats. In: *Atlas of Ruminant and Camelid Reproductive Ultrasonography*. Ed: Luc DesCoteaux, Jill Colloton and Giovanni Gnemi. Wiley-Blackwell: Ames, Iowa, USA. 11, pp.181-210.
100. Viñoles C, Paganoni B, Milton JTB, Driancourt MA, Martin GB. (2011). Pregnancy rate and prolificacy after artificial insemination in ewes following synchronization with prostaglandin, sponges or sponges with bactericide. *Anim Prod Sci* 51:565-569.
101. Williams SA, Blanche D, Martin GB, Foot R, Blackberry MA, Scaramuzzi RJ. (2001). Effect of nutritional supplementation on quantities of glucose transporters 1 and 4 in sheep granulosa and theca cells. *Reproduction* 122:947-956.
102. Xu ZZ, McDonald MF, McCutcheon SN. (1989). The effects of nutritionally-induced liveweight differences on follicular development, ovulation rate, oestrus activity and plasma follicle stimulating hormone levels in the ewe. *Anim Reprod Sci* 19:67-78.

## ANEXOS

### Publicación I.

“Short term protein supplementation during a long interval prostaglandin-based protocol for timed AI in sheep”. Errandonea et al. 2018. *Theriogenology* 114. 34-39.



## Short term protein supplementation during a long interval prostaglandin-based protocol for timed AI in sheep

N. Errandonea<sup>a</sup>, S. Fierro<sup>b</sup>, C. Viñoles<sup>c</sup>, J. Gil<sup>d</sup>, G. Banchemo<sup>e</sup>, J. Olivera-Muzante<sup>f,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Reproducción Animal "Dr. Alfredo Ferraris", Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Ruta 3 km 363, 60000, Paysandú, Uruguay

<sup>b</sup> Secretariado Uruguayo de la Lana (S.U.L.), Área de Transferencia de Tecnología, Serbando Gómez 2408, 12100, Montevideo, Uruguay

<sup>c</sup> Polo Agroforestal, EEBR, Universidad de la República, Ruta 26 km 408, Cerro Largo, Uruguay

<sup>d</sup> Laboratorio de Reproducción Animal "Dr. Alfredo Ferraris", Polo Producción Reproducción de Rumiantes, Facultad de Veterinaria, EEMAC, Universidad de la República, Ruta 3 km 363, 60000, Paysandú, Uruguay

<sup>e</sup> Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Programa Nacional de Carne y Lana, Ruta 50 km 12, Colonia, Uruguay

<sup>f</sup> Laboratorio de Reproducción Animal "Dr. Alfredo Ferraris", Departamento de Ovinos, Lanas y Caprinos, Facultad de Veterinaria, EEMAC, Universidad de la República, Ruta 3 km 363, 60000, Paysandú, Uruguay

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 14 November 2017

Received in revised form

23 February 2018

Accepted 14 March 2018

Available online 21 March 2018

#### Keywords:

Prostaglandin

Focus feeding

Timed artificial insemination

Fertility

Ewe

### ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the reproductive impact of a short-term protein supplementation on a long interval prostaglandin-based protocol (two PG injections 15 d apart; PG15) for timed artificial insemination in sheep. During the breeding season, 437 multiparous Merino ewes grazing native pastures (forage allowance of 6 kg of dry matter/100 kg of live weight; crude protein: 10.8%, metabolic energy: 2.1 Mcal/kg of dry matter) were selected. Ewes were allocated, according to body condition score ( $3.2 \pm 0.2$ ) and body weight ( $40.6 \pm 4.9$  kg, mean  $\pm$  SD), to a  $2 \times 2$  factorial design: type of estrus –spontaneous estrus (SE) or induced with PG15 (PG15)–, and supplementation (yes or no) before insemination (+FF; soybean meal at Days –10 to –3; crude protein: 51.9%, metabolic energy: 2.8 Mcal/kg of dry matter; average consumption 0.9% live weight/ewe/day of dry matter). All ewes were cervically artificial inseminated (Day –2 to –3 in SE ewes at estrus detection; Day 0 = timed artificial insemination in PG15 ewes). Ovulation rate on Day 7, non-return to service on Day 23, conception, fertility, prolificacy and fecundity on Day 60 were evaluated. Ovulation rate ( $1.17 \pm 0.40$  vs.  $1.06 \pm 0.25$ ), non-return to service at Day 23 (81.7 vs. 64.2%), conception (78.8 vs. 61.5%), fertility (75.2 vs. 61.5%) and fecundity (0.77 vs. 0.62) were higher in ewes from SE than PG15 group ( $P < 0.05$ ). However, no differences were observed in prolificacy ( $1.02 \pm 0.16$  vs.  $1.01 \pm 0.12$ ) between groups ( $P > 0.05$ ). Protein supplementation increased ovulation rate ( $1.30 \pm 0.45$  vs.  $1.17 \pm 0.40$ ), prolificacy ( $1.18 \pm 0.39$  vs.  $1.02 \pm 0.16$ ) and fecundity (0.94 vs. 0.77%;  $P < 0.05$ ), but not non-return to service on Day 23 (83.8 vs. 81.7%), conception (82.9 vs. 78.8%) or fertility (79.1 vs. 75.2%;  $P > 0.05$ ) in SE group. The supplement feed to PG15 ewes increased ovulation rate ( $1.35 \pm 0.45$  vs.  $1.06 \pm 0.25$ ), prolificacy ( $1.25 \pm 0.43$  vs.  $1.01 \pm 0.12$ ) and fecundity (0.79 vs. 0.62%;  $P < 0.05$ ) to levels comparable to SE + FF ewes ( $P > 0.05$ ). The magnitude of the increase in ovulation rate in PG15 was greater than in the SE group (27 vs. 11%;  $P < 0.05$ ). However, non-return to service on Day 23 (65.1 vs. 64.2%), conception (63.3 vs. 61.5%), and fertility rate (63.3 vs. 61.5%;  $P < 0.05$ ) remained similar in PG15 supplemented or not supplemented ewes. In conclusion, a short-term protein supplementation before cervical time artificial insemination improved the reproductive performance of ewes synchronized with the PG15 protocol to levels comparable to the SE group.

© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Timed artificial insemination (TAI) represents a practical tool in genetic programs that allows to concentrate the service period and eliminates the need for estrus detection and consequently, a more efficient use of superior males, nutritional resources and labour [1].

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [errandonea.n@gmail.com](mailto:errandonea.n@gmail.com) (N. Errandonea), [sfierro33@gmail.com](mailto:sfierro33@gmail.com) (S. Fierro), [carolina.vinoles@poloagroforestal.edu.uy](mailto:carolina.vinoles@poloagroforestal.edu.uy) (C. Viñoles), [jujogil@gmail.com](mailto:jujogil@gmail.com) (J. Gil), [gbanchero@inia.org.uy](mailto:gbanchero@inia.org.uy) (G. Banchemo), [joliveramuz@gmail.com](mailto:joliveramuz@gmail.com) (J. Olivera-Muzante).

However, it involves hormonal treatments to ensure synchronized ovulation and acceptable pregnancy rates. Nowadays, the application of these biotechnologies under commercial farming conditions requires easy implementation procedures, acceptable reproductive outcomes and low environmental impact [2]. These premises partially exclude the use of conventional TAI protocols involving intravaginal devices impregnated with progestagens plus an im injection of equine chorionic gonadotrophin at its withdrawal (P4-eCG, [3–6]). In this sense, and due to its rapid rate of metabolization [7,8], easiness of application and low cost, prostaglandin represents a more desirable option than P4-eCG based protocol for the reproductive management in sheep [4,9].

Prostaglandin F2 $\alpha$  and its synthetic analogues (PG) are potent luteolytic agents in ruminants previously proposed for TAI [revised by 10]. However, low reproductive outcomes when conventional PG based protocols are used (9–12 d apart between injections) have discouraged their application [11,12]. Extending the interval between PG injections prolonged the time that pre-ovulatory follicles were exposed to luteal progesterone levels, thus two PG injections administered 14–16 d apart (“long interval”) enhanced the reproductive outcome after TAI [13,14], to pregnancy rates comparable to P4-eCG based protocols [15]. Nevertheless, the ovulation rate (OR), prolificacy and fecundity using long interval PG for TAI may be lower than that obtained after P4-eCG based protocols or spontaneous estrus [16], a factor to be considered in genetic improvement programs. Clean alternatives such as nutrition may be an option to improve the OR associated to long interval PG-based protocols for TAI in sheep.

Short-term nutritional treatments (“focus feeding”) improve OR in ewes [17–20], due to an increase in the nutrient flux that acts directly at the ovary to stimulate growth and development of gonadotropin sensitive follicles [21–25]. Acute nutritional treatments induce dynamic changes in the metabolic homeostatic systems, and over the first 3 d of supplementation, the concentrations of glucose, insulin and leptin increase to peak values and decrease thereafter [26,27]. To obtain an adequate reproductive response it is important to offer the supplement at a specific time of the estrous cycle, particularly from Day –8 to –4 before ovulation, when the selection of the ovulatory follicles occurs [18–20]. Low or detrimental responses are observed when focus feeding is applied close to the time of ovulation [17,18]. The use of lupin grain [28], a combination of corn grain and soybean meal [29], or soybean meal with or without condensed tannins [30], administered a week before spontaneous estrus, stimulates an increase of 15–30% in OR and prolificacy in sheep. In these reports, the application of focus feeding was associated to the pre-synchronization of spontaneous estrus with intravaginal progesterone sponges or with two PG injections (9–11 d apart). However, due to the great estrus dispersion of these pre-synchronization treatments (around a week), not all ewes receive the feed at the most effective time [31]. One important uncontrolled variable in most experiments is the timing of supplement administration associated to the stage of follicle growth [27]. Moreover, protein supplementation during a short interval PG TAI protocol (7 d apart Synchrovine®, [32]) did not improve the reproductive outcome in sheep [33], probably due to the negative effects of short interval protocols on follicular development and hormonal profiles [13,16]. Despite the lower estrous synchrony of long interval PG protocols [13], their higher fertility after TAI compared to short interval PG protocols [14], could make them a better option to apply focus feeding and improve OR and prolificacy.

The aim of this experiment was to evaluate the reproductive impact of a short-term protein supplementation before insemination on a long interval PG-based protocol (two PG injections 15 d apart; PG15) for TAI in sheep. We hypothesize that this type of

supplementation improves OR, prolificacy and fecundity of the long interval PG-based protocol, and that the magnitude of the response is higher than that observed in ewes in spontaneous estrus due to the better synchronization between the moment of the supplementation and the status of follicle development.

## 2. Materials and methods

The experiment was carried out during the breeding season (April to June) in a commercial farm (“El Recuerdo”; Artigas-Uruguay, 30° S - 57° W). The experimental procedures were approved by the Animal Ethics Committee of the Faculty of Veterinary-Universidad de la República (Exp: 111400-000079-12).

### 2.1. Animals

Multiparous Merino ewes (2.5–5.5 y old, and at least one parturition; n = 437), accustomed to consuming supplements, with a good body condition score ( $3.2 \pm 0.2$ , mean  $\pm$  SD; scale 0 to 5, [34]) and weighing  $40.6 \pm 4.9$  kg (fasted overnight; NQ&F AD-4406 monitor, Japan) were selected at the beginning of the experiment.

### 2.2. Experimental design

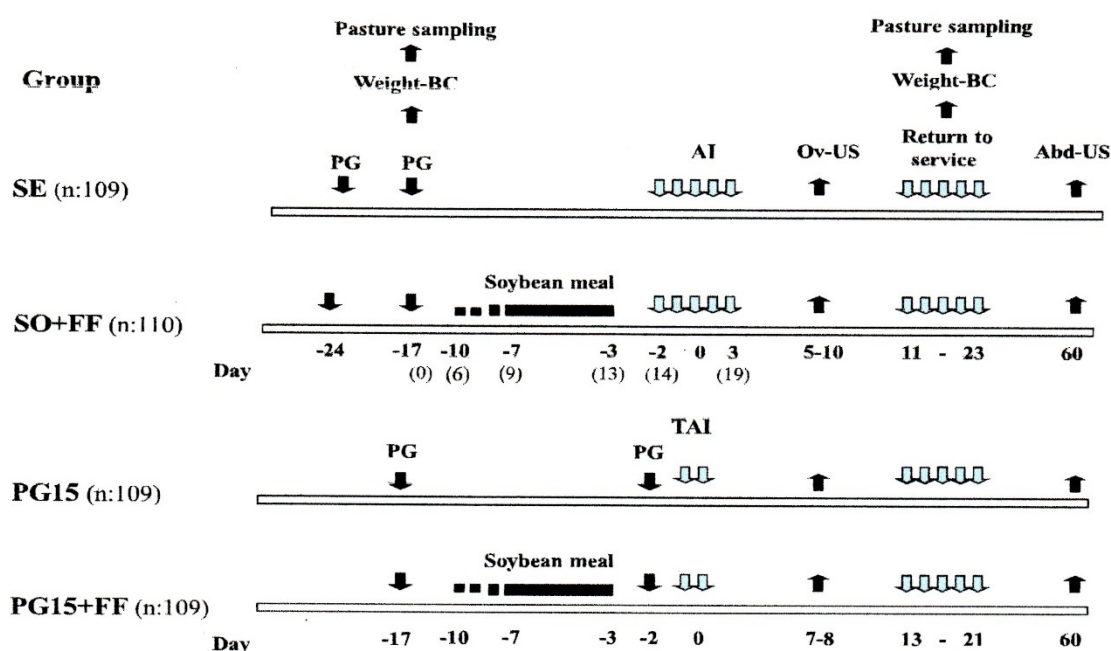
According to body condition score and body weight on Day –17 (Day 0: AI or TAI), ewes were assigned randomly to one of the four groups in a 2  $\times$  2 factorial design: type of estrus -spontaneous or induced with PG-, with or without supplementation. 1) Ewes in spontaneous estrus (SE) that were cervical artificially inseminated (AI) at estrus detection: Group SE (n = 109); 2) ewes in SE plus focus feeding (+FF) with soybean meal for 8 days (Days –10 to –3; Day 0: estimated date of peak of spontaneous estrus and AI;  $\approx$  Days 6–13 of induced previous estrous cycle): Group SE + FF (n = 110); 3) ewes in induced estrus with two PG injections 15 d apart (PG15) and cervical timed AI (TAI: Day 0): Group PG15 (n = 109); 4) ewes synchronized by PG15 plus FF with soybean meal for 8 days before the day of the second PG injection (Days –10 to –3 of the expected estrus): Group PG15 + FF (n = 109). A schematic representation of the experimental design is shown in Fig. 1.

### 2.3. Estrus synchronization protocols

Ewes of SE groups (SE and SE + FF) were pre-synchronized with two PG injections given 7 d apart on Day –24 and –17 respectively (D-L Cloprostenol im, 125  $\mu$ g per injection, Estrumate®, Schering-Plough, Germany) to obtain a high number of ewes in spontaneous estrus in a short period of time, and then AI these. Estrous behavior was detected twice a day (from 17:00 to 07:00 the following morning and from 8:00 to 15:00 h) during 6 d (Days –2 to 3; Day 0: estimated date of peak of estrus and AI;  $\approx$  Day 14–19 of the induced previous estrous cycle), with androgenized painted wethers (testosterone cyclopropionate 100 mg/week/wether 3x; Testosterona Ultra Fuerte®, Laboratorios Dispert, Montevideo, Uruguay) at a rate of 5 wethers/100 ewes. Ewes of PG15 groups were synchronized with two PG injections 15 d apart. To perform the TAI in two d, the first and the second PG injections, thus the beginning and end of the supplementation period (PG15 + FF group) were staged over two consecutive d, giving sub-groups of 55 and 54 ewes/d/group respectively (Fig. 1).

### 2.4. Nutrition management. Feed intake and composition

Pasture availability of experimental parcels were sampled at Day –17 and 23 as described by Banchemo et al. [30]. Pasture and supplements were analyzed for percentage of crude protein (CP),



**Fig. 1.** Experimental design. Group SE: ewes in spontaneous estrus pre-synchronized with two doses of PG and cervical artificial insemination (AI) with fresh pooled semen at estrus detection (Days -2 to 3, Day 0: estimated date of peak of spontaneous estrus and AI;  $\approx$  Days 14–19 of induced previous estrous cycle). Group SE + FF: ewes in SE plus focus feeding with soybean meal for 8 d (Days -10 to -3;  $\approx$  Days 6–13 of induced previous estrous cycle). Group PG15: ewes in induced estrus with two PG injections 15 d apart and cervical TAI (artificial insemination at fixed time; Day 0) with fresh pooled semen. Group PG15 + FF: ewes synchronized by PG15 plus focus feeding with soybean meal during 8 d before the day of the second PG injection (Days -10 to -3 of the expected estrus). Weight: evaluated with an electronic scale on Day -17 and 17 with ewes fasted overnight. BC: body condition score. Pasture sampling: to evaluate pasture availability. Ov-US: ovarian trans-rectal ultrasonography to evaluate ovulation rate. Return to service: assessed by painted rams. Abd-US: trans-abdominal ultrasonography on Day 60 to evaluate conception, fertility and prolificacy.

acid detergent fiber (ADF), neutral detergent fiber (NDF) at the Laboratory of Nutrition of INIA "La Estanzuela", and the content of ME was estimated using the AOAC system [35].

Ewes were maintained under field conditions grazing natural pastures in a paddock of 18 ha with a forage allowance of 6 kg of dry matter/100 kg of live weight (initial availability of 1300 kg/ha of dry matter; CP: 10.8%, ADF: 34.7%, NDF 66.9%, ME: 2.1 Mcal/kg of dry matter), and fresh water available *ad libitum*. Supplemented ewes were separated in a similar parcel of the same paddock during the period of differential feeding. Supplementation was done with pelleted soybean meal (CP: 51.9%, ADF: 9.1%, NDF: 22.2% ME: 2.8 Mcal/kg of dry matter). It was offered gradually from Day 6–8 or -10 to -8 (0.4, 0.6 and 0.9% live weight/ewe/d of dry matter in SO and PG15 group; respectively), reaching the complete amount of supplement on Day 9–13 or -7 to -3 (1.1% live weight/ewe/d of dry matter in SO and PG15 group; respectively); resulting in an average of 0.9% live weight/ewe/day of dry matter for the complete supplementation period. The supplement was given collectively at 8:00 a.m., in a linear feeding trough placed in the paddock, with a feeding front of 0.35 m/ewe. To evaluate supplement consumption, supplemented ewes were identified with a number painted on their flank. All supplemented ewes consumed every day and all supplement was consumed. The estimated average intakes of CP (neglecting pasture selection) between Days 9–13 or -7 to -3 were 141 and 295 g/ewe/d for non-supplemented and supplemented groups in SE and PG15 group; respectively. To calculate CP intake, we assumed that the ewes would eat 3.1–3.2% of dry matter as percentage of their body weight [30,36]. The estimated CP and ME consumed by the ewes of all groups out of supplementation period were within the levels described for maintenance–moderate gain by the NRC [36].

## 2.5. Semen collection, evaluation and dilution

Every AI d semen was collected from 5 Merino Dohne adult rams (checked for normal breeding soundness) using an artificial vagina and assessed as described by Evans and Maxwell [12]. Two consecutive ejaculates from each ram were collected, evaluated for approval (>80% subjective progressive motility) and pooled according to the individual sperm concentration, so that each ram contributed with similar number of spermatozoa to the pool. Soon after pooling, semen was extended with UHT skim milk with antibiotic (enrofloxacin 250 mg/L, Baytril® 10%, Bayer, Uruguay) to the final sperm concentration. Extended semen was maintained at room temperature and protected from sunlight until AI. In each day of AI, the same semen pool was used for ewes of all groups.

## 2.6. AI procedures

Cervical insemination was randomly performed using a speculum equipped with a light source and an insemination gun (Walmur® Veterinary Instruments, Montevideo, Uruguay) by two teams of technicians, as described by Evans and Maxwell [12]. The insemination dose was 0.15 cc, containing a means of  $160 \times 10^6$  spermatozoa that were slowly released as deep as possible into the cervix. Ewes of PG15 groups were inseminated at a fixed time ( $56 \pm 1.5$  h after second PG injection, [13]), at the same time of ewes of SE groups of these d.

## 2.7. Estrus and ovarian response, non-return and fertility measurements

Estrus response in SE groups (ewes in estrus/total ewes in service  $\times$  100) was calculated. Ovulated ewes (ewes that ovulated/total ewes in service  $\times$  100), and OR (number of CL/ovulated ewe) were

evaluated on Day 5–10 or Day 7–8 in SE or PG15 groups respectively, by transrectal ultrasonography (7.5 MHz linear array, ALOKA SSD-500, Overseas Monitor Corp. Ltd., Tokyo, Japan) as described by Viñoles et al. [37]. Non-return rate to service on Day 23 (ewes no returning to service/inseminated ewes  $\times$  100; NRR23) was assessed from Day 11–23 by painted Merino Dohne rams (3 rams/100 ewes). Conception (pregnant/inseminated ewes  $\times$  100), fertility (pregnant/total ewes in service  $\times$  100), prolificacy (fetuses/pregnant ewe), and fecundity (fetuses/ewe in service) were evaluated on Day 60 by transabdominal ultrasonography using a 3.5 MHz convex array transducer and the same ultrasound.

## 2.8. Statistical analyses

The effect of “Day of AI” on the reproductive outcome of the sub-groups of ewes was considered. Categorical data was analyzed by logistic regression using the Genmod procedure in SAS (SAS 9.2V; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), considering a binary response (0 and 1 for NRR23, conception or pregnancy rate, or 1 -single- and 2 -multiple- for OR and prolificacy), and the treatment as the explanatory variable; ANOVA was used to analyze the effect of supplementation on live weight and body condition. Data of live weight, body condition, OR and prolificacy is presented as means  $\pm$  SD, while data of estrous response, ovulated ewes, NRR23, conception and fertility is presented as percentage. Differences were considered significant if  $P < 0.05$  and trends if  $0.05 > P > 0.1$ .

## 3. Results

Ten ewes from SE groups (4.6 and 4.5%, SE and SE + FF; respectively) were not detected in estrus therefore not inseminated; four of them (1.8 and 1.7%, SE and SE + FF respectively) did not ovulate. All the ewes from the PG15 groups ovulated. The live weight and body condition score of ewes did not change throughout the experiment ( $40.6 \pm 4.9$  vs.  $41.4 \pm 4.8$ ;  $3.2 \pm 0.2$  vs.  $3.2 \pm 0.2$ , Day -17 and 17 respectively), remaining similar within and between groups ( $P > 0.05$ ). A “Day of AI” effect was not observed in the reproductive outcome of each sub-group of ewes, therefore the data of the different days was pooled for each group.

Ovulation rate, NRR23, conception, fertility and fecundity were higher in ewes from SE than PG15 group ( $P < 0.05$ ). However, no significant differences were observed in prolificacy between these groups ( $P > 0.05$ ; Table 1). Protein supplementation increased OR, prolificacy and fecundity ( $P < 0.05$ ), but not NRR23, conception or fertility in SE group ( $P > 0.05$ ). Ovulation rate in ewes of the SE + FF group decreased as we moved away from Day 0 (1.17,  $n = 6$ ; 1.27,  $n = 26$ ; 1.38,  $n = 45$ ; 1.27,  $n = 22$ ; 1.20,  $n = 5$ ; 1.0,  $n = 4$ ; Day -2 to 3

respectively;  $P > 0.05$ ). The supplement feed to PG15 ewes increased OR, prolificacy and fecundity to levels comparable to that of SE + FF ewes ( $P > 0.05$ ). The magnitude of the increase in OR in PG15 was greater than in the SE group (27 vs. 11%;  $P < 0.001$ ). However, NRR23, conception, and fertility rate remained similar between PG15 and PG15 + FF ewes ( $P > 0.05$ ).

## 4. Discussion

The hypothesis that a short-term protein supplementation before AI improves the reproductive performance of a long interval PG-based protocol for TAI (PG15) was partially accepted. The reproductive performance of ewes in the PG 15 group was improved, but the magnitude of the global response was not greater than that observed in the ewes of the SE group.

Short-term protein supplementation with soybean meal offered before AI significantly improved OR, prolificacy and fecundity of ewes in SE group, and had a positive effect on ewes of the PG15 group, such that increased OR and prolificacy to levels that overcome the SE group and were comparable to the SE + FF group. This result confirms the reported impact of focus feeding on OR and prolificacy in spontaneous estrus ewes [28–30]. Nevertheless, to our knowledge, this is the first report that associates a short-term protein supplementation before AI with a PG-based protocol for TAI and shows the impact of nutrition when applying the PG15 protocol. Short-term protein supplementation during a short interval PG protocol (7 d apart) did not improve the reproductive outcome in sheep after TAI [33], confirming that the length of the interval between PG injections is important to improve this performance [10].

The magnitude of the response in OR obtained with focus feeding in the PG15 group was greater than that observed in ewes from the SE group. This result confirms that to obtain an adequate ovulatory response it is important to offer the supplement from Day -8 to -4 before ovulation, increasing the concentrations of glucose, insulin and leptin when the selection of the ovulatory follicles occurs [18–20,27]. Our results show that the estrus dispersion observed in ewes from the SE group (6 d), appears to be an important factor affecting the OR achieved, at least associated to an 8-d supplementation period. In this sense, the use of a ‘first-wave’ model (3 PG injections 7 d apart) to study the effect of nutrition during the growing phase of the follicles, tended to increase OR in ewes with high body condition (1.3 vs. 1.7,  $P = 0.07$ ; [31]). However, focus feeding did not promote a significant increase in prolificacy or fecundity of ewes in the PG15 group in comparison with ewes of the SE group. Negative effects of the induction of the estrus with PG on the fertilization process, uterine environment,

**Table 1**

Reproductive performance in multiparous Merino ewes in spontaneous or prostaglandin induced estrus, with or without supplementation with soybean meal before cervical artificial insemination (AI) with fresh pooled semen.

| Group (n)       | OR                           | NRR23 (%)         | Conception (%)    | Fertility (%)     | Prolificacy                  | Fecundity          |
|-----------------|------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------------------|--------------------|
| SE (109)        | 1.17 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup> | 81.7 <sup>a</sup> | 78.8 <sup>a</sup> | 75.2 <sup>a</sup> | 1.02 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup> | 0.77 <sup>a</sup>  |
| SE + FF (110)   | 1.30 $\pm$ 0.45 <sup>b</sup> | 83.8 <sup>a</sup> | 82.9 <sup>a</sup> | 79.1 <sup>a</sup> | 1.18 $\pm$ 0.39 <sup>b</sup> | 0.94 <sup>b</sup>  |
| PG15 (109)      | 1.06 $\pm$ 0.25 <sup>c</sup> | 64.2 <sup>b</sup> | 61.5 <sup>b</sup> | 61.5 <sup>b</sup> | 1.01 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup> | 0.62 <sup>c</sup>  |
| PG15 + FF (109) | 1.35 $\pm$ 0.48 <sup>b</sup> | 65.1 <sup>b</sup> | 63.3 <sup>b</sup> | 63.3 <sup>b</sup> | 1.25 $\pm$ 0.43 <sup>b</sup> | 0.79 <sup>ab</sup> |

Group SE: ewes in pre-synchronized spontaneous estrus and cervical AI with fresh pooled semen at estrus detection (Days -2 to 3, Day 0: estimated date of peak of spontaneous estrus and AI;  $\approx$  Days 14–19 of induced previous estrous cycle). Group SE + FF: ewes in SE plus focus feeding with soybean meal during 8 d (Days -10 to -3:  $\approx$  Days 6–13 of induced previous estrous cycle). Group PG15: ewes in induced estrus with two PG injections 15 d apart and cervical time insemination with fresh pooled semen. Group PG15 + FF: ewes synchronized by PG15 plus focus feeding with soybean meal during 8 d before the day of the second PG injection (Days -10 to -3 of the expected estrus). OR: ovulation rate measurement by trans-rectal ultrasonography on Day 5–10 or 7–8 in spontaneous estrus or PG15 groups; respectively (number of CL/ovulated ewe). NRR23: non-return rate to service between Day 11 and 23 assessed by painted rams (ewes no returning to service/inseminated ewes  $\times$  100). Conception (pregnant/inseminated ewes  $\times$  100), fertility (pregnant/total ewes in service  $\times$  100), prolificacy (fetuses/pregnant ewe), and fecundity (fetuses/ewe in service) evaluated on Day 60 by trans-abdominal ultrasonography. Data of OR and prolificacy are presented as means  $\pm$  SD; NRR23, conception and fertility are presented as percentage. In the same column <sup>a</sup>vs. <sup>b</sup>,  $P < 0.05$ . <sup>ab</sup>,  $P = 0.09$ .

embryo quality and its survival, could have impeded the improvement in prolificacy that is frequently achieved with focus feeding [revised by Ref. [10]].

Initially, OR in ewes from the SE group was higher than in those from the PG15 group. However, no differences in prolificacy were finally observed between these groups. Previous studies reported a decrease in OR and prolificacy in ewes synchronized with a short interval PG TAI protocol in comparison with ewes in spontaneous estrus [16,38], but no detrimental effect was observed when PG was given during the mid-luteal phase [39]. This observation could not be confirmed later when comparing short, mid or long interval PG TAI protocols [13–15], probably because ewes in spontaneous estrus were not used as the control group. Considering the potential use of long interval PG TAI protocols in genetic improvement programs, more research is necessary to elucidate this practical aspect. On the other hand, a short-term protein supplementation had no impact on NRR23, conception, or fertility rate of spontaneous or PG induced estrus ewes. This result suggests that focus feeding before service would improve growth and development of the gonadotropin sensitive follicles only in ewes in good body condition -like our experiment-, genetically or metabolically more suitable to respond [40,41], but not the fertilization process itself as it has been reported before [42].

Finally, it is interesting to compare the two-estrus synchronization and AI methods used in this study: pre-synchronization with detection of spontaneous estrus and AI or PG15 associated with TAI. With the same hormonal cost, the first would have more handling of ewes and labour, and sanitary risk than the second one (6 d of estrus detection and AI vs. only one TAI d without estrus detection). Considering the reproductive outcomes of our experiment, and the extra cost associated to several days of AI (assistant and inseminator salaries, rent of rams, travel and food expenses, etc.), the total cost (47%), the cost per pregnant ewe (20%), and the cost per lamb (22%) would be lower (on average for the situations without or with focus feeding) for PG15 and TAI than for ewes in spontaneous estrus [for assumptions see ref. [43]]. Nevertheless, the number of lambs weaned (17%), and the financial gain associated to their sale (10%) would be on average lower for the PG15 group than the SE group. To apply a reproductive system management in commercial flocks all these factors should be considered.

## 5. Conclusion

A short-term protein supplementation before cervical TAI with fresh semen improved OR, prolificacy and fecundity of the PG15 protocol as effectively as it occurred in ewes in spontaneous estrus.

## Conflicts of interest

The authors have no conflict of interest to declare.

## Acknowledgements

The authors thank to Paula Ortíz, Eloisa Osos, Martín Hitateguy, Martín Claramunt, Florencia Buroni, Damian González and Luis Albarenga for the help with the field work and processing of records. We acknowledge to 'El Recuerdo' farm (Errandonea-López family) for their support with animals and resources, and to Laboratory of Nutrition of INIA "La Estanzuela" by quality analysis. This work was supported by Laboratory of Animal Reproduction "Dr. Alfredo Ferraris" and Faculty of Veterinary, Universidad de la República. Paysandú, Uruguay.

## References

- [1] Menchaca A, Rubianes E. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reprod Fertil Dev* 2004;16:403–13.
- [2] Martin GB, Ferasyi TR. Clean, green, ethical (CGE) management: what research do we really need? *Int J Trop Vet Biomed Res* 2016;1(1):1–9.
- [3] González-Bulnes A, Veiga-López A, García P, García-García RM, Ariznavarreta C, Sánchez MA, Tresguerres JAF, Cocero MJ, Flores JM. Effects of progestagens and prostaglandin analogues on ovarian function and embryo viability in sheep. *Theriogenology* 2005;63(9):2523–34.
- [4] Contreras-Solis I, Vásquez B, Díaz T, Letelier C, López Sebastián A, González Bulnes A. Efficiency of estrous synchronization in tropical sheep by combining short-interval cloprostenol-based protocols and "male effect". *Theriogenology* 2009;71:1018–25.
- [5] Martemucci G, D'Alessandro AG. Synchronization of oestrus and ovulation by short time combined FGA, PGF<sub>2α</sub>, GnRH, eCG treatments for natural service or AI fixed-time. *Anim Reprod Sci* 2011;123:32–9.
- [6] Viñoles C, Paganoni B, Milton JTB, Driancourt MA, Martin GB. Pregnancy rate and prolificacy after artificial insemination in ewes following synchronization with prostaglandin, sponges or sponges with bactericide. *Anim Prod Sci* 2011;51:565–9.
- [7] Piper PJ, Vane JR, Wyllie JH. Inactivation of prostaglandins by the lungs. *Nature* 1970;225:600–4.
- [8] Davis AJ, Fleet IR, Harrison FA, Walker FMM. Pulmonary metabolism of prostaglandin F<sub>2α</sub> in the conscious non-pregnant ewe and sow. *J Physiol* 1980;301:86.
- [9] Abecia JA, Forcada F, González-Bulnes A. Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Anim Reprod Sci* 2012;130:173–9.
- [10] Fierro S, Gil J, Viñoles C, Olivera-Muzante J. The use of prostaglandins in controlling estrous cycle of the ewe: a review. *Theriogenology* 2013;79:399–408.
- [11] Gordon I. Fixed-time sheep artificial insemination. In: Gordon I, editor. *Controlled breeding in farm animals*. Oxford: Pergamon Press; 1983. p. 197–208.
- [12] Evans G, Maxwell WMC. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Sydney: Butterworths Press; 1987.
- [13] Fierro S, Viñoles C, Olivera-Muzante J. Concentrations of steroid hormones, estrous, ovarian and reproductive responses in sheep estrous synchronized with different prostaglandin-based protocols. *Anim Reprod Sci* 2016;167:74–82.
- [14] Fierro S, Viñoles C, Olivera-Muzante J. Long term prostaglandin based-protocols improve the reproductive performance after timed artificial insemination in sheep. *Theriogenology* 2017;90:109–13.
- [15] Fierro S, Olivera-Muzante J. Long interval prostaglandin as an alternative to progesterone-eCG based protocols for timed AI in sheep. *Anim Reprod Sci* 2017;180:78–84.
- [16] Fierro S, Olivera-Muzante J, Gil J, Viñoles C. Effects of prostaglandin administration on follicular dynamics, conception, prolificacy and fecundity in sheep. *Theriogenology* 2011;76:630–9.
- [17] Stewart R, Oldham CM. Feeding lupins to ewes for four days during the luteal phase can increase ovulation rate. *Proc Aust Soc Anim Prod* 1986;16:367–70.
- [18] Smith AJ, Stewart RD. Effects of nutrition on the ovulation rate of ewes. In: Oldham CM, Martin GB, Purvis IW, editors. *Reproductive physiology of Merino sheep*. Crawley, WA: School of Agriculture (Animal Science), University of Western Australia; 1990. p. 85–101.
- [19] Downing JA, Joss J, Connell P, Scaramuzzi RJ. Ovulation rate and the concentrations of gonadotrophic and metabolic hormones in ewes fed lupin grain. *J Reprod Fertil* 1995a;103:137–45.
- [20] Downing JA, Joss J, Scaramuzzi RJ. Ovulation rate and the concentrations of gonadotrophic and metabolic hormones in ewes infused with glucose during the late luteal phase of the oestrous cycle. *J Endocrinol* 1995b;146:403–10.
- [21] Muñoz-Gutiérrez M, Blache D, Martin GB, Scaramuzzi RJ. Folliculogenesis and ovarian expression of mRNA encoding aromatase in anoestrous sheep after 5 days of glucose or glucosamine infusion or supplementary lupin feeding. *Reproduction* 2002;124:721–31.
- [22] Muñoz-Gutiérrez M, Blache D, Martin GB, Scaramuzzi RJ. Ovarian follicular expression of mRNA encoding the type I IGF receptor and IGF-binding protein-2 in sheep following five days of nutritional supplementation with glucose, glucosamine or lupins. *Reproduction* 2004;128:747–56.
- [23] Muñoz-Gutiérrez M, Findlay PA, Adam CL, Wax G, Campbell BK, Kendall NR, Khalid M, Forsberg M, Scaramuzzi RJ. The ovarian expression of mRNAs for aromatase, IGF-I receptor, IGF-binding protein-2, -4 and -5, leptin and leptin receptor in cycling ewes after three days of leptin infusion. *Reproduction* 2005;130:869–81.
- [24] Scaramuzzi RJ, Brown HM, Dupont J. Nutritional and metabolic mechanisms in the ovary and their role in mediating the effects of diet on folliculogenesis: a perspective. *Reprod Domest Anim* 2010;45(3):32–41.
- [25] Scaramuzzi RJ, Baird DT, Campbell BK, Driancourt MA, Dupont J, Fortune JF, Gilchrist RB, Martin GB, McNatty KP, McNeilly AS, Monger P, Monniaux D, Viñoles C, Webb R. Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. *Reprod Fertil Dev* 2011;23:444–67.
- [26] Teleni E, King WR, Rowe JB, McDowell GH. Lupins and energy-yielding nutrients in ewes. I. Glucose and acetate biokinetics and metabolic hormones in sheep fed a supplement of lupin grain. *Aust J Agric Res* 1989;40:913–24.

- [27] Viñoles C, Forsberg M, Martin GB, Cajarville C, Repetto J, Meikle A. Short-term nutritional supplementation of ewes in low body condition affects follicle development due to an increase in glucose and metabolic hormones. *Reproduction* 2005;129:299–309.
- [28] Scaramuzzi RJ, Radford HM. Factors regulating ovulation rate in the ewe. *J Reprod Fertil* 1983;69:353–67.
- [29] Viñoles C, Meikle A, Martin GB. Short-term nutritional treatments grazing legumes or feeding concentrates increase prolificacy in Corriedale ewes. *Anim Reprod Sci* 2009;113:82–92.
- [30] Banchero G, Vázquez A, Vera M, Quintans G. Adding condensed tannins to the diet increases ovulation rate in sheep. *Anim Prod Sci* 2012;52:853–6.
- [31] Viñoles C, Paganoni B, Glover KMM, Milton JTB, Blache D, Blackberry MA, Martin GB. The use of a 'first-wave' model to study the effect of nutrition on ovarian follicular dynamics and ovulation rate in the sheep. *Reproduction* 2010a;140:865–74.
- [32] Rubianes E, Menchaca A, Gil J, Olivera J. Reproductive performance of a new timed artificial insemination protocol (Synchrovine®) in sheep. *Reprod Fertil Dev* 2004;16:508.
- [33] Fierro S, Gil J, Viñoles C, Soca F, Banchero G, Olivera-Muzante J. Protein supplementation during a short-interval prostaglandin-based protocol for timed AI in sheep. *Anim Reprod Sci* 2014;149(3–4):158–62.
- [34] Russel AJF, Doney JM, Jun RG. Subjective assessment of body fat in live sheep. *J Agric Sci* 1969;72:451–4.
- [35] AOAC. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists, fourteenth ed. 1984. Arlington, VA.
- [36] NRC (National Research Council). Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids, and new world camelids. Washington, DC: The National Academies Press; 2007. <https://doi.org/10.17226/11654>.
- [37] Viñoles C, González de Bulnes A, Martin GB, Sales F, Sale S. Sheep and goats. In: DesCoteaux L, Colloton J, Gnemi G, editors. Atlas of ruminant and camelid reproductive ultrasonography. Ames, Iowa, USA: Wiley-Blackwell; 2010. p. 181–210.
- [38] Forichi S, Olivera J, Correa M, Gil J, Menchaca A, Rubianes E. Reproductive response to two different oestrus synchronization protocols using PGF2 $\alpha$  in sheep. *Reprod Fertil Dev* 2004;16(4):506.
- [39] Letelier CA, Contreras-Solis I, García-Fernández RA, Sánchez MA, García-Palencia P, Sánchez B, Ariznavarreta C, Tresguerres JAF, Flores JM, González-Bulnes A. Effects of oestrus induction with progestagens or prostaglandin analogues on ovarian and pituitary function in sheep. *Anim Reprod Sci* 2011;126:61–9.
- [40] Juengel JL, McNatty KP. Using sheep lines with mutations in single genes to better understand ovarian function. *Reproduction* 2013;146(4):111–23.
- [41] Monniaux D. Driving folliculogenesis by the oocyte-somatic cell dialog: lessons from genetic models. *Theriogenology* 2016;86(1):41–53.
- [42] Monget P, Martin GB. Involvement of insulin-like growth factors in the interactions between nutrition and reproduction in female mammals. *Hum Reprod* 1997;12(1):33–52.
- [43] Olivera-Muzante J. Comparación económica de las alternativas evaluadas. In: Olivera-Muzante J, editor. Serie Técnica INIA-FPTA. Validación de la Inseminación Artificial a Tiempo Fijo en ovinos considerando aspectos del bienestar "humano-ambiental-animal": uso de análogos de prostaglandina y de la vía cervical de inseminación; 2018. Montevideo, Uruguay.



## ACTA DE EXAMEN

**CURSO:** Defensa de Tesis de Maestría

**LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA:** Montevideo, 1 de marzo de 2019

**TRIBUNAL:** Dr. Roberto Kremer, Dra. Cecilia Cajarville, Dr. Daniel Fernández Abella

| CI ESTUDIANTE | NOMBRE                   | CALIFICACIÓN | NOTA   |
|---------------|--------------------------|--------------|--------|
| 3.193.395-3   | ERRANDONEA, José Nicolás | 12           | S.S.S. |

| PRESENTADOS | NO PRESENTADOS | APROBADOS | APLAZADOS | INSCRIPTOS |
|-------------|----------------|-----------|-----------|------------|
| 1           | 0              | 1         | 0         | 1          |

### TRIBUNAL

Dr. Roberto Kremer (Presidente)

Dra. Cecilia Cajarville

Dr. Daniel Fernández Abella

### FIRMA

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



## **FACULTAD DE VETERINARIA**

### **Programa de Posgrados**

## **ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS**

## **DE MAESTRÍA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL**

**Por: Dr. José Nicolás Errandonea**

**SUPLEMENTACIÓN PROTEICA FOCALIZADA PREVIO A  
SERVICIOS DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL A TIEMPO FIJO EN  
OVINOS SINCRONIZADOS CON PROSTAGLANDINAS**

**Director de Tesis: Dr. Julio Olivera**

**Codirectora de Tesis: Dra. Georgett Banchemo**

### **Tribunal**

**Presidente: Dr. Roberto Kremer**

**Segundo Miembro: Dra. Cecilia Cajarville**

**Tercer Miembro: Dr. Daniel Fernández Abella**

**Fallo del Tribunal:**

**Salón de Posgrado**

**Viernes 1 de marzo de 2019**

**El Fallo de aprobación de la Tesis puede ser: Aprobada (corresponde a la nota BBB- en el Acta), o Aprobada con Mención (corresponde a la nota SSS- 12 en el Acta)**

*rebert*