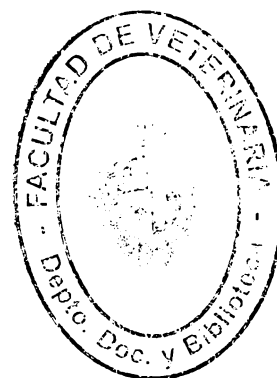


**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE VETERINARIA**

**IATF EN OVINOS CON SEMEN REFRIGERADO: IMPORTANCIA DEL MOMENTO DE  
INSEMINACIÓN EN UN PROTOCOLO EN BASE A PGF2 $\alpha$  EN OVEJAS MERINO  
AUSTRALIANO**

por

Br. Juana Milagros BOTTARO CARVE



TG 165

IATF en ovinos



FV/28458

TESIS DE GRADO presentada como uno de  
los requisitos para obtener el título de Doctor  
en Ciencias Veterinarias.  
(Orientación Producción Animal)

MODALIDAD Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2009**

TESIS DE GRADO aprobado por:

Presidente de Mesa:

  
Dr. Daniel Cavestany

Segundo Miembro (Tutor):

  
Dr. Julio Olivera Muzante

Tercer Miembro:

  
Dr. Danilo Fila

Cuarto Miembro (Cotutor):

Dr. Jorge Gil Laureiro

Fecha:

25 de Noviembre de 2009

Autor:

Br. Juana Milagros Bottaro Carve

FACULTAD DE VETERINARIA  
Aprobado con .....10 (diez).....~~10~~

28 . 458

II

## AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. Julio Olivera, mi tutor en esta tesis, por el tiempo dedicado, constancia y motivación para que este trabajo saliera adelante.
- Al Dr. Jorge Gil, cotutor del trabajo, por su gran colaboración en la realización del ensayo y conocimientos otorgados.
- A mis amigos y compañeros de trabajo y carrera, Dr. Fernando Fossati, Martín Regusci y Mario Martincorena. Por su ayuda en el trabajo con los animales; recolección, análisis e interpretación de los datos; y principalmente por su compañía irremplazable.
- A la familia Filliol Barreiro y al personal del establecimiento "Piedra Mora", por su colaboración, compañía y hospitalidad durante los días en se llevó a cabo todo el trabajo de campo. Por permitir que sea posible la realización de trabajos de investigación a campo, imprescindibles para la validación de resultados.
- Al Laboratorio Uruguay S.A. y al Dr. Ignacio Costa por la donación de PGF2 $\alpha$  (SINCRON-DL<sup>®</sup>), elemento indispensable para el estudio.
- A los Drs. Sergio Fierro y Gabriel Durán, por su colaboración en la realización del diagnóstico ecográfico.
- A la Universidad de la República, por financiar el ensayo (CODEC 2006 y CSIC I+D 600/6015).
- A la DILAVE Paysandú, por el uso de instalaciones y recursos humanos.
- Al Dr. Luis Cuenca por su tiempo, estímulo y recomendaciones.
- A Natalia Bottaro por su colaboración en las correcciones del idioma inglés.
- Al cuerpo docente de la Orientación Producción Animal, funcionarios de la EEMAC y funcionarias de Biblioteca.
- A mis padres, hermanos y familiares, por su apoyo y motivación diario durante toda la carrera y especialmente durante el tiempo que llevó realizar este trabajo.
- A Agustín Sanguinetti por acompañarme en todo este proceso, por su ayuda fundamental y sus consejos.
- A mis amigas y compañeras de carrera Valentina, María, Ana, Melina, María Inés, Alejandra, Verónica, María Pía y María Noel, por todos los momentos vividos. Desde el primer día hicieron más interesante esta profesión.
- A todo el grupo de Producción 2006 por su amistad y apoyo en todo momento.

PÁGINA DE APROBACIÓN .....	II
AGRADECIMIENTOS .....	III
LISTA DE CUADROS Y GRÁFICAS .....	VI
1. <u>RESUMEN</u> .....	1
2. <u>SUMMARY</u> .....	2
3. <u>INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO</u> .....	3
3.1. <u>OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS</u> .....	4
3.1.1. <u>Objetivo general</u> .....	4
3.1.2. <u>Objetivos específicos</u> .....	5
4. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u> .....	6
4.1. <u>RECORDATORIO FISIOLÓGICO DEL CICLO ESTRAL</u> .....	6
4.1.1. <u>Fase folicular</u> .....	6
4.1.2. <u>Fase luteal</u> .....	6
4.2. <u>INSEMINACIÓN ARTIFICIAL</u> .....	7
4.2.1. <u>Técnicas de inseminación artificial</u> .....	7
4.3. <u>SINCRONIZACIÓN DE CELOS Y OVULACIONES</u> .....	8
4.3.1. <u>Métodos farmacológicos para la sincronización de celos y ovulación</u> .....	8
4.3.1.1. <u>Prostaglandina F2<math>\alpha</math> y análogos sintéticos</u> .....	8
4.3.1.2. <u>Progesterona y Progestágenos</u> .....	10
4.3.1.3. <u>Otras alternativas para la inducción de la ovulación</u> .....	11
4.4. <u>IATF Y SYNCHROVINE<sup>®</sup></u> .....	11
4.4.1. <u>Synchrovine<sup>®</sup></u> .....	11
4.5. <u>BAJA FERTILIDAD DE LOS CELOS INDUCIDOS CON PGF2<math>\alpha</math></u> .....	12
4.6. <u>PRESERVACIÓN DE SEMEN</u> .....	14
4.6.1. <u>Tipos de preservación seminal</u> .....	14
4.6.1.1. <u>Preservación líquida del semen</u> .....	14
4.6.1.2. <u>Preservación de semen por congelación</u> .....	15
4.6.2. <u>Diluyentes para la preservación de semen</u> .....	15
4.6.3. <u>Diluyente Piedra Mora<sup>®</sup></u> .....	16
4.7. <u>FERTILIDAD DEL SEMEN PRESERVADO LÍQUIDO A 5°C</u> .....	16
4.8. <u>PRESERVACIÓN SEMINAL E IATF</u> .....	18

4.9.	PÉRDIDAS REPRODUCTIVAS ENTRE EL NO RETORNO AL SERVICIO Y LA FERTILIDAD LOGRADA A LA ECOGRAFÍA .....	19
4.9.1.	<u>Principales causas de las pérdidas embrionarias</u> .....	20
5.	<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u> .....	24
5.1.	FASE 1: SINCRONIZACIÓN DE CICLOS ESTRALES .....	24
5.2.	FASE 2: COLECTA, PROCESAMIENTO Y PRESERVACIÓN DEL MATERIAL SEMINAL .....	25
5.3.	FASE 3: INSEMINACIÓN ARTIFICIAL A TIEMPO FIJO .....	26
5.4.	FASE 4: SERVICIO DE REPASO .....	26
5.5.	PARÁMETROS EVALUADOS .....	26
5.5.1.	<u>Precipitaciones hídricas</u> .....	26
5.5.2.	<u>Parámetros reproductivos</u> .....	27
5.5.3.	<u>Análisis estadístico</u> .....	28
6.	<u>RESULTADOS</u> .....	29
6.1.	COMPARACIÓN EN TÉRMINOS REPRODUCTIVOS DE MOMENTOS DE IATF ASOCIADO A SEMEN REFRIGERADO Y CONTROL CON SEMEN FRESCO DE OVEJAS SINCRONIZADAS CON SYNCHROVINE® .....	29
6.2.	TASA NO RETORNO AL CELO, FERTILIDAD Y PÉRDIDAS REPRODUCTIVAS TOTALES ENTRE EL NO RETORNO AL CELO Y LA ECOGRAFÍA .....	30
6.3.	COMPARACIÓN REPRODUCTIVA DEL SERVICIO DE IATF ASOCIADO A UN SEGUNDO SERVICIO .....	30
7.	<u>DISCUSIÓN</u> .....	32
8.	<u>CONCLUSIONES</u> .....	34
9.	<u>CONSIDERACIONES FINALES</u> .....	35
10.	<u>BIBLIOGRAFÍA</u> .....	36
11.	<u>ANEXOS</u> .....	45

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> <i>Comparación de tres momentos de IATF vía cervical con semen refrigerado y grupo Control de IATF con semen fresco en ovejas multíparas Merino Australiano sincronizadas con Synchrovine®.</i> .....	29
<b>Cuadro 2.</b> <i>No retorno al celo, fertilidad y pérdidas reproductivas totales entre el no retorno al celo y ecografía en tres momentos de IATF vía cervical con semen refrigerado y grupo Control con semen fresco en ovejas multíparas Merino Australiano sincronizadas con Synchrovine®.</i> .....	30
<b>Cuadro 3.</b> <i>Comparación de tres momentos de IATF vía cervical con semen refrigerado y grupo Control con semen fresco asociado a un segundo servicio a celo visto con semen fresco vía cervical en ovejas multíparas Merino Australiano sincronizadas con Synchrovine®.</i> .....	31

## LISTA DE GRÁFICAS

<b>Gráfica I.</b> <i>Actividades realizadas y su asociación con las precipitaciones hídricas diarias durante el período experimental.</i> .....	27
---	----

## 1. RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue comparar en términos reproductivos tres momentos de inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) vía cervical con semen refrigerado a 5°C por 24 horas y un grupo Control de IATF con semen fresco en ovejas sincronizadas con prostaglandina (PGF2 $\alpha$ ). Grupos 1) Tratamientos, IATF con semen refrigerado a las 42, 48 y 54 horas pos segunda dosis de PGF2 $\alpha$  (protocolo Synchrovine<sup>®</sup>: dos dosis de PGF2 $\alpha$  separadas 7 días, Cloprostenol 125  $\mu$ g/dosis; n= 269), y 2) Control, IATF con semen fresco a las 48 horas pos segunda dosis de PGF2 $\alpha$  (protocolo Synchrovine<sup>®</sup>; n=96). Se utilizaron ovejas multíparas de raza Merino Australiano en estación reproductiva. Se realizó un segundo servicio (IA con semen fresco sin diluir) a celo natural detectado entre los días 13 a 22 posteriores a la IATF. Los resultados de fertilidad, prolificidad y fecundidad se evaluaron por medio de ecografía a los 60 días de la IATF. Acontecieron importantes precipitaciones hídricas durante el período del ensayo. La fertilidad y fecundidad con IATF a las 42 horas con semen refrigerado fueron menores respecto a los otros momentos de servicio (0,06 y 0,06; 0,24 y 0,24; 0,22 y 0,23, para IATF a las 42, 48 y 54 horas de la segunda PGF2 $\alpha$  respectivamente; P<0,05). La fertilidad y fecundidad a la IATF a las 48 y 54 horas con semen refrigerado fueron similares al grupo Control con semen fresco (0,24 y 0,24; 0,22 y 0,23; 0,31 y 0,32, para IATF a las 48 y 54 horas y grupo Control respectivamente; P>0,05). No se observaron diferencias entre la tasa de no retorno al celo a los 22 días (NR) o en las pérdidas reproductivas entre NR y fertilidad a ecografía (Pérdidas) para los grupos con IATF a las 48 y 54 horas con semen refrigerado y grupo Control (0,43, 0,44 y 0,46 ó 44,7, 50,0 y 31,8%, para IATF a las 48 y 54 horas y grupo Control respectivamente; P>0,05). El grupo con IATF a las 42 horas presentó menor NR y mayores Pérdidas respecto a los otros momentos de IATF con semen refrigerado y el grupo Control (0,28, 0,43, 0,44 y 0,46; 80,0, 44,7, 50,0 y 31,8%, para IATF a las 42, 48 y 54 horas y grupo Control respectivamente; P<0,05). La fecundidad final en la comparación de IATF más el servicio de repaso fue superior para el grupo con IATF a las 54 horas respecto a los otros momentos de IATF con semen refrigerado (0,47, 0,53 y 0,68, para IATF a las 42, 48 y 54 horas respectivamente; P<0,05), y similar al grupo Control (0,68 y 0,71, para IATF a las 54 horas y grupo Control respectivamente; P>0,05). Se concluye que sería recomendable no inseminar con semen refrigerado antes de las 48 horas de la segunda PGF2 $\alpha$ . Los resultados de IATF con el protocolo de sincronización con prostaglandina (Synchrovine<sup>®</sup>) no se vieron disminuidos por la refrigeración seminal.

## 2. SUMMARY

The aim of this work was to compare in reproductive terms three different moments of timed artificial insemination (TAI) by cervical method with chilled semen at 5°C for 24 hours and a Control group of TAI with fresh semen in ewes synchronized with prostaglandin (PGF2 $\alpha$ ). Groups 1) Treatments, TAI with chilled semen at 42, 48, 54 hours after the second dose of PGF2 $\alpha$  (Synchrovine<sup>®</sup> protocol: two doses of prostaglandin seven days apart, Cloprostenol 125  $\mu$ g/doses; n= 269), and 2) Control group, TAI at 48 hours with fresh semen after the second dose of PGF2 $\alpha$  (Synchrovine<sup>®</sup> protocol; n=96). Multiparous Australian Merino ewes were treated during the breeding season. A second service was done (AI with fresh undiluted semen) detecting natural estrus between days 13 and 22 after TAI. Fertility, prolificity and fecundity results were assessed by ultrasound 60 days after TAI. Important precipitations occurred during the experimental working period. Fertility and fecundity with TAI at 42 hours were lower compared to other moments of mating (0,06 and 0,06; 0,24 and 0,24; 0,22 and 0,23, for TAI at 42, 48 and 54 hours respectively; P<0,05). Fertility and fecundity at TAI at 48 and 54 hours with chilled semen were similar to Control group with fresh semen (0,24 and 0,24; 0,22 and 0,23; 0,31 and 0,32, for TAI at 48 and 54 hours and Control group respectively; P>0,05). No differences were observed for non-return rate to estrus at day 22 (NR) and reproductive loss between NR and ultrasound fertility (Wastages) between groups with TAI at 48 and 54 hours with chilled semen and Control (0,43, 0,44 and 0,46 or 44,7, 50,0 and 31,8%, for TAI at 48 and 54 hours and Control group respectively; P>0,05). Group with TAI at 42 hours showed lower NR and higher Wastages compared to other moments of TAI with chilled semen and Control group (0,28, 0,43, 0,44 and 0,46; 80,0, 44,7, 50,0 and 31,8%, for TAI at 42, 48 and 54 hours and Control group respectively; P<0,05). Final fecundity, comparing TAI plus second mating was higher for the group with TAI at 54 hours compared to other moments of TAI with chilled semen (0,47, 0,53 and 0,68, for TAI at 42, 48 and 54 hours respectively; P<0,05), and similar to Control group (0,68 and 0,71, for TAI at 54 hours and Control group respectively; P>0,05). In conclusion, insemination with chilled semen before 48 hours after the second dose of PGF2 $\alpha$ , is not recommended. TAI results with prostaglandin synchronization protocol (Synchrovine<sup>®</sup>) were not undermined by chilled semen.



### 3. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Uruguay se destaca en la región como el país de mayor orientación exportadora en el rubro ovino, tanto en lana como en carne, siendo de referencia a nivel mundial (SUL, 2009). Sin embargo, en la última década, la producción total de lana de Uruguay ha disminuido acompañando el descenso en la población ovina que sufrió nuestro país, asociado principalmente a los variables precios internacionales de esta fibra y a las ventajas comparativas de otros rubros dentro del sector agropecuario. Es así que desde 1998 a la fecha la población ovina del país ha descendido cerca de un 42%, registrándose en la actualidad 9,4 millones de cabezas de lanares (DICOSE, 2008).

A pesar de ello, existen señales positivas que seguramente tendrán incidencia en la evolución de la demanda industrial, como la puesta en marcha en el año 2008 del Plan Estratégico del Rubro Ovino con el objetivo de mejorar el posicionamiento competitivo de toda la cadena ovina (Salgado, 2009). En este sentido, y buscando la valorización de las lanas finas uruguayas, ya desde el año 1998 se lleva adelante conjuntamente entre la SCMAU, INIA y SUL, el Proyecto Merino Fino del Uruguay. Este proyecto busca desarrollar una alternativa de producción ovina que permita mejorar la sustentabilidad productiva y socioeconómica de los productores de lana de las regiones de Basalto y Cristalino (Montossi y col., 1998), promoviendo a partir de un núcleo elite y varios planteles, la generación de carneros objetivamente afinadores, para proporcionar padres certificados para su uso en majadas multiplicadoras y generales (Montossi y de Barbieri, 2007). Es dentro de este marco que desde el año 2003 la Universidad de la República (Facultad de Veterinaria) y la DILAVE Paysandú, vienen desarrollando proyectos de investigación con el fin de levantar algunas de las restricciones reproductivas identificadas para el avance del Proyecto Merino Fino (Olivera y col., 2005).

Las tecnologías disponibles para favorecer el desarrollo de un programa de mejora genética como el del Proyecto Merino Fino tienen por base a la inseminación artificial (IA), la que sin duda tiene relación directa con el desarrollo de las técnicas de preservación del semen de carnero (Gil y Olivera, 2005). Ambas, son técnicas que permiten el uso más eficiente de los carneros durante la estación reproductiva y también fuera de ésta (Olivera y col., 2005).

Cuando se aplica un programa de IA, la detección de celos representa un paso crítico que requiere un gran tiempo de trabajo, por esto la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) es una alternativa que facilita el manejo de las ovejas, optimiza los recursos humanos, permite un mejor control reproductivo; y en condiciones pastoriles, significa menor riesgo a patologías infectocontagiosas tales como el foot-rot, donde las concentraciones de animales, ya sea por altas cargas o encierros, favorecen su transmisión. Además, la IATF facilitaría un manejo nutricional racional permitiendo una alimentación focalizada pre-servicio y pre-parto, optimizando así el uso de los escasos recursos forrajeros disponibles en los sistemas extensivos (Azzarini, 1995; Menchaca y Rubianes, 2004; Olivera y col., 2007<sub>1</sub>).

A pesar de su utilización, el uso de progestágenos en la sincronización de celos de los ovinos presenta ciertas desventajas. Por un lado se reporta una disminución en la fertilidad respecto al celo natural relacionado a anomalías en el transporte y sobrevivencia espermática en el tracto reproductivo de la hembra (Hawk y Conley, 1971), alteraciones en el patrón de

liberación de hormona luteinizante (LH) (Gordon, 1975; Scaramuzzi y col., 1988; citados por Fernández Moro y col., 2008) y en la calidad de las ovulaciones (Killian y col., 1985; citado por Fernández Moro y col., 2008). Sumado a esto, es sabido que el uso de gonadotrofina coriónica equina (eCG) que se asocia a los tratamientos con progestágenos, induce a la formación de anticuerpos generando una disminución en la fertilidad en los siguientes tratamientos (Chemineau y col., 1999; citado por Fernández Moro y col., 2008; Menchaca y Rubianes, 2004). Por último, la normativa internacional sobre residuos químicos ha prohibido la utilización de progestágenos en animales de granja (EEUU) y restringido los límites máximos de residuos permitidos en la UE (Gil y Olivera, 2005; Fernández Moro y col., 2008). Es por todo esto que se hace necesario investigar y validar el uso de otros protocolos de sincronización de celos e IATF, como ser en base a prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$  (PGF<sub>2</sub> $\alpha$ ) (protocolo Synchrovine<sup>®</sup> (2003); Rubianes y col., 2004), de forma de levantar las anteriores restricciones.

Respecto a las formas de preservación de semen ovino, la refrigeración seminal a 5°C es una herramienta en expansión en nuestro país. Este tipo de preservación facilita el acceso a carneros superiores y evita su transporte cuando son requeridos simultáneamente en distintos establecimientos, evitando situaciones de estrés que en la mayoría de los casos se tornan perjudiciales para la calidad seminal (Fierro y col., 2007). La bibliografía internacional describe que la fertilidad de semen de carnero declina de 10 a 35% por día de preservación refrigerada cuando se utiliza la vía cervical (Evans y Maxwell, 1987). A nivel nacional, la calidad seminal ha sido preservada hasta las 48 horas con resultados de fertilidad vía cervical y celo natural inferiores, pero no muy alejados de los biológicamente alcanzables con semen fresco (Fierro y col., 2005; Araujo y col., 2006).

La combinación de ambas biotecnologías, preservación de semen en forma refrigerada e IATF con inducción de los celos con PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , intentaría perfeccionar el manejo reproductivo de un programa de mejoramiento genético, sin descuidar aspectos económicos y de cuidado animal-ambiental. Los resultados obtenidos con semen fresco vía cervical con el protocolo de sincronización e IATF Synchrovine<sup>®</sup>, no parecen variar cuando se insemina entre las 42 y las 54 horas pos segunda dosis de PGF<sub>2</sub> $\alpha$  (Fossati y col., 2008). Los resultados preliminares obtenidos con semen refrigerado e IATF con el protocolo Synchrovine<sup>®</sup> parecen disminuir en forma significativa la fertilidad cuando se la compara con la utilización de semen fresco (Fierro y col., 2007). Sin embargo en este ensayo solo se testó un momento de IATF con semen refrigerado, por lo cual queda planteada la hipótesis de que el momento de IATF vía cervical podría influir en el resultado reproductivo obtenido con semen refrigerado bajo este protocolo.

Es en este contexto que se definen los objetivos generales y específicos de este trabajo.

### 3.1. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

#### 3.1.1. Objetivo general

El objetivo general de este trabajo fue comparar en términos reproductivos tres momentos de IATF vía cervical con semen refrigerado en ovejas Merino Australiano sincronizadas con PGF<sub>2</sub> $\alpha$  (protocolo Synchrovine<sup>®</sup>).

### 3.1.2. Objetivos específicos

- A) Comparar la fecundidad obtenida a 60 días pos servicio vía cervical con semen refrigerado a 5°C por 24 horas de tres momentos de IATF: 42, 48 ó 54 horas posteriores a la segunda dosis de PGF2 $\alpha$ , en ovejas multíparas Merino Australiano con celo inducido con el protocolo Synchrovine<sup>®</sup>.
- B) Comparar los resultados obtenidos con un grupo Control de IATF con semen fresco con similar manejo.
- C) Analizar las diferencias de fertilidad entre el “no retorno al servicio a 21 días” y el diagnóstico de gestación por ecografía a los 60 días de la IATF, para los grupos de IATF con semen fresco y refrigerado.
- D) Realizar un estudio comparativo en términos reproductivos del desempeño final del servicio de IATF junto con un segundo servicio de IA sobre celo natural, para cada grupo de inseminación (semen fresco y refrigerado).

## 4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 4.1. RECORDATORIO FISIOLÓGICO DEL CICLO ESTRAL

La oveja presenta un patrón reproductivo con una estacionalidad, que ocurre para la mayoría de las razas a fines de verano y otoño, durante la cual muestran comportamiento de celo y ovulaciones espontáneas de manera cíclica (de Castro y col., 2007).

El ciclo estral comprende el transcurso de tiempo entre el inicio de un período de celo y del siguiente. En la oveja, tiene una duración promedio de 17 días, y se divide en una fase luteal, que se extiende desde el día 2-3 (estro = día 0) del ciclo hasta el día 13 aproximadamente, y una fase folicular, desde la luteólisis (regresión del cuerpo lúteo (CL) que se produce el día 13-14) hasta el día 2 (Ungerfeld, 2002). Por su parte el estro dura en promedio 22 horas (rango 18-48 horas) y la ovulación ocurre generalmente antes de finalizar el estro (de Castro y col., 2007).

#### 4.1.1. Fase Folicular

Durante esta fase se produce el desarrollo folicular final, la ovulación y la organización del folículo ya ovulado hacia la formación de un nuevo CL (Ungerfeld, 2002).

El crecimiento folicular se encuentra bajo control hormonal. La hormona folículo estimulante (FSH) estimula el crecimiento temprano de los folículos y la LH es necesaria para completar las últimas fases de crecimiento; además, ambas gonadotropinas hacen que el folículo secrete estrógenos (Evans y Maxwell, 1987).

Paralelamente a la caída de la progesterona se produce una retroalimentación positiva presentándose un pulso de LH por cada pulso de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH); y de estrógenos secretados por el folículo como respuesta a la LH; determinando que se produzca rápidamente un nuevo pulso de LH (Ungerfeld, 2002). Cuando el nivel de estrógenos es suficientemente elevado, se dispara la oleada preovulatoria de LH, que produce cambios en la pared del folículo determinando su ruptura y la liberación del ovocito (Evans y Maxwell, 1987) 24 a 30 horas luego de iniciado el celo (Ungerfeld, 2002). A su vez, los estrógenos son responsables de la inducción del comportamiento estral (celo) de las hembras (Evans y Maxwell, 1987).

#### 4.1.2. Fase Luteal

El pico preovulatorio de LH conduce a la ovulación y a la posterior luteinización del folículo remanente, con la subsecuente formación del CL (Ungerfeld, 2002). Las células de la granulosa de la pared del folículo se hipertrofian y se transforman en células luteales (Fernández Abella, 1993). A medida que el CL se desarrolla, aumentan los niveles de progesterona secretados en la corriente sanguínea (Ungerfeld, 2002), alcanzando un máximo luego de 6 días y permanece alto si se da la gestación. De lo contrario, transcurridos 11 a 12 días, el CL disminuye de tamaño y desciende la secreción de progesterona (Evans y Maxwell, 1987). La regresión del CL y la caída de los niveles plasmáticos de progesterona son inducidos por la secreción de  $\text{PGF2}\alpha$ , que incrementa sus niveles a partir del día 12 del ciclo,

de no existir gestación (Mc Cracken y col., 1972; Thornburn y col., 1973; Inskoop y Murdoch, 1980; Farin y col., 1986; citados por Fernández Abella, 1993), o sí existe concepción pero no ocurre el reconocimiento materno de la misma (Olivera y col., 2007<sub>2</sub>).

## 4.2. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

Durán del Campo (1980<sub>1</sub>) define a la IA como el método de reproducción en que los gametos masculinos son transportados al tracto genital femenino, a través de medios mecánicos que sustituyen los habituales órganos especializados del macho. En este método no existe contacto directo entre el macho y la hembra.

La IA es una técnica cuya ventaja fundamental es la posibilidad de incrementar notablemente la cantidad de hembras que puedan gestarse con un sólo reproductor, permitiendo optimizar el uso del material genético proveniente de individuos altamente superiores (Vilariño y Menchaca, 2007). Así, los carneros mejoradores alcanzan la población objetivo con mayor rapidez que cuando se utilizan métodos convencionales, y en consecuencia, se reduce el intervalo generacional, así como el tiempo para conseguir los beneficios esperados (Olivera y col., 2007<sub>3</sub>).

La IA en la oveja presenta como limitante la dificultad de atravesar el cervix y alcanzar la luz uterina por vía transcervical como se realiza en la vaca. Esto es debido al menor tamaño corporal y a las particularidades anatómicas del tracto reproductivo de dicha especie (Vilariño y Menchaca, 2007).

### 4.2.1. Técnicas de inseminación artificial

Las técnicas de IA determinan el sitio de deposición del semen. De acuerdo a esto, pueden describirse tres técnicas o tipos de inseminación: intravaginal, intracervical, o intrauterina.

La IA por vía cervical ó intracervical es la técnica que, debido a la sencillez de su aplicación, el que requiera poco tiempo por oveja, bajo costo y con la cual se obtienen resultados aceptables, sea para nuestras condiciones la vía de inseminación más utilizada. Evans y Maxwell (1987) han demostrado, para esta técnica, que cuanto más profundamente se deposite el semen dentro del cervix, mayor es el índice de fertilidad. La IA intrauterina por laparoscopia ha sido la única técnica exitosa en superar la barrera que representa el cervix de la oveja, y adquiere mayor importancia cuando se utiliza semen preservado en forma congelada ya que permite obtener aceptables tasas de concepción y a su vez reduce el número de espermatozoides por dosis (Vilariño y Menchaca, 2007), pero no se aplica para inseminaciones masivas dado sus mayores costos y complejidad. La IA vaginal, en cambio, es la técnica mas sencilla de todas, rápida de realizar y requiere menos instrumental que las anteriores, pero el hecho de que se reporten menores resultados que la IA cervical (Durán del Campo, 1993) y sean necesarios concentración y volúmenes de dosis inseminante mayores, se ha dejado de lado, aunque en circunstancias especiales podría ofrecer una alternativa interesante como al inseminar hembras vírgenes en las que la estrechez de la parte vestibular de la vagina no permita la entrada del especulo.

### 4.3. SINCRONIZACIÓN DE CELOS Y OVULACIONES

Pese al progreso tecnológico alcanzado por la IA, su uso no se ha expandido de gran manera en nuestro país. Las razones más importantes para dicho fenómeno, son de índole biológica, tecnológica y económica como son: los sistemas extensivos de manejo, cervix uterino de difícil permeabilidad, sensibilidad del semen ovino a la criopreservación, técnicas sofisticadas y costosas para la inseminación intrauterina, entre otras. La dificultad en la detección de ovejas en celo en majadas numerosas en sistemas de cría extensiva podría resolverse con un adecuado programa de sincronización del ciclo estral o con IATF (Gil, 2003).

El concepto de *inducción de celo* implica lograr el desencadenamiento de una fase folicular asociada a comportamiento estral y que culmine con la ovulación. Por su parte, *sincronización de celo* se refiere a la aparición simultánea de dichos eventos en el conjunto de los animales tratados (Rubianes y col., 1999). Por lo tanto, una técnica de sincronización de celos efectiva debe inducir una respuesta estral fértil y altamente sincronizada en un porcentaje importante de las hembras tratadas (Rubianes y col., 1999).

Los métodos de sincronización de celo pueden clasificarse en dos categorías principales: los farmacológicos y los naturales.

Los **métodos farmacológicos** o artificiales para la sincronización de celos y ovulación son efectivos en sincronizar el estro en la mayoría de las hembras tratadas y pueden diferenciarse en base a los principios fisiológicos sobre los que actúan. Los tratamientos tradicionales se basan fundamentalmente en el manejo del CL, ya sea en la generación de una fase luteal artificial (simulando su acción) utilizando progestinas; ó acortando la vida del CL destruyéndolo con PGF2 $\alpha$  que posee acción luteolítica (Durán Hontou, 1993).

El método natural o **efecto macho**, consiste en introducir machos a un grupo de hembras previamente aisladas de ellos durante algunas semanas. La introducción de machos en forma repentina es una técnica de bajo costo, que determina que muchas hembras ovulen, manifiesten celo y puedan quedar preñadas (Ungerfeld, 2003). Este método no agrupa tan estrechamente a las hembras en celo y sólo se puede utilizar en ciertas regiones y en determinadas épocas del año (Evans y Maxwell, 1987).

#### 4.3.1. Métodos farmacológicos para la sincronización de celos y ovulación

##### 4.3.1.1. Prostaglandina F2 $\alpha$ y análogos sintéticos

Las prostaglandinas constituyen un grupo de ácidos grasos esenciales poli-insaturados, siendo el ácido araquidónico el precursor de aquellas que intervienen en los procesos reproductivos. Hay quienes no las consideran hormonas en el sentido estricto, ya que no son secretadas por ninguna glándula en particular y tienen una vida media muy corta que solo les permite tener acciones locales. Son clasificadas en cuatro grupos básicos, A, B, E y F, siendo la PGF2 $\alpha$  y la prostaglandina E2 las de mayor importancia desde el punto de vista reproductivo. La PGF2 $\alpha$  es liberada por el útero, y juega un rol importante en regular la vida

del CL, induciendo a la regresión de este (Ungerfeld, 2002). Por este motivo, sólo pueden utilizarse durante la estación reproductiva.

Una vez caracterizada a la  $\text{PGF2}\alpha$  como factor luteolítico, se comenzó con la producción de sus análogos sintéticos, los cuales son más baratos que la prostaglandina natural y logran el efecto luteolítico con menores dosis. Las prostaglandinas se utilizan por vía intramuscular, aunque se las ha probado por otras vías (Menchaca y col., 2003), lo cual representa una ventaja sobre otros tratamientos ya que se aplica rápidamente, y se metaboliza casi totalmente (99%) en los pulmones (Mc Cracken y col., 1972; Light y col., 1994; citados por Contreras Solís y col., 2009).

La inyección de  $\text{PGF2}\alpha$  en ovejas ciclando es efectiva en la inducción de la regresión luteal en la mayoría de las ovejas con el consecuente retorno al celo. Se ha visto que un 60-70% de los animales tratados responden con celo en los siguientes 4 a 5 días (Menchaca y Rubianes, 2007).

La eficacia en la respuesta con celo en ovejas depende del estado de funcionalidad del CL. Acritopoulou y Haresign (1980) a partir de la administración de un análogo sintético de  $\text{PGF2}\alpha$  (Cloprostenol, ICI 80996) a ovejas que se encontraban en distintos días del ciclo estral, observaron que una única inyección administrada entre los días 5 al 14 inclusive del ciclo estral, era efectiva en la regresión luteal seguida de celo y ovulación. Pero, las ovejas que se encuentren entre los días 15 y 17 del ciclo estral, experimentarían la luteólisis y celo de forma natural (Acritopoulou y Haresign, 1980; Gibbons y Cueto, 1995), en tanto que las que se encuentren entre los días 0 y 4 del ciclo al inicio del tratamiento serían refractarias a la  $\text{PGF2}\alpha$ , ya que ésta es inefectiva debido a que el CL se encuentra en proceso de formación a partir del ciclo anterior, y entrarían en celo recién 13 a 17 días más tarde (Gibbons y Cueto, 1995). El intervalo de tiempo entre la administración de  $\text{PGF2}\alpha$  y la aparición de estro y ovulación parece ser más largo cuando el tratamiento se realiza a mitad del ciclo, a diferencia de cuando se realiza más temprano (días 3 a 5) o más tarde (día 14) en el ciclo estral (Acritopoulou y Haresign, 1980). Esto puede deberse al tiempo requerido para reducir la concentración de progesterona a niveles basales a medida que la fase luteal progresa y el CL adquiere su máximo funcional endocrino (Houghton y col., 1995).

A efectos de mejorar la sincronización en el total de ovejas tratadas, algunos autores consideraron necesario utilizar dos dosis de  $\text{PGF2}\alpha$  separadas de 9 a 14 días (Acritopoulou y Haresign, 1980; Durán Hontou, 1993; Menchaca y col., 2003), logrando más del 90% de los animales en celo luego de la segunda dosis (Menchaca y col., 2003). Con estos tratamientos tradicionales, el rango de aparición de celo entre ovejas es bastante variable haciendo inviable la asociación de  $\text{PGF2}\alpha$  a la IATF (Evans y Maxwell, 1987; Menchaca y Rubianes, 2007). La respuesta variable se ha relacionado con el estado folicular individual de cada oveja al momento en que se administra la  $\text{PGF2}\alpha$  (Viñoles y Rubianes, 1998). En el estudio del origen del folículo preovulatorio luego de inducir la luteólisis, Viñoles y Rubianes (1998) encontraron dos tipos de respuesta: 1) si un folículo dominante se encontraba en su fase de crecimiento o estática al momento del tratamiento, este finalmente ovula; 2) en cambio, si ya había iniciado su fase de regresión, el folículo preovulatorio se originaría de la siguiente onda folicular.

El intervalo de tiempo entre las dos dosis de PGF2 $\alpha$  en los tratamientos tradicionales surge a partir del concepto de que el CL es refractario a la PGF2 $\alpha$  hasta el día 5 del ciclo ovino. Sin embargo, Rubianes y col. (2003) demostraron que la refractariedad del CL a la PGF2 $\alpha$  puede ser restringida a los 2 primeros días del ciclo estral, y que una dosis de un análogo de PGF2 $\alpha$  induce luteólisis, aparición de celo, ovulación y formación de un nuevo CL en todas las ovejas tratadas al día 3 después de la ovulación. De esta manera surge la posibilidad de reducir el intervalo entre dosis a sólo 6 a 8 días, asegurando la destrucción del CL. En forma interesante, la ovulación ocurrió en un intervalo muy consistente ( $60 \pm 0,0$  horas) en la mayoría de las ovejas tratadas. Al aplicar la segunda dosis, las ovejas que respondieron a la primera dosis se encuentran en el día 3 a 5 posteriores a la ovulación. En este momento del ciclo, el folículo de mayor diámetro de la primera onda folicular está en su fase de crecimiento (Ginther y col., 1995). De estas observaciones nace el protocolo Synchrovine<sup>®</sup> para la sincronización de celos y se evalúa para ser utilizado en programas de IATF.

#### 4.3.1.2. Progesterona y Progestágenos

Las progestinas son hormonas esteroideas, es decir que derivan del colesterol (lípidos producidos en muchos tejidos del organismo). La progesterona u hormona de la preñez, principal progestina, es la secreción primordial del CL durante su vida activa, y también es secretada por la unidad feto-placentaria en ovinos y otras especies a partir de la mitad de la gestación (Ungerfeld, 2002).

Los tratamientos en base a progesterona consisten en bloquear el ciclo estral lo suficientemente como para que todas las ovejas lleguen al término de su fase luteal. Luego de retirar el bloqueo se produce el comienzo sincronizado de la fase folicular, lo que concluiría en estro y ovulación simultáneamente (Fernández Abella, 1987; Menchaca y col., 2003).

Los **tratamientos tradicionales** consisten en la colocación de un dispositivo impregnado en progestágeno de liberación lenta con una duración igual o superior a la vida efectiva del CL (12 a 14 días), que suprimen la liberación de las gonadotropinas hipofisarias, no apareciendo celo ni ovulación (Evans y Maxwell, 1987). Al retirar el dispositivo, se desencadena el reinicio de la actividad sexual, con la aparición del estro dentro de las 48 horas siguientes (Durán Hontou, 1993), y la ovulación alrededor de las 60 horas posteriores al retiro de las esponjas (Gibbons y Cueto, 1995). Este método de sincronización suele asociarse con la aplicación de eCG al momento de retirar la esponja, estimulando y concentrando la ovulación, y así, mejorando la fertilidad del celo inducido y permitiendo la IATF (Durán Hontou, 1993). Con estos tratamientos se obtienen resultados aceptables con un alto porcentaje de hembras en estro, sin embargo se ha observado que la tasa de concepción del celo inducido puede disminuir respecto a un celo espontáneo (Hawk y Cooper, 1977; Larson y Ball, 1992). Lo que se ha vinculado al hecho de que al iniciar un tratamiento, se incrementa rápidamente la concentración de progesterona en sangre durante 3 a 4 días, y luego desciende, llegando luego a concentraciones sub luteales a los 6 días, manteniéndose así hasta el fin del tratamiento. Esta diferencia en los niveles de progesterona inducidos, con respecto a los niveles fisiológicos durante la fase luteal tardía tendría implicancias sobre la fertilidad final obtenida demostrándose que provoca la alteración de transporte espermático por un lado, y



una alteración en el desarrollo folicular alterando la calidad del ovocito, por otro (Menchaca y Rubianes, 2007).

Considerando lo anterior, es que se han propuesto tratamientos alternativos de corta duración. Los **tratamientos cortos** resultaron tan efectivos como los largos, tanto en presentación de celo como en fertilidad. Estos se estandarizaron en tratamientos a 6 días (Ungerfeld y Rubianes, 1999), los cuales, para obtener una respuesta estral aceptable y concentrada después del uso de un tratamiento corto en hembras cíclicas, era necesario asegurar la regresión luteal mediante el uso de una dosis de  $\text{PGF2}\alpha$  (Menchaca y Rubianes, 2007).

#### 4.3.1.3. Otras alternativas para la inducción de la ovulación

La inducción de la ovulación permite realizar apareamientos en cualquier época de año, ya sea en estación reproductiva como fuera de ella. Dentro de estas alternativas se encuentran las gonadotropinas (eCG y gonadotrofina coriónica humana (hCG)) (Saumande, 1977; Thibault y Lavoisier, 1979; citados por Fernández Abella, 1987); administración pulsátil de GnRH (Mc Leod y Haresign, 1984; Williams y col., 1984; Dobson, 1985; citados por Fernández Abella, 1995); y melatonina (Fernández Abella, 1987), entre otras. Ya que estas hormonas no inducen al celo, es necesario el uso de un progestágeno combinado (Fernández Abella, 1995).

#### 4.4. IATF Y SYNCHROVINE®

Cuando se aplica un programa de IA, la detección de los celos en la majada representa un punto crítico que requiere un gran tiempo de trabajo, por esto la IATF es una alternativa que permite aplicar un servicio a ovejas sin la necesidad de realizar la detección de los celos, facilitando así el manejo de la majada, optimizando los recursos humanos escasos y permitiendo un mejor control reproductivo. Cuando se pretende implementar una IATF necesariamente debe ser conocido el momento de la ovulación, el cual está determinado por el tratamiento de sincronización de celo utilizado (Vilariño y Menchaca, 2007).

##### 4.4.1. Synchrovine®

El protocolo de sincronización de celos Synchrovine® es un nuevo tratamiento de IATF desarrollado para ovinos que se basa únicamente en el uso de  $\text{PGF2}\alpha$ . Consiste en la aplicación de 2 dosis de  $\text{PGF2}\alpha$  separadas por 7 días, seguida de una IA a tiempo prefijado después de la segunda dosis (Menchaca y Rubianes, 2007).

Este protocolo acorta el intervalo entre las dos dosis de  $\text{PGF2}\alpha$  de 9 a 14 días en los tratamientos tradicionales, a sólo 7, con el objetivo de lograr una alta sincronización en las ovulaciones en ovejas luego de la segunda dosis. Se ha observado que cuando se aplica una dosis de  $\text{PGF2}\alpha$  desconociendo el estado ovárico, ocurre la ovulación dentro de un rango de 2 a 4 días, determinándose así, que surja la primera onda de desarrollo folicular del siguiente ciclo, la cual emerge alrededor del día de ovulación (en el día 0 del ciclo). El folículo dominante de cada onda continúa su desarrollo durante 5 a 7 días, y al mismo tiempo se desarrolla un nuevo CL. De esta manera, surge la hipótesis de que la segunda dosis de

PGF2 $\alpha$  estaría coincidiendo con los días 3 a 5 posteriores a la ovulación, donde el CL joven ya es sensible a la PGF2 $\alpha$  (Rubianes y col., 2003), y se encuentra en crecimiento un folículo dominante (Menchaca y Rubianes, 2004).

Evaluando el protocolo Synchrovine<sup>®</sup>, utilizando semen fresco sin diluir e IA vía cervical sobre ovejas cruza Corriedale por razas carniceras, Menchaca y col. (2004) observaron que la tasa de concepción después de la IATF fue afectada por el momento de la inseminación. Al realizar IATF a diferentes tiempos (42, 48 o 54 horas), ellos obtuvieron la mejor tasa de concepción cuando se realizó la IA a las 42 horas, no diferente significativamente al de 48 horas, pero superior al obtenido con IATF a las 54 horas ( $P>0,05$ ). En ensayos posteriores, la aplicación de Synchrovine<sup>®</sup> e IATF a las 42 horas tuvo como resultado una mayor tasa de preñez similar a la obtenida por un grupo con celo inducido mediante este protocolo, pero inseminado a 12 horas de la detección del celo (Forichi y col., 2004), lo cual evidenció que los resultados no mejoran con la detección de celos. Sin embargo, Olivera y col. (2007<sub>1</sub>) utilizando biotipos definidos (Merino Australiano), obtuvieron mejores resultados de fertilidad con este protocolo cuando se realizó IATF a las 48 horas respecto a las 42 horas ( $P>0,05$ ). De esta manera, y frente a la interrogante de cual era el momento que optimizaba la IATF de este protocolo con semen fresco vía cervical, Fossati y col. (2008) compararon nuevamente tres momentos de IATF (42, 48 y 54 horas) en ovejas Merino Australiano, no encontrando diferencias en fertilidad entre ellos, concluyendo que era factible inseminar con igual éxito dentro de este rango de horas. A pesar de estos hallazgos la fertilidad del protocolo Synchrovine<sup>®</sup> ha sido muy variable y ha superado el 50% de las ovejas tratadas en pocas situaciones.

Para incrementar la eficiencia global del protocolo, se propone realizar otra IA a las ovejas en el siguiente ciclo a partir de la detección de celos (servicio repaso sobre celo natural), logrando una tasa de preñez global promedio que ha oscilado entre 70 y 78% con sólo 9 días de trabajo (1 día de IATF + 8 días de re inseminación en un período entre los días 15 y 22 después de la segunda dosis de PGF2 $\alpha$ ). De esta manera se lograrían resultados similares a los obtenidos en los programas tradicionales de IA durante 36 días (sin sincronización de las ovejas) y mayores a los programas tradicionales de sincronización e IA por 18 días con detección de celo (Menchaca y Rubianes, 2004). Así mismo, Fossati y col. (2008), sobre un resultado de fertilidad a la IATF con semen fresco algo bajo (31%), alcanzaron una fertilidad de 67% con un segundo servicio de repaso, equiparando las diferencias con el protocolo control de sincronización de celos con progesterona y eCG. Esto permite hacer mas viable la adopción del protocolo Synchrovine<sup>®</sup> en un sistema productivo que busque disminuir los días totales de trabajo (Olivera y Gil, 2005).

#### 4.5. BAJA FERTILIDAD DE LOS CELOS INDUCIDOS CON PGF2 $\alpha$

La fertilidad de ovejas inducidas a ovular con tratamientos de PGF2 $\alpha$  puede estar influenciada por factores que afectan el desarrollo de los folículos, los ovocitos o los embriones; y por aquellos que afecten la función uterina. La alteración de estos procesos podría estar relacionado con algunos cambios observados en el ciclo estral consecutivo al tratamiento con PGF2 $\alpha$  (Cárdenas y col., 2004).

Se ha descrito en cabras que la fertilidad del servicio luego del tratamiento con  $\text{PGF2}\alpha$  podría verse reducido por alteraciones en la funcionalidad del folículo preovulatorio (Fernández Moro y col., 2008), y que éste, podría dar lugar a la formación de CL defectuosos incapaces de mantener la gestación (Vázquez y col., 2009). En el estudio de esta hipótesis, Vázquez y col. (2009) encontraron deficiencias en el crecimiento y funcionalidad de los CL de cabras tratadas con cloprostenol, las cuales presentaron CL de mayor tamaño y área de tejido luteal, pero a la vez, menor secreción de progesterona plasmática durante toda la fase luteal, marcando un índice de eficiencia menor respecto a cabras sin tratar. Esto también ha sido constatado en ovinos, donde el inadecuado desarrollo de un folículo conduciría a la formación de un CL subnormal, causando la disminución en la secreción de progesterona (White y col., 1987; Keisler y Keisler, 1989).

La secreción de progesterona durante los primeros días después de la ovulación juega un rol importante para el desarrollo temprano de los embriones (Watson y col., 1999; citado por Vázquez y col., 2009). La incidencia de degeneración en embriones recuperados luego del tratamiento con  $\text{PGF2}\alpha$  se ve aumentado con valores más bajos de progesterona desde el día 2 en adelante (González Bulnes y col., 2005). Así mismo, los óvulos derivados de estos folículos que dieron lugar a la formación de CL defectuosos, no tendrían un potencial adecuado para la fertilización y desarrollo (Ashworth y col., 1989), aunque, la incidencia de fallas en la fertilización en ovejas sea en forma natural baja (Kelly, 1984; citado por Ashworth y col., 1989).

La disminución en las concentraciones de progesterona luego del tratamiento con  $\text{PGF2}\alpha$ , se ha asociado con la extensión del ciclo estral en aproximadamente 1 día (Cárdenas y col., 1993; Cárdenas y col., 2004). Esto también fue observado por Barrett y col. (2002) quienes concluyeron que la variabilidad en el intervalo entre la administración de  $\text{PGF2}\alpha$  y la ovulación parecería deberse a ovulaciones tardías a partir de nuevas ondas foliculares que emergen luego del tratamiento; ó, a ovulaciones tempranas por la extensión en la vida media de los folículos ovulatorios de ondas que emergen antes del tratamiento. Los bajos niveles de progesterona sérica permiten el incremento en la frecuencia de los pulsos de LH, pero no permite que ocurra el pico preovulatorio, y en consecuencia se incrementa el tamaño y permanencia de los folículos mayores (Menchaca y Rubianes, 2004).

Se ha descrito, un efecto anovulatorio de la  $\text{PGF2}\alpha$  cuando se administra a ovejas que se encuentran en fase luteal temprana, debido a una alteración en la dinámica de las ondas foliculares, de forma mas dramática y prolongada, en comparación a ovejas tratadas en su fase luteal tardía (Barrett y col., 2002).

También se ha sugerido que la baja fertilidad obtenida luego de aplicar un tratamiento con  $\text{PGF2}\alpha$ , se deba a modificaciones en las características del mucus vaginal ó a un aumento en las contracciones musculares debido a la acción de la hormona a nivel del tracto reproductivo, y que por estas causas se encuentre alterado el tránsito espermático desde el útero hacia el sitio de fertilización (Viñoles y col., 2007). La sobrevivencia y el transporte de espermatozoides en ovejas está generalmente disminuido después de la alteración del ciclo estral (Hawk y Cooper, 1977). Se ha observado la existencia de algún efecto del tratamiento de inducción del estro sobre la motilidad uterina (Hawk, 1973). Por otro lado, se ha observado

que la inducción de celos con PGF2 $\alpha$  disminuyó el porcentaje de espermatozoides móviles y vivos en todos los segmentos del tracto reproductivo (Hawk y col., 1981), donde el cervix anterior fue el sitio de reducción más drástica luego de 2 horas de realizado el servicio (Hawk y Conley, 1975; Hawk y Cooper, 1977), y un bajo número fue encontrado en los oviductos alrededor del momento de la ovulación (Hawk y Conley, 1975).

En suma, Lightfoot y Restall (1971; citado por Hawk y Conley, 1975) obtuvieron pruebas de que las contracciones eran parcialmente responsables de mover a los espermatozoides dentro del cervix anterior. De esta manera, se inhibe el establecimiento de reservorios espermáticos en las criptas cervicales después de la inseminación, se reduce el número de espermatozoides en los oviductos cercano al momento de la ovulación, y así se disminuiría la tasa de fertilización (Quinlivan y Robinson, 1969; Hawk, 1983; citados por Hawk y col., 1987).

#### 4.6. PRESERVACIÓN DE SEMEN

La preservación del semen ha sido de interés desde que la IA fue considerada. El objetivo de su preservación es poder dilatar el tiempo que media entre la colección del semen y su deposición en el tracto genital femenino, sin afectar el potencial fecundante de los espermatozoides y posibilitando el traslado de los gametos masculinos a lugares distantes (Gil, 2003<sub>2</sub>).

##### 4.6.1. Tipos de preservación seminal

Hay dos tipos bien diferenciados de preservación de semen: la preservación líquida (de mediano plazo) y la congelación (de largo plazo).

La disminución de la temperatura permite reducir o detener el metabolismo de los espermatozoides y por ende, prolongar su vida útil (Salamon y Maxwell, 1995).

##### 4.6.1.1. Preservación líquida del semen

Mediante la refrigeración, el semen mantiene su capacidad fecundante, con una aceptable fertilidad aún varias horas luego de extraído. El descenso de la temperatura a 15 ó 5°C permite la reducción reversible de la motilidad y actividad metabólica de los espermatozoides (Menchaca y Pinczak, 2003; Pinczak y Menchaca, 2007).

La preservación a 15°C resulta adecuada para periodos más breves (6-12 horas), en cambio la preservación a 5°C se adapta mejor para la preservación más prolongada. La motilidad de los espermatozoides se puede mantener por varios días a 5°C, sin embargo la fertilidad del semen de carnero, utilizado para IA cervical, declina a un ritmo de 10-35% por día de almacenamiento, siendo de 24 horas el periodo máximo aceptable en ovinos (Evans y Maxwell, 1987). El almacenamiento de semen de carnero a 5°C parece influir de menor manera sobre ciertos parámetros estudiados de viabilidad espermática que el almacenamiento a 20°C (Paulenz, 2004).

#### 4.6.1.2. Preservación de semen por congelación

FAC

La preservación de semen a temperaturas bajo cero grado centígrado (-196°C en nitrógeno líquido) hace que las reacciones metabólicas de los espermatozoides queden detenidas. De esta manera el semen se puede conservar durante tiempo ilimitado, preservando así, genes para uso futuro (Evans y Maxwell, 1987).

La fertilidad relativamente baja del semen congelado, después de la IA cervical, relacionada con la reducida viabilidad de los espermatozoides luego de la descongelación (Evans y Maxwell, 1987), limitó el uso de esta tecnología (Maxwell y Watson, 1996). Fue desde la elaboración del método laparoscópico para la inseminación intrauterina, que ha tenido un incremento estable en el número de ovejas inseminadas con semen congelado (Maxwell y Watson, 1996).

#### 4.6.2. Diluyentes ó extensores para la preservación de semen

El plasma seminal solo proporciona una protección limitada a los espermatozoides contra los cambios de temperatura. Por ello, es necesario extender el semen en diluyentes especiales para almacenarlo a temperaturas reducidas (Salamon y Maxwell, 1995).

Los diluyentes o extensores seminales son un conjunto de sustancias naturales o sintéticas que preservan la viabilidad y fertilidad del semen, posibilitando el procesamiento y almacenamiento de los espermatozoides hasta la inseminación (Olivera y col., 2007<sub>3</sub>).

La dilución del semen contempla, además del aumento de volumen, la protección contra el frío y el mantenimiento del pH, que se ve amenazado por el ácido láctico producido por el metabolismo espermático (Durán del Campo, 1993).

Las características físico-químicas principales de un diluyente son:

Debe aportar **nutrientes** capaces de proporcionar energía suficiente para el mantenimiento metabólico de la célula espermática (Maxwell y Salamon, 1993).

Debe amortiguar el **pH**. El plasma seminal se mantiene a un pH muy próximo a 7,0 (Evans y Maxwell, 1987), con un rango de “tolerancia espermática” de 6,5 a 7,5 (Maxwell y Salamon, 1993). Las desviaciones del pH, hacia la alcalinidad o la acidez, disminuirán la viabilidad de los espermatozoides.

Debe controlar la **presión osmótica**, que varía según la concentración de solutos en el medio. Tanto los medios hipotónicos como hipertónicos son peligrosos para los espermatozoides, permaneciendo mas mótils en medio isotónicos con el plasma (Evans y Maxwell, 1987).

Debe procurar la **inhibición del desarrollo microbiano**. El problema de la contaminación y crecimiento bacterial en el semen durante el almacenamiento refrigerado fue superado luego del descubrimiento y aplicación de antibióticos (Maxwell y Salamon, 1993).

El **frío** es un elemento prácticamente imprescindible en todos los diluyentes. La disminución de la temperatura reduce el metabolismo de los espermatozoides con la correspondiente caída de la producción de ácido láctico. La reducción del metabolismo espermático, a 2-5°C, contribuye a prolongar la viabilidad de los espermatozoides. Al calentar de nuevo la muestra, se restaura la motilidad y los espermatozoides permanecen fértiles (Evans y Maxwell, 1987).

#### 4.6.3. Diluyente Piedra Mora® (2008)

Luego de evaluar in-vitro once diluyentes de preservación de semen de carnero a 5°C en base a leche descremada, Fiser o INRA® 96 y sus asociaciones con yema de huevo y/o glicerol, y cinco de estos in-vivo, Fierro (2005) concluyó que el agregado de 2% de glicerol a diluyentes en base a leche UHT con 5% de yema de huevo como único aditivo, aportaría cierto grado de seguridad frente a eventuales fluctuaciones de temperatura en la refrigeración seminal.

Es así que se avala y registra el uso del diluyente Piedra Mora® (2008), para la preservación de semen en estado líquido. El mismo es elaborado en base a leche descremada UHT, con el agregado de 5% de yema de huevo fresco de gallina, 2% de glicerol, y antibióticos (100.000 UI de penicilina G sódica y 0,1 gr. de dihidroestreptomicina en 100 ml. de diluyente). Araujo y col. (2006), concluyeron que el diluyente Piedra Mora® podría utilizarse para refrigerar semen hasta las 48 horas de preservación con resultados aceptables de concepción luego de IA cervical de ovejas en celo espontáneo.

#### 4.7. FERTILIDAD DEL SEMEN PRESERVADO LÍQUIDO A 5°C

La dilución del semen de carnero en condiciones prácticas de manejo para la inseminación artificial, trae aparejado una disminución gradual de la motilidad progresiva y de la viabilidad del semen (Castrillejo y Rodríguez, 1982). La existencia de grandes diferencias entre resultados obtenidos por diversos investigadores, hace muy difícil una definición clara sobre la fertilidad alcanzada por el semen preservado en estado líquido.

Evans y Maxwell (1987) encontraron que la motilidad de los espermatozoides se podía mantener varios días a 5°C, sin embargo, la fertilidad del semen de carnero utilizado para inseminación cervical, declina a un ritmo de 10 a 35% por día de almacenamiento, siendo de 24 horas el período máximo de conservación para obtener un grado aceptable de fertilidad. Menchaca y col. (2005), consiguieron aceptables tasas de preñez al usar semen de carnero almacenado a 5°C por 12 horas vía cervical, pero el almacenamiento por 24 horas afectó severamente la tasa de concepción con 20 unidades porcentuales menos de fertilidad que la obtenida con semen fresco. Por otro lado, Fierro y col. (2005) y Araujo y col. (2006), utilizando el diluyente Piedra Mora® consiguieron preservar la calidad seminal hasta por 48 horas con resultados de fertilidad vía cervical y celo natural inferiores, aunque biológicamente no muy alejados a los alcanzables con semen fresco. Sin embargo, la fertilidad no se vio afectada cuando se utilizó este diluyente para diluir semen fresco, ni se observaron diferencias de fertilidad entre las 24 y 48 horas de preservación a 5°C con este diluyente.

Independientemente del diluyente, la tasa de dilución, la temperatura o las condiciones de almacenamiento, los espermatozoides sufren un deterioro a medida que aumenta el tiempo de almacenamiento. Se producen cambios en las células espermáticas que incluyen la reducción

de motilidad, integridad morfológica y fertilidad, acompañados de una disminución de la supervivencia de los espermatozoides en el tracto reproductor de la hembra y un aumento de las pérdidas embrionarias (Maxwell y Salamon, 1993). Lopyrin (1971; citado por Maxwell y Salamon, 1993) determinó que los espermatozoides preservados en forma líquida por 24 horas sobrevivieron por 22-23 horas en el canal cervical a diferencia de semen fresco que lo hizo por 27 horas, luego de una IA cervical.

Se ha reportado inadecuado transporte espermático del semen preservado a través del tracto reproductivo de la hembra de pequeños rumiantes luego de IA cervical, por inhabilidad para penetrar el cervix (Lopyrin y Loginova, 1958; citado por Gillan y col., 2004), la unión uterotubal o ambas estructuras (Mattner y col., 1969; Platov, 1983; citados por Gillan y col., 2004). La barrera que ofrece el cervix uterino al transporte espermático del semen preservado refrigerado es una limitante que impide obtener buenos resultados de fertilidad (Fernández Abella y col., 1998). Salamon y col. (1979), demostraron que la capacidad fertilizante de algunos espermatozoides almacenados refrigerados es retenida hasta por 10 días, pero cuando la IA cervical es realizada, la fertilidad disminuye sustancialmente luego de 3 días de almacenaje, implicando claramente que el transporte espermático es uno de los mayores problemas en el semen de carnero almacenado en forma líquida. Sin embargo, la fertilidad del semen preservado puede incrementarse si la profundidad de IA cervical es aumentada (Evans y Maxwell, 1987; Gillan y col., 2004).

Los espermatozoides impedidos de llegar al lugar de fecundación o participar en ella, aún cuando permanecen mótils luego de la preservación, deben estar comprometidos de alguna manera en su funcionalidad (Gillan y col., 2004). Existe una reducción significativa de la motilidad individual con el aumento de tiempo de almacenamiento líquido, pero también se afecta el tipo de movimiento, debido a una alteración del axonema de la cola del espermatozoide (Watson, 1995; citado por Gillan y col., 2004), así como de todos los parámetros cinéticos de los espermatozoides de carnero (Moses y col., 1995; citado por Gillan y col., 2004). La motilidad también puede disminuir debido a una alteración en la habilidad de producir energía, por pérdida de estructura de las mitocondrias de la pieza intermedia luego de la preservación (Watson, 1979; citado por Gillan y col., 2004), lo que provoca una disminución en la tasa respiratoria del espermatozoide (Windsor y White, 1995; Windsor, 1997; citados por Gillan y col., 2004). Windsor (1997; citado por Gillan y col., 2004) demostró que la respiración mitocondrial en el espermatozoide es importante para que penetre el cervix, y que una lesión así contribuye con la pobre fertilidad en ovejas luego de la IA cervical con semen preservado. En su conjunto, la alteración en la cinética espermática y la lesión mitocondrial que ocurren durante la preservación de semen puede explicar el deterioro del transporte espermático, resultando en la muerte prematura de un gran número de espermatozoides preservados en las partes bajas del tracto de la hembra luego de la deposición cervical o vaginal (Gillan y col., 2004).

Los resultados de fertilidad con semen preservado a temperatura de refrigeración (4-5°C) por 24 horas han variado entre 10 y 73% (Fierro, 2005).

#### 4.8. PRESERVACIÓN SEMINAL E IATF

Los programas de mejoramiento genético están basados en la selección de animales genéticamente superiores y la difusión de sus genes, y existen biotecnologías disponibles que asisten a ese fin (Olivera y col., 2007<sub>3</sub>).

El uso de semen conservado por más de 24 horas permitiría el traslado a distancias regionales, evitándose el uso de semen congelado, implicando así, menores costos y necesidades de conservación. Esto permitiría su utilización por un mayor número de productores, facilitando el traslado del semen y evitando el transporte de los animales (Fernández Abella y col., 2001). Su uso, diluido en fresco o refrigerado, podría ser una alternativa cuando se usa para la IA durante un breve período luego de la colecta (Paulenz y col., 2002). La refrigeración de semen permite la opción de utilizar reproductores de alto valor genético y económico, durante una estación de servicios cada vez mas corta y concentrada que busca incrementar los beneficios del fotoperíodo favorable del otoño, con una posibilidad cada vez más difícil de llevar el carnero elegido a los establecimientos interesados, sumado a los costos del traslado de los animales, el costo indirecto del tiempo empleado en estos manejos, el estrés generado sobre el animal que en la mayoría de los casos se tornan perjudiciales para la calidad seminal, entre otras cosas (Fierro y col., 2007; Olivera y col., 2007<sub>3</sub>).

El proceso de capacitación espermática es indispensable para que ocurra la fertilización, pero con la refrigeración a 5°C por 24 horas, se inducen niveles de capacitación espermática que cambian la fertilidad en programas de IA (Rodríguez Almeida y col., 2008). Se ha reportado que es probable que los espermatozoides adelantados en su capacitación tengan una vida media más breve (Watson, 2000; citado por Gil, 2003<sub>2</sub>). Si la sobrevida del espermatozoide es reducida por una capacitación prematura, este solo tendrá poco tiempo para realizar la fertilización (Fierro, 2005). Esto estaría induciendo a realizar la IA en forma más tardía en el celo, es decir que los espermatozoides deban depositarse lo más cercano posible al momento de la ovulación (Gillan y col., 2004).

Usando semen preservado 12 horas a 5°C en la IA de ovejas Merino sincronizadas con progesterona (6 días de MAP+delprostenate+eCG), Menchaca y col. (2005) obtuvieron tasas de preñez similares realizando IA sobre celo detectado o IATF a 48 horas de finalizado el tratamiento ( $P>0,05$ ), pero esta cayó cuando la IATF se hizo luego de las 54 horas ( $P<0,05$ ). En tratamientos cortos de progesterona la ovulación ocurre alrededor de 60 horas de retiradas las esponjas (Menchaca y Rubianes, 2004). Probablemente a las 48 horas pos tratamiento, la IA se realizó en un momento cercano a la ovulación, pero a las 54 horas la IA fue realizada de forma inmediata sobre la hora de ovulación y podría ser que exista una pequeña dispersión en el período en que ocurren las ovulaciones en una majada, y esto afecte la preñez cuando se realiza IA cervical sobre la hora de ovulación inducida (Menchaca y col., 2005), y que es necesario un determinado tiempo para que se dé el transporte y reservorio espermático a través del tracto reproductor femenino.

Por otra parte, en ovejas Corriedale sincronizadas con progesterona (MAP 12 días) e inseminadas con semen refrigerado 24 horas, Fernández Abella y col. (2001) cuantificaron los espermatozoides presentes en el cervix uterino 2 horas luego de realizar la IA, encontrando



un 35%, 20% y 50% del total con IATF a las 46 horas, 50 horas, e IA con semen fresco respectivamente (NS). En útero, existió un menor número de espermatozoides en la IATF a 50 horas de retiradas las esponjas. La fertilidad fue superior a las 46 horas respecto de las 50 horas (Fernández Abella y col., 2003). Estos autores concluyen que adelantando la IA hacia las 46 horas, mejoraría la fertilidad por haber más espermatozoides en el útero luego de la inseminación, debido a que existiría una menor velocidad de pasaje para semen preservado. Esto ha sido demostrado por Brückner y Kampfer (1984; citado por Maxwell y Salamon, 1993) comparando semen fresco y refrigerado, a partir de espermatozoides marcados con radiactividad. Es decir, que la inseminación con semen refrigerado debería llevarse a cabo 12-14 horas antes de la ovulación (Fernández Abella y col., 2003), siendo mas temprano en el celo que la aceptada como óptima para semen fresco.

El protocolo Synchrovine<sup>®</sup> ha sido utilizado en IATF asociado a semen fresco, pero muy poco se conoce de su desempeño en la combinación con semen preservado a 5°C. Fierro y col. (2007), experimentaron esta asociación con IATF a las 46 horas alcanzando una concepción sensiblemente inferior al semen fresco. De este trabajo se concluye que no se conoce si este resultado puede mejorar variando el momento de IATF.

La información aquí revisada plantea la interrogante de si es conveniente adelantar o atrasar la hora de servicio, respecto al momento óptimo con semen fresco, para mejorar el resultado de IATF con semen refrigerado utilizando el protocolo de sincronización de celos con PGF2 $\alpha$  (Synchrovine<sup>®</sup>). Por un lado la velocidad y tasa de transporte espermático del semen preservado refrigerado es inferior y se ha visto que puede ser disminuida por el celo inducido con PGF2 $\alpha$ . Por otra parte, la capacitación espermática avanzada del semen refrigerado lleva a una disminución temporal de su capacidad fecundante, por lo que se haría necesario depositar este lo más cercano al momento de la ovulación.

#### 4.9. PÉRDIDAS REPRODUCTIVAS ENTRE EL NO RETORNO AL SERVICIO Y LA FERTILIDAD LOGRADA A LA ECOGRAFÍA

Fernández Abella (1993) define a la mortalidad embrionaria (ME) como la pérdida del producto obtenido entre la concepción y el fin del período embrionario de diferenciación (aproximadamente un mes de gestación). En términos generales, es el proceso derivado en la muerte del embrión (Durán del Campo, 1980<sub>2</sub>).

En términos conceptuales, el resultado final de fertilidad (ovejas gestantes/ovejas servidas) que se observa al momento del diagnóstico ecográfico en una majada que fue sometida a IA, responde a varios eventos. Primeramente, ovejas en las que hubo fertilización, reconocimiento materno de embriones y éxito en la implantación de los mismos; así, estas ovejas no retornan al servicio y presentan embriones al diagnóstico ecográfico. En segunda instancia, ovejas en las que no hubo fertilización, o hubo fertilización pero sin reconocimiento materno de la gestación; en este caso, son ovejas que retornan al servicio entre los días 14 a 21 posteriores a la IA. Y por último, ovejas en las que hubo fertilización y reconocimiento materno de los embriones, pero con pérdidas embrionarias totales posteriores al reconocimiento de la gestación; así, retornan al servicio pasados los 21 días pos IA o no presentan embriones en el diagnóstico ecográfico (Olivera y col., 2007<sub>2</sub>).

De esta manera, se podría pensar que las diferencias que se observan entre el número de ovejas que no retornan al servicio en los días esperados (antes del día 21 pos IA) y el número de ovejas que se encuentran gestantes al diagnóstico por ecografía, pueden otorgarse a fallas en la detección de celos y/o a pérdidas embrionarias totales posteriores al reconocimiento materno. Si se asumen fallas en la detección de los celos similares (aplicadas sobre mismo ambiente, majada y método de manejo) independientemente a la tecnología de IA utilizada, las diferencias de fertilidad observadas entre el no retorno al servicio y el diagnóstico ecográfico podrían deberse a diferencias en la “viabilidad embrionaria” surgidas de las biotecnologías aplicadas (Olivera y col., 2007<sub>2</sub>).

La ME según cuando ocurra puede dar como resultado una oveja “fallada” al diagnóstico de gestación o a fin de época de parición. Es por esto que se puede hablar de una ME precoz o temprana, proceso que ocurre antes de los 12 días posteriores al servicio y no modifica la extensión del ciclo estral siguiente; y ME tardía, cuando ocurre posteriormente a los 12 días del servicio, provocando la extensión del ciclo estral mas allá del período normal (Durán del Campo, 1980<sub>2</sub>; Durán del Campo, 1993).

En apareamientos naturales se estima que la ME precoz representa el mayor porcentaje de las muertes (15-30% de los ovocitos liberados), mientras que las pérdidas tardías de embriones o fetos son de menor magnitud (5-7%) (Edey, 1969; Berain, 1984; Wilkins y Croker, 1990; citados por Fernández Abella, 1993).

#### 4.9.1. Principales causas de las pérdidas embrionarias

Durante el período de gestación, el embrión y luego el feto, estará sometido a influencias directas e indirectas del ambiente (Durán del Campo, 1980<sub>1</sub>).

La **temperatura** es una considerable causa de ME en ovejas cuando estas son mantenidas a temperaturas de 35 a 42°C durante varios días consecutivos pos servicio. Se ha demostrado que este efecto se ejerce más sobre los tejidos maternos que sobre el propio embrión (Dutt, 1954; Dutt, 1963; citados por Durán del Campo, 1980<sub>2</sub>). De las investigaciones realizadas por Thwaites, citado por Durán del Campo (1980<sub>2</sub>), se demuestra que el embrión es más susceptible al calor en los primeros estadios de división, es decir cuando aún se encuentra en el oviducto (hasta las 72 horas de gestación); coincidiendo con lo anteriormente mencionado, la muerte podría deberse a cambios ambientales en el oviducto. Si bien el **estrés por calor** afectaría considerablemente la ME, las condicionantes que puedan darse normalmente en el campo no son tan extremas como para aparejar grandes pérdidas. No obstante, ocurren picos de calor durante la estación de servicios en nuestro país que pueden afectar la fertilidad de las majadas, creando condiciones anormales en los genitales de las ovejas antes o durante el servicio, y en los primeros días de gestación (Durán del Campo, 1980<sub>2</sub>). A partir de sus trabajos, Kleemann y Walker (2005) determinaron que hay indicios de que las altas temperaturas ambientales pueden influir en la supervivencia embrionaria, al encontrar una correlación positiva para la tasa de retorno al servicio y negativa para la fertilidad, influenciada por el número de días con temperaturas mayores o iguales a 32°C durante la encarnerada. Sumado a esto, debe considerarse el efecto del calor ambiental en majadas sometidas a IA. Los servicios de IA se realizan cuando la temperatura ambiental ya comenzó a incrementarse en el día, y las ovejas se han desplazado a veces varios kilómetros. En cambio, en el servicio

natural, la mayor parte se realiza durante las horas frescas y las ovejas permanecen más estáticas (Durán del Campo, 1980<sub>2</sub>).

Por otra parte, las altas temperaturas asociadas a condiciones de elevada **humedad ambiental** determinan anomalías a nivel del espermatozoides que llevan a incrementar la ME, perdiendo primero la capacidad de engendrar un embrión viable antes que su capacidad fecundante (Rathore, 1968; Rathore, 1970; Waites y Ortavant, 1968; citados por Fernández Abella, 1993). Cuando esta es mayor al 70% tiene incidencia potenciada de los efectos negativos de las altas temperaturas (Ingraham, 1974; citado por Fernández Abella, 1993).

Las **precipitaciones** hídricas fuertes (> 50 mm) bloquean el celo, reducen la tasa ovulatoria e incrementan la ME precoz (Doney y col., 1973; Gunn y Doney, 1973; citados por Fernández Abella, 1993). La lluvia también afecta las pérdidas embrionarias debido al **efecto estresante del frío** sobre la oveja mojada (Fernández Abella, 1993). Griffiths y col. (1970) encontraron que el estrés por frío resultó en una considerable disminución de la tasa ovulatoria pero el efecto sobre la mortalidad embrionaria fue menos exacto, con alguna diferencia en la pérdida parcial de embriones (muerte de uno o más embriones en ovejas con fertilización múltiple). Así mismo, Fernández Abella y col. (2008) no encontraron diferencias en las tasas de fertilización y concepción, así como las pérdidas embrionarias obtenidas, entre ovejas sometidas a régimen pluviométrico artificial y las que no lo estuvieron, pero con un nivel pluviométrico natural para el periodo del ensayo de 102 mm mensuales en promedio.

La **nutrición** tendría efectos negativos en casos muy agudos. Puede estimarse que largos periodos de restricción alimenticia y/o muy intensa al comienzo de la gestación, pueden provocar aumento de la mortalidad embrionaria (Durán del Campo, 1980<sub>2</sub>). Edey (1976; citado por Fernández Abella y col., 2007) reportó pérdidas embrionarias del 16% en ovejas Merino mantenidas en un estrés nutricional severo durante los primeros 20 días de preñez. Fernández Abella y Formoso (2007) encontraron una evidente sensibilidad de la actividad ovárica según la dotación (asignación del forraje) y composición de la pastura (forraje con gramíneas y leguminosas de calidad) a la que son sometidas las ovejas durante la época de servicios, donde la disponibilidad de pastura (con cosechas de mejor calidad) repercutió sobre la fertilización con un aumento en las tasas de concepción y ovulatoria. Pero cuando la disponibilidad fue mayor y con menor calidad, las tasas de fertilización y concepción se vieron afectadas de forma negativa (Fernández Abella y Formoso, 2007). Las altas dotaciones reducen la actividad ovárica e incrementan las muertes embrionarias (Fernández Abella y Formoso, 2007). Se ha descrito que la subnutrición reduce la sensibilidad del endometrio uterino a la acción de la progesterona alterando el ambiente uterino en detrimento de la sobrevivencia embrionaria (Abecia y col., 2006). Así mismo, el exceso de gordura ha sido también indicado como factor contribuyente al aumento de la mortalidad embrionaria (Durán del Campo, 1980<sub>2</sub>). En ovejas mantenidas sobre un plano alto de nutrición, las bajas tasas de gestación parecen ser debido a concentraciones plasmáticas de progesterona inadecuadas (Parr y col., 1987; citado por Ashworth y col., 1989), encontrándose relación entre la concentración de progesterona en plasma y la sobrevivencia de los embriones de ovejas servidas naturalmente (Ashworth y col., 1989).

El **estado corporal** en las ovejas, determina su desempeño reproductivo. Fernández Abella y Formoso (2007) encontraron que la fertilidad y supervivencia embrionaria, fueron

significativamente inferiores en ovejas de condición 2,25. Se registraron pérdidas embrionarias de 22,7% y 12,5% ( $P < 0,05$ ) para ovejas en condición corporal de 2,25 y 2,50-2,75 respectivamente (Fernández Abella y Formoso, 2007). En ovejas con estado corporal mayor a 3 puntos, las pérdidas embrionarias no explican la fertilidad obtenida, y aumentan al incrementarse la tasa ovulatoria de la oveja (Fernández Abella y Formoso, 2007).

El estrés ha sido otro de los factores intensamente estudiado como causante del aumento de la mortalidad embrionaria. Aunque no ha sido posible demostrar tal reacción en los ovinos como en otras especies sobre la mortalidad embrionaria, es de esperar que el “**estrés emocional**” producido por el manejo intensivo de la majada, el arreo, los gritos, el ruido, la presencia de perros y sus ladridos, el encierro en corrales y tubo, así como la sujeción misma de la oveja, lo cual se da preferentemente durante los trabajos de inseminación en ovinos, podría influir en sí mismo en la mortalidad embrionaria. Éste tipo de estrés podría influir a través de su efecto sobre la corteza adrenal y el aumento de las hormonas corticoadrenales en la circulación general (Durán del Campo, 1980<sub>2</sub>).

Las **parasitosis** no han sido responsabilizadas directamente de afectar la vida embrionaria, pero si algunos parasiticidas (Durán del Campo, 1980<sub>2</sub>). Sin embargo, Fernández Abella y col. (2006) encontraron un efecto marcado del nivel de nematodos gastrointestinales por HPG (huevos por gramo) sobre la tasa ovulatoria, pérdidas embrionarias y fecundidad. Para altas cargas parasitarias, compatibles con las existentes a nivel de campo (Fernández Abella y col., 2000) se registraron pérdidas embrionarias de 20% a diferencia del grupo con bajo nivel de infestación que presentó un valor (5,6%) que es considerado piso de pérdidas en la especie ovina (Edey, 1969; 1976; Wilkins y Croker, 1990; citados por Fernández Abella y col., 2006).

Las **enfermedades febriles** son factores importantes, actuando fundamentalmente a través del aumento de temperatura corporal. La fiebre aftosa como ejemplo, puede provocar en función de su elevada hipertermia un considerable aumento de la mortalidad embrionaria (Durán del Campo, 1980<sub>2</sub>). Los **problemas podales**, son un claro ejemplo de estas enfermedades, especialmente el Foot-rot. En animales con esta enfermedad, puede observarse pérdida de peso y disminución de la eficiencia reproductiva, tanto en carneros como en ovejas (Riet, 1987). La trasmisión del Foot-rot está asociada fundamentalmente a humedad y temperatura ambiente, ocurriendo en Uruguay principalmente en otoño, en primavera y con importantes brotes en veranos lluviosos (Riet, 1987; Mederos y col., 2001).

En cuanto a diferencias en la **edad de la oveja**, la subfertilidad de las corderas se ha reconocido por mucho tiempo como el mayor limitante tanto para la vida productiva como el avance genético en los programas de cría (Dyrmundsson, 1973; citado por Beck y col., 1996). Existen comparaciones que indican que la tasa de ovulación es menor (Dyrmundsson, 1983; citado por Beck y col., 1996) y la tasa de mortalidad embrionaria es mayor en corderas a diferencia de ovejas maduras (Quirke y col., 1983; citado por Beck y col., 1996), con mayor incidencia de mortalidad embrionaria tardía en las corderas (Keane, 1974; Edey y col., 1978; Langford, 1986; Beck y Davies, 1994; citados por Beck y col., 1996), posiblemente causado por insuficiencia luteal, con una concentración plasmática de progesterona significativamente menor en corderas, en los días 15 a 30 de gestación (Davies y Beck, 1993; citado por Beck y col., 1996).

En cuanto al uso de **biotecnologías** en ovejas, Lunstra y Christenson (1981) concluyeron que la sincronización de ovejas produce aceptables porcentajes de ovulación, pero éstas sufren un notable aumento de las pérdidas reproductivas, primordialmente debido a una disminución en la tasa de fertilización y aumento de la mortalidad embrionaria, acompañados de una disminución del número de espermatozoides por óvulo, disminución de la cantidad de espermatozoides en el oviducto, un estado avanzado de desarrollo embrionario temprano y una mayor variación entre la fase de desarrollo embrionario y del tamaño del CL en la oveja. Evaluando la magnitud absoluta de las pérdidas de fertilidad (diferencia absoluta entre el valor de no retorno al servicio y la fertilidad a la ecografía) para diferentes tecnologías de IA planteadas, Olivera y col. (2007<sub>2</sub>) encontraron que las pérdidas promediaron un 30% (rango entre 8-66%) según edad de la oveja (nulípara vs. múltipara), tipo de celo (natural vs. PGF2 $\alpha$  vs. FGA-eCG), vía de IA (cervical vs. intrauterina) y tipo de preservación seminal (fresco vs. congelado). En ese estudio el protocolo de sincronización de celo e IATF con PGF2 $\alpha$  presentó mayores pérdidas de fertilidad que el de FGA-eCG en ovejas nulíparas inseminadas con semen fresco y en ovejas múltiparas inseminadas con semen congelado para la vía intrauterina. A su vez, se observó que la IA con semen preservado congelado presentó mayores pérdidas de fertilidad que con semen fresco en todos los lotes comparados de IA vía cervical, excepto en ovejas múltiparas con IATF con FGA-eCG, donde los resultados fueron similares.

Estos autores hipotetizaron que las diferencias observadas en pérdidas de fertilidad podrían deberse por un lado a la calidad de los ovocitos generados por el protocolo de PGF2 $\alpha$  utilizado, y/o a no tener aún ajustado el momento óptimo de inseminación del protocolo para diferentes tipos de preservación seminal o vías de IA (Olivera y Gil, 2006; Gil y col., 2006). Por otra parte las diferencias de fertilidad observadas entre semen fresco y congelado podrían deberse a la menor calidad de los espermatozoides y por ende de supervivencia de los embriones generados por estos protocolos de preservación (Gillan y col., 2004). Es sabido que la condición de los gametos al momento de la fertilización afecta la sobrevivencia embrionaria (Maxwell y Salamon, 1993). Una disminución en la fertilidad y aumento simultáneo del desarrollo de anomalías embrionarias asociado a espermatozoides envejecidos se han observado en muchas especies, y se ha focalizado sobre los posibles cambios en el genoma haploide debido al envejecimiento de la célula espermática (Salisbury y Hart, 1970; Salisbury y col., 1976; citados por Maxwell y Salamon, 1993). La pérdida embrionaria podría incrementarse cuando espermatozoides preservados envejecen aún más en el tracto reproductor de la hembra resultando en una asincronía entre la edad del espermatozoide y la del ovocito (Salamon y col., 1979).

La mortalidad embrionaria temprana es considerada como una de las principales causas de baja fertilidad en ovejas luego de la inseminación con semen preservado, provocando: desarrollo y morfología anormal del cigoto, aumento de la tasa de retorno al servicio, y menor tasa de mellizos después de la IA (Rabocev, 1965; 1966; Lopyrin y Manujlov, 1967; Lopyrin y Rabocev, 1968; Lopyrin, 1971; citados por Maxwell y Salamon, 1993).

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

Este ensayo se llevó a cabo en el establecimiento “Piedra Mora” perteneciente a la familia Filliol Barreiro, ubicado en el departamento de Paysandú, paraje Guarapirú, en el kilómetro 100 de la Ruta Nacional 26 (latitud Sur 32° 05', longitud Oeste 57° 10'), sobre suelos de basalto profundo (60%) y superficial (40%).

El trabajo de campo se realizó durante la estación reproductiva en los meses de Marzo a Junio de 2007, con una majada comprendida por 365 ovejas múltiparas de raza Merino Australiano, con un estado corporal promedio de  $3,2 \pm 0,2$  (escala 0 a 5, Rusell y col., 1969). Todas las ovejas se mantuvieron bajo las mismas condiciones de manejo, y pastoreando sobre campo natural con buena disponibilidad de forraje (superior a 1000 Kg. de MS/há), determinado por el método de doble muestreo (Haydock y Shaw, 1975), y con acceso de agua “ad libitum”.

Quince días previos al inicio del ensayo, se realizó una dosificación con un endectocida combinado (ivermectina 0,2 gr., triclabendazole 10 gr., y levamisol clorhidrato 8 gr., cada 100 ml. de producto; a razón de 1 ml/10 kg. de PV; Triplemic<sup>®</sup>, Microsules S.A.; Montevideo, Uruguay) y un baño de inmersión preventivo contra ectoparásitos (Pirimifós, Elimix<sup>®</sup>, Laboratorio Coopers; Montevideo, Uruguay), tanto a machos como a hembras. Junto con la dosificación endectocida se realizó una vacunación preventiva contra clostridiosis (Ultravac<sup>®</sup>, Laboratorio Merial; Montevideo, Uruguay) y un baño podal preventivo con sulfato de zinc al 10% por 15 minutos, a todos los animales del ensayo. Además se hizo un examen ginecológico por ecografía transrectal a todas las hembras (Aloka<sup>®</sup> 500, 5,0 MHz; Japón), retirándose del lote de estudio a aquellas ovejas que no se encontraban aptas para la reproducción.

### 5.1. FASE 1: SINCRONIZACIÓN DE CICLOS ESTRALES

El protocolo de sincronización de celos consistió en la aplicación de 2 dosis de PGF2 $\alpha$  separadas 7 días (protocolo Synchrovine<sup>®</sup>). Se utilizaron dosis de 125  $\mu$ g de un análogo sintético de PGF2 $\alpha$  (Cloprostenol-DL, SINCRON-DL<sup>®</sup>, Laboratorio Uruguay; Montevideo, Uruguay). Todas las ovejas fueron tratadas con este protocolo de sincronización y se asignaron de forma aleatoria a cada uno de los siguientes grupos:

- Grupo 1: “**Synchrovine<sup>®</sup>-42R**” (n: 89): IATF a las 42 horas de la segunda PGF2 $\alpha$  con semen refrigerado por 24 horas.
- Grupo 2: “**Synchrovine<sup>®</sup>-48R**” (n: 89): IATF a las 48 horas de la segunda PGF2 $\alpha$  con semen refrigerado por 24 horas.
- Grupo 3: “**Synchrovine<sup>®</sup>-54R**” (n: 91): IATF a las 54 horas de la segunda PGF2 $\alpha$  con semen refrigerado por 24 horas.
- Grupo 4: “**Control**” (n: 96): IATF a las 48 horas de la segunda PGF2 $\alpha$  con semen fresco.

Para ello, las ovejas fueron identificadas de forma individual por medio de caravanas, y cada grupo fue marcado por medio de pinturas de color para facilitar los apartes que se realizaron durante la aplicación de los tratamientos. Existió una disminución en el número final de ovejas consideradas al inicio del ensayo debido a pérdida de identificación, no aparición en mangas, etc.

## 5.2. FASE 2: COLECTA, PROCESAMIENTO Y PRESERVACIÓN DEL MATERIAL SEMINAL

El semen necesario para realizar la inseminación de la majada se obtuvo de 12 carneros Merino Australiano adultos (entre 2 y 8 dientes definitivos). Estos fueron manejados de forma semi estabulada, en un régimen de alimentación a base de pasturas mejoradas de Lotus y Trébol Blanco y 1,5 kilos diarios de ración por animal (ración para carneros, CADYL; Río Negro, Uruguay), con encierro nocturno. Se realizó la evaluación de aptitud reproductiva de los carneros en las semanas previas al ensayo, con un examen clínico completo y extracción de semen con posterior evaluación individual del material seminal.

El material seminal fue colectado mediante el método de vagina artificial (Durán del Campo, 1993), obteniéndose dos eyaculados por carnero, con un intervalo de 10 a 15 minutos entre ambos.

Cada eyaculado fue evaluado inmediatamente de colectado para su aceptación. Macroscópicamente se evaluó motilidad de masa ( $>$  a 3, escala de 0 a 5; Evans y Maxwell, 1987), volumen ( $\geq$  a 0,75 cc.), color (blanco lechoso ó crema pálido; Evans y Maxwell, 1987) y pureza (sin orina, sangre, contaminación externa, etc.). En el análisis microscópico se evaluó, con dilución previa del semen, la motilidad espermática subjetiva ( $\geq$  a 70% de células con movimiento rectilíneo uniforme) visualizada en un microscopio binocular (Wild<sup>®</sup>, Alemania) y la concentración espermática ( $\geq$  a  $3,0 \times 10^9$  espermatozoides/cc.) por espectrofotometría (Fotómetro Spermacue<sup>®</sup>, Minitüb; Landshut, Alemania).

Luego de la evaluación y aceptación, ambos eyaculados de cada carnero fueron unificados y manejados como único, con el fin de disminuir la variación en fertilidad que existe entre eyaculados de un mismo carnero (Windsor, 1997). Así mismo, se mezclaron los eyaculados de todos los machos, logrando dosis heteroespérmicas, para minimizar el factor carnero en la fertilidad (Windsor, 1997). Posteriormente se evaluó la concentración espermática del semen mezcla (Fotómetro Spermacue<sup>®</sup>, Minitüb; Landshut, Alemania).

A continuación, el semen mezcla se extendió de forma paulatina, en baño maría a 30°C, en diluyente Piedra Mora<sup>®</sup> hasta lograr una dosis inseminante por oveja de  $150 \times 10^6$  espermatozoides totales en un volumen de 0,2 cc. en una relación 1+5 de semen/diluyente, aproximadamente. Una alícuota de semen se mantuvo en fresco para su utilización inmediata sobre el grupo Control, y se procedió a realizar el envasado de las alícuotas restantes en jeringas de plástico de 10 cc., desplazando todo el aire posible, siendo selladas con alcohol polivinílico. Se procedió al enfriamiento paulatino de estas jeringas hasta 5°C en un período de 2 horas. Se preservaron así, en caja isotérmica con refrigerantes a 5°C durante 24 horas hasta su posterior utilización. La temperatura fue controlada con termómetro digital con termo cupla.

Previo a la inseminación, el semen refrigerado se descargó de los envases plásticos, recuperó temperatura y fue manejado a temperatura ambiente, protegido de la luz solar y corrientes de aire. Previo a la IA, se realizó la evaluación microscópica del semen para observar motilidad subjetiva.

### 5.3. FASE 3: INSEMINACIÓN ARTIFICIAL A TIEMPO FIJO

El trabajo de inseminación artificial se realizó por medio del método cervical, que comprende la localización del cervix y la deposición del semen dentro del mismo, o lo más cerca posible (Durán del Campo, 1980<sub>1</sub>), utilizando un vaginoscopio tubular cónico con microlámpara situada en el extremo posterior y pistola de inseminación multidosis (Walmur<sup>®</sup>, Instrumentos Veterinarios; Montevideo, Uruguay). La inseminación se realizó en el tubo de ovinos con la sujeción indirecta de la oveja en los laterales del mismo.

Al momento de la IATF, los grupos a inseminarse con semen refrigerado ingresaron juntos y al azar a los bretes, y todas las ovejas fueron servidas a la misma hora promedio (desvío de  $\pm 2$  horas). El grupo Control de IATF con semen fresco fue inseminado aproximadamente 24 horas antes, con el mismo semen e igual dosis por oveja.

### 5.4. FASE 4: SERVICIO DE REPASO

Entre los días 13 a 22 posteriores a la IATF, se realizó un segundo servicio de IA vía cervical a las ovejas que presentaron celo espontáneo (servicio de repaso sobre celo natural) en todos los grupos. El servicio de repaso se realizó con semen fresco sin diluir.

La detección de celo se hizo por medio de capones androgenizados marcadores, de raza Merino Australiano, asignados en una relación del 3% sobre la majada. Los mismos fueron introducidos con la majada por la tarde y retirados en la mañana (12 horas de detección). El protocolo de androgenización consistió en la inyección de un análogo sintético de testosterona (3 dosis de 100  $\mu$ g/dosis con frecuencia semanal; Ciclopentilpropionato de Testosterona i/m, Testosterona Ultra Lenta<sup>®</sup>, Laboratorio Dispert; Montevideo, Uruguay) administrándose la última dosis previo al ingreso de los capones a la majada. Cada tarde, se pintaron con tierra de color en la zona pre-prepucial para la marcación de las ovejas en celo. Los capones fueron mantenidos bajo las mismas condiciones de sanidad y alimentación que las ovejas.

### 5.5. PARÁMETROS EVALUADOS

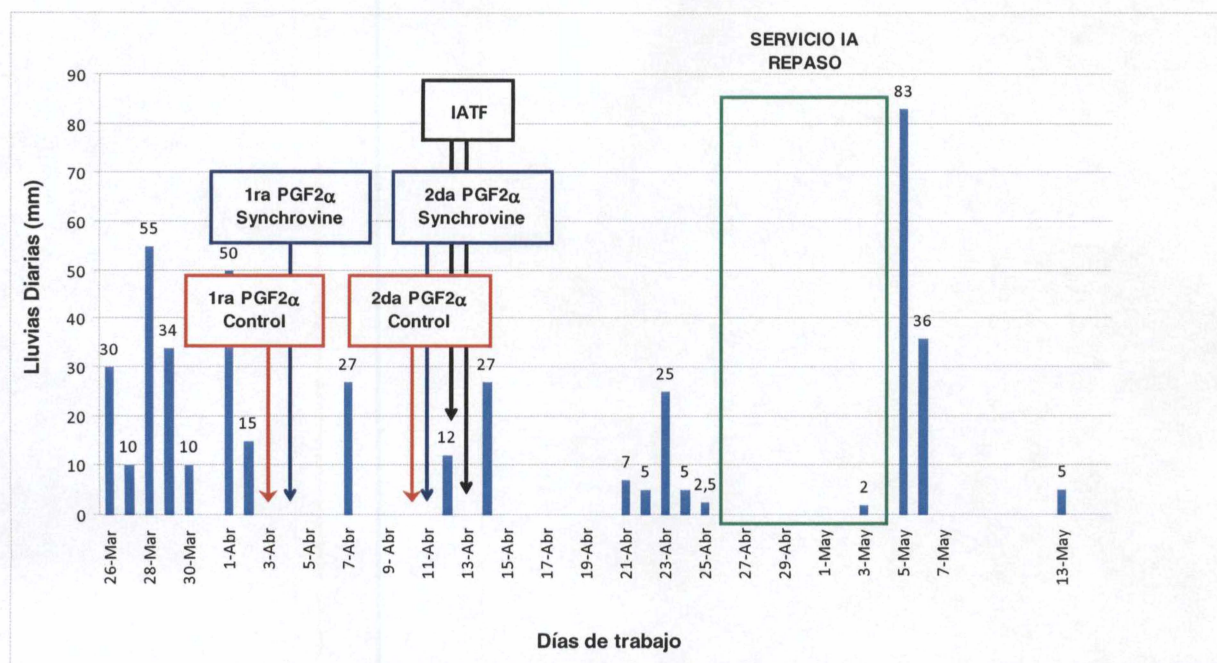
#### 5.5.1. Precipitaciones hídricas

El registro de las precipitaciones hídricas acontecidas en el período de trabajo (15 de marzo al 15 de mayo de 2007), se obtuvo de la base de datos de la Unidad Experimental "Glencoe" del INIA Tacuarembó, por su proximidad con el establecimiento "Piedra Mora".

Para el análisis se tuvieron en cuenta además los promedios mensuales históricos registrados por INIA en la Unidad Experimental "La Magnolia" de Tacuarembó, para los años comprendidos entre 1971 y 2000 (INIA, 2008). Las precipitaciones hídricas acumuladas



durante el período del ensayo, alcanzaron los 476 mm (Gráfica I), siendo superiores al doble respecto al promedio histórico mensual.



Gráfica I: Actividades realizadas y su asociación con las precipitaciones hídricas diarias acontecidas durante el período experimental.

### 5.5.2. Parámetros reproductivos

La sincronización de celos a distintos tiempos de IATF asociado a la preservación de semen fresco y refrigerado, se comparó biológicamente a través de los siguientes parámetros: 1) tasa de no retorno al celo a los 22 días (NR; ovejas que no presentan celo hasta los 22 días pos IATF/total de ovejas tratadas); 2) pérdidas reproductivas absolutas entre el no retorno al celo a los 22 días y la fertilidad por ecografía a los 60 días (Pérdidas; %); 3) tasa de fertilidad (ovejas preñadas por ecografía a los 60 días/ovejas inseminadas); 4) tasa de prolificidad (embriones o fetos ecografiados a los 60 días/ovejas preñadas por ecografía a los 60 días); 5) tasa de fecundidad (embriones o fetos ecografiados a los 60 días/ovejas inseminadas; tasa de fertilidad\*tasa de prolificidad); para el servicio de IATF y para el segundo servicio, por medio de ultrasonografía transabdominal de sonda sectorial multifrecuencia (5Mhz; Animal Profi, Draminski; Interfarmtech, Nueva Zelanda) realizada a los 60 días de la IATF.

Las diferencias observadas entre la tasa de NR y la tasa de fertilidad al diagnóstico ecográfico a los 60 días (Pérdidas), se podrían deber a fallas en la detección de celos y/o a pérdidas embrionarias totales posteriores al reconocimiento materno de la gestación. Para la comparación establecida se asumirá que las fallas en la detección de celos son similares para todos los grupos, por lo tanto, las diferencias porcentuales en Pérdidas se deberían a la diferencia en “viabilidad embrionaria” de los protocolos aplicados (Olivera y col., 2007<sub>2</sub>; Fossati y col., 2008).

### 5.5.3. Análisis estadístico

La comparación de grupos de IATF con semen refrigerado y Control con semen fresco, en las variables NR, Pérdidas (%) y tasa de fertilidad, fueron analizadas mediante el Test de Chi Cuadrado con corrección de Fisher- Yates (Sigel, 1956). Las tasas de prolificidad y fecundidad se analizaron por medio del Test de Brown (Brown, 1988).

## 6. RESULTADOS

### 6.1. COMPARACIÓN EN TÉRMINOS REPRODUCTIVOS DE MOMENTOS DE IATF ASOCIADO A SEMEN REFRIGERADO Y CONTROL CON SEMEN FRESCO DE OVEJAS SINCRONIZADAS CON SYNCHROVINE®.

Los resultados obtenidos en la comparación reproductiva de diferentes momentos de IATF vía cervical utilizando semen preservado a 5°C por 24 horas y grupo Control con semen fresco de ovejas sincronizadas con el protocolo Synchronvine®, se resumen en el Cuadro 1.

Cuadro 1: *Comparación de tres momentos de IATF vía cervical con semen refrigerado y grupo Control de IATF con semen fresco en ovejas multíparas Merino Australiano sincronizadas con Synchronvine®.*

IATF	Synchronvine®-42R (n:89)	Synchronvine®-48R (n:89)	Synchronvine®-54R (n:91)	Control (n:96)
Fertilidad	0,06 <sup>a</sup>	0,24 <sup>b</sup>	0,22 <sup>b</sup>	0,31 <sup>b</sup>
Prolificidad	1,00 <sup>a</sup>	1,00 <sup>a</sup>	1,05 <sup>a</sup>	1,03 <sup>a</sup>
Fecundidad	0,06 <sup>a</sup>	0,24 <sup>b</sup>	0,23 <sup>b</sup>	0,32 <sup>b</sup>

**IATF:** Inseminación Artificial a Tiempo Fijo; **Fertilidad:** ovejas gestantes/ovejas inseminadas, por diagnóstico ecográfico a los 60 días; **Prolificidad:** embriones o fetos ecografiados a los 60 días/ovejas preñadas; **Fecundidad:** embriones o fetos ecografiados a los 60 días/ovejas inseminadas; **Synchronvine®:** dos dosis de PGF2α separadas 7 días (Cloprostenol-DL 125 µg/dosis); **Synchronvine®-42R:** Synchronvine® e IATF a las 42 horas de la segunda PGF2α con semen refrigerado; **Synchronvine®-48R:** Synchronvine® e IATF a las 48 horas de la segunda PGF2α con semen refrigerado; **Synchronvine®-54R:** Synchronvine® e IATF a las 54 horas de la segunda PGF2α con semen refrigerado; **Control:** Synchronvine® e IATF a las 48 horas de la segunda PGF2α con semen fresco.

Letras diferentes en igual fila expresan diferencias significativas (P<0,05).

Se observa que utilizando semen preservado refrigerado a 5°C por 24 horas por vía cervical, la fertilidad y la fecundidad logradas fueron menores cuando la IA se realizó a las 42 horas de la segunda prostaglandina, en comparación con los otros momentos de IATF establecidos para el protocolo Synchronvine® (P<0,05). No se observaron diferencias significativas de prolificidad entre los diferentes momentos de IATF con semen refrigerado comparados (P>0,05).

No se observó una disminución de fertilidad o fecundidad cuando se comparan los resultados de IATF con semen refrigerado (grupos Synchronvine®-48R y Synchronvine®-54R) y semen fresco (grupo Control) (P<0,05).

## 6.2. TASA NO RETORNO AL CELO, FERTILIDAD Y PÉRDIDAS REPRODUCTIVAS TOTALES ENTRE EL NO RETORNO AL CELO Y LA ECOGRAFÍA

Los resultados comparativos de NR al celo, fertilidad y Pérdidas, para cada uno de los momentos de IATF con semen preservado a 5°C por 24 horas y para el grupo Control de IATF con semen fresco, se resumen en el Cuadro 2.

*Cuadro 2: No retorno al celo, fertilidad y pérdidas reproductivas totales entre el no retorno al celo y ecografía en tres momentos de IATF vía cervical con semen refrigerado y grupo Control con semen fresco en ovejas multíparas Merino Australiano sincronizadas con Synchronine®.*

	Synchronine®-42R (n:89)	Synchronine®-48R (n:89)	Synchronine®-54R (n:91)	Control (n:96)
NR	0,28 <sup>a</sup>	0,43 <sup>b</sup>	0,44 <sup>b</sup>	0,46 <sup>b</sup>
Fertilidad	0,06 <sup>a</sup>	0,24 <sup>b</sup>	0,22 <sup>b</sup>	0,31 <sup>b</sup>
Pérdidas (%)	80,0 <sup>a</sup>	44,7 <sup>b</sup>	50,0 <sup>b</sup>	31,8 <sup>b</sup>

**NR:** ovejas que no retornan al servicio a los 22 días pos IATF/ovejas inseminadas; **Fertilidad:** ovejas gestantes a ecografía a 60 días/ovejas inseminadas; **Pérdidas (%):** diferencia porcentual absoluta entre el valor de no retorno al servicio a 22 días y el valor de fertilidad a ecografía a 60 días; **Synchronine®:** dos dosis de PGF2 $\alpha$  separadas 7 días (Cloprostenol-DL 125  $\mu$ g/dosis); **Synchronine®-42R:** Synchronine® e IATF a las 42 horas de la segunda PGF2 $\alpha$  con semen refrigerado; **Synchronine®-48R:** Synchronine® e IATF a las 48 horas de la segunda PGF2 $\alpha$  con semen refrigerado; **Synchronine®-54R:** Synchronine® e IATF a las 54 horas de la segunda PGF2 $\alpha$  con semen refrigerado; **Control:** Synchronine® e IATF a las 48 horas de la segunda PGF2 $\alpha$  con semen fresco.

Letras diferentes en igual fila expresan diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

Se observa que no existieron diferencias significativas para la tasa de NR al celo, fertilidad y Pérdidas entre los grupos de IATF con semen refrigerado Synchronine®-48R, Synchronine®-54R y el grupo Control con semen fresco ( $P > 0,05$ ). Sin embargo estos grupos, presentaron mayores tasas de NR y fertilidad y menores Pérdidas respecto al grupo Synchronine®-42R ( $P < 0,05$ ).

## 6.3. COMPARACIÓN REPRODUCTIVA DEL SERVICIO DE IATF ASOCIADO A UN SEGUNDO SERVICIO

En el Cuadro 3 se presentan los resultados obtenidos para la evaluación en términos reproductivos del protocolo Synchronine® para la IATF vía cervical con semen refrigerado y grupo Control con semen fresco, asociado a la aplicación de un segundo servicio (repaso) a celo visto vía cervical pero con semen fresco.

Cuadro 3: Comparación de tres momentos de IATF vía cervical con semen refrigerado y grupo Control con semen fresco asociado a un segundo servicio a celo visto con semen fresco vía cervical en ovejas multíparas Merino Australiano sincronizadas con Synchrovine®.

IATF+Repaso	Synchrovine®-42R (n:89)	Synchrovine®-48R (n:89)	Synchrovine®-54R (n:91)	Control (n:96)
Fertilidad	0,43 <sup>b</sup>	0,53 <sup>ab</sup>	0,65 <sup>a</sup>	0,67 <sup>a</sup>
Prolificidad	1,11 <sup>a</sup>	1,00 <sup>a</sup>	1,05 <sup>a</sup>	1,06 <sup>a</sup>
Fecundidad	0,47 <sup>b</sup>	0,53 <sup>b</sup>	0,68 <sup>a</sup>	0,71 <sup>a</sup>

**IATF+Repaso:** Inseminación Artificial a Tiempo Fijo con semen refrigerado + inseminación a celo visto 13 a 22 días posteriores a la IATF con semen fresco y sobre celo natural; **Fertilidad:** ovejas gestantes/ovejas inseminadas, por diagnóstico ecográfico a los 60 días; **Prolificidad:** embriones o fetos ecografiados a los 60 días/ovejas preñadas; **Fecundidad:** embriones o fetos ecografiados a los 60 días/ovejas inseminadas; **Synchrovine®:** dos dosis de PGF2 $\alpha$  separadas 7 días (Cloprostenol-DL 125  $\mu$ g/dosis); **Synchrovine®-42R:** Synchrovine® e IATF a las 42 horas de la segunda PGF2 $\alpha$  con semen refrigerado + servicio repaso de IA vía cervical con semen fresco y celo natural; **Synchrovine®-48R:** Synchrovine® e IATF a las 48 horas de la segunda PGF2 $\alpha$  con semen refrigerado + servicio repaso de IA vía cervical con semen fresco y celo natural; **Synchrovine®-54R:** Synchrovine® e IATF a las 54 horas de la segunda PGF2 $\alpha$  con semen refrigerado + servicio repaso de IA vía cervical con semen fresco y celo natural; **Control:** Synchrovine® e IATF a las 48 horas de la segunda PGF2 $\alpha$  con semen fresco + servicio repaso de IA vía cervical con semen fresco y celo natural.

Letras diferentes en igual fila expresan diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

Se observa que luego de un servicio de repaso con semen fresco y celo natural, el grupo Synchrovine®-54R tuvo una tasa de fecundidad final superior a los otros grupos que recibieron IATF con semen refrigerado ( $P < 0,05$ ), no evidenciando diferencias de fecundidad con el grupo Control ( $P > 0,05$ ).

## 7. DISCUSIÓN

Este es el primer trabajo de investigación comunicado en ovinos que busca optimizar la fecundidad del semen preservado en forma refrigerada en ovejas sincronizadas e inseminadas vía cervical a tiempo fijo con un protocolo en base a PGF2 $\alpha$  (protocolo Synchrovine<sup>®</sup>), de allí su relevancia.

Los resultados reproductivos generales obtenidos en este ensayo fueron biológicamente bajos, en forma independiente del tipo de semen utilizado (fresco o refrigerado) o del momento de IA fijado. Sin embargo, los resultados no difieren significativamente de los reportados por otros autores vinculando preservación seminal e IATF vía cervical en ovinos (Maxwell y Salamon, 1993; Fernández Abella y col., 2003; Menchaca y col., 2005). Diversos autores, Maxwell y Salamon (1993), Menchaca y col. (2005), Fierro y col. (2007), reportan una disminución significativa de la fertilidad para el semen preservado por 12 a 72 horas a 5°C en comparación con el semen fresco, utilizando celos espontáneos, inducidos con progestágenos ó prostaglandina respectivamente. Sin embargo en este ensayo, la disminución de fertilidad del semen refrigerado no fue significativa.

Es probable que las importantes precipitaciones hídricas registradas durante el ensayo hayan influido en los resultados reproductivos observados. Se conoce que fuertes lluvias bloquean la manifestación de celo, reducen la tasa ovulatoria e incrementan la mortalidad embrionaria precoz (Griffiths y col., 1970; Doney y col., 1973; Gunn y Doney, 1973; citados por Fernández Abella, 1993; Fernández Abella y col., 2008). Factores asociados a precipitaciones hídricas tales como el estrés, restricción alimentaria y pérdida de estado corporal (Durán del Campo, 1980<sub>2</sub>; Abecia y col., 2006; Fernández Abella y Formoso, 2007), así como a parasitosis gastrointestinales (Nari y Cardozo, 1987; Fernández Abella y col., 2006), y/o problemas podales (Riet, 1987; Mederos y col., 2001), podrían estar asociados y haber repercutido en forma desfavorable y general sobre los resultados alcanzados.

La comparación realizada entre momentos de IATF con semen refrigerado utilizando el protocolo Synchrovine<sup>®</sup> evidenció un claro efecto a favor de atrasar la hora de servicio hasta al menos las 48 horas de la segunda dosis de PGF2 $\alpha$ . Fossati y col. (2008), demostraron que no habría diferencias de fertilidad cuando se insemina con semen fresco entre las 42 y 54 horas de la segunda prostaglandina utilizando este protocolo. Fierro y col. (2007), en un abordaje preliminar al tema, obtuvieron una fecundidad de sólo el 10% en el servicio de IATF con semen refrigerado a las 46 horas promedio, confirmando lo observado en el presente ensayo. Fernández Abella y col. (2003), utilizando progestágenos y eCG como método de sincronización estral, concluyeron que adelantando la hora de IATF con semen refrigerado respecto a la utilizada con semen fresco (46 vs. 50 horas pos retirada de progestágenos), se mejorarán significativamente los resultados. Nuestros hallazgos indicarían, que bajo el celo inducido por la PGF2 $\alpha$ , la reducida vida fecundante de los espermatozoides capacitados por la refrigeración (Lopyrin y Rabocev, 1968; citado por Maxwell y Salamon, 1993), tendría mayor implicancia en los resultados que su migración mas lenta a través del tracto reproductivo (Brückner y Kampfer, 1984; citado por Maxwell y Salamon, 1993; Fernández Abella y col., 2003). En consecuencia, la IA debería ser realizada lo más cercano posible al momento de la ovulación con este protocolo de inducción estral (60 horas promedio; Rubianes y col., 2003).

En todos los grupos planteados en este ensayo se evidenció una gran diferencia porcentual entre la tasa de NR y la fertilidad a la ecografía (“Pérdidas” reproductivas), lo cual se vio muy acentuado en el grupo de IATF a las 42 horas con semen refrigerado. En primer término, este hallazgo permitiría inferir que los bajos resultados de fertilidad obtenidos hasta el momento con el protocolo de IATF en base a PGF2 $\alpha$  (Synchrovine<sup>®</sup>), se puedan deber en parte, a pérdidas reproductivas luego del reconocimiento materno de la gestación. Este hallazgo coincide con lo comunicado por Fossati y col. (2008), utilizando semen fresco y trabajando en las mismas condiciones ambientales. El tratamiento de sincronización de celos con PGF2 $\alpha$  inseminando con semen fresco o refrigerado, puede estar generando óvulos o embriones con inadecuado potencial para su desarrollo, quizás debido a alteraciones en la funcionalidad del folículo preovulatorio (Fernández Moro y col., 2008), o a valores inadecuados de progesterona durante ese ciclo estral (Ashworth y col., 1989; González Bulnes y col., 2005; Vázquez y col., 2009). Por otro lado, existe evidencia de que las pérdidas embrionarias se incrementan cuando ocurre asincronía entre la edad del ovocito y la de los espermatozoides al momento de la fecundación (Salamon y col., 1979). Quizás esta asincronía sucedió en el presente ensayo y fue de mayor magnitud para el grupo Synchrovine<sup>®</sup> con IATF a las 42 horas, determinando un mayor envejecimiento de los espermatozoides en este grupo (Gillan y col., 2004). Nuevos estudios parecen necesarios para diagnosticar y explicar el o los momentos de pérdidas reproductivas acontecidas con este protocolo de sincronización estral e IATF en ovinos.

El servicio de IATF inducido por la prostaglandina a las 54 horas, asociado a un segundo servicio con semen fresco y celo natural, igualó los resultados obtenidos por el grupo Control. De esta forma se viabiliza la utilización del protocolo para la sincronización de los servicios, disminuyendo el período de trabajo a unos pocos días (Menchaca y Rubianes, 2004).

## 8. CONCLUSIONES

1. La fecundidad obtenida con semen refrigerado fue afectada por el momento de IATF utilizando el protocolo Synchrovine<sup>®</sup>; incrementándose a partir de las 48 horas posteriores a la segunda dosis de PGF2 $\alpha$ .
2. La fecundidad obtenida utilizando semen refrigerado fue similar a la alcanzada utilizando semen fresco.
3. Las pérdidas reproductivas fueron superiores al iniciar la IATF con semen refrigerado a las 42 horas luego de aplicada la segunda dosis de PGF2 $\alpha$ .
4. La IATF con semen refrigerado asociada a un segundo servicio sobre celo espontáneo incrementó la eficiencia del protocolo Synchrovine<sup>®</sup>.



## 9. CONSIDERACIONES FINALES

1. Es posible asociar la preservación seminal refrigerada en ovinos con programas de IATF generados por PGF2 $\alpha$  (Synchrovine<sup>®</sup>).
2. Se recomienda no iniciar la IATF con semen refrigerado antes de las 48 horas posteriores a la segunda dosis de PGF2 $\alpha$ .

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Abecia, JA.; Sosa, C.; Forcada, F.; Meikle, A. (2006). The effect of undernutrition on establishment of pregnancy in ewe. *Reprod. Nutr. Dev.*; 46:367-378.
2. Acritopoulou, S.; Haresign, W. (1980). Response of ewes to a single injection of an analogue of PGF-2 $\alpha$  given at different stages of the oestrous cycle. *J. Reprod. Fert.*; 58:219-223.
3. Araujo, A.; Gamarra, J.; Teixeira, V.; Fierro, S.; Gil, J.; Olivera, J. (2006). Efecto de dos diluyentes y dos tiempos de preservación de semen refrigerado sobre la concepción en la IA cervical de ovinos en celo natural. XXXIV Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay. p. 219-220.
4. Ashworth, CJ.; Sales, DI.; Wilmut, I. (1989). Evidence of an association between the survival of embryos and the periovulatory plasma progesterone concentration in the ewe. *J. Reprod. Fert.*; 87(1):23-32.
5. Azzarini, M. (1995). Evaluación del efecto de dispositivos intravaginales con progesterona (CIDR-G) o progestágeno sintético (MAP), sobre la sincronización del ciclo estral y la fertilidad de ovejas Corriedale en otoño. *Producción Ovina*; 8:61-67.
6. Barrett, DMW.; Bartlewski, PM.; Cook, SJ.; Rawlings, NC. (2002). Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to PGF2 $\alpha$  given at different stages of the luteal phase in ewes. *Theriogenology*; 58:1409-1424.
7. Beck, NFG.; Davies, NCG.; Davies, B. (1996). A comparison of ovulation rate and late embryonic mortality in ewe lambs and ewes and the role of late embryo loss in ewe lamb subfertility. *Anim. Sci.*; 62(1):79-83.
8. Brown, GH. (1988). The statistical comparisons of reproduction rates for groups of sheep. *Aust. J. Agric. Res.*; 39:899-905.
9. Cárdenas, H.; Mc Clure, KE.; Pope, WF. (1993). Luteal function and blastocyst development in ewes following treatment with PGF2 $\alpha$  and GnRH. *Theriogenology*; 40:865-872.
10. Cárdenas, H.; Wiley, T.; Pope, W. (2004). Prostaglandin F2 $\alpha$ -induced estrus in ewes exhibiting estrous cycles of different duration. *Theriogenology*; 62:123-129.
11. Castrillejo, A.; Rodríguez, H. (1982). Fertilidad seminal en carneros. *Veterinaria (Montevideo)*; 18:19-21.
12. Contreras Solís, I.; Vásquez, B.; Díaz, T.; Letelier, C.; López Sebastian, A.; González Bulnes, A. (2009). Efficiency of estrous synchronization in tropical sheep by combining

- short-interval cloprostenol-based protocols and "male effect". *Theriogenology*; 71:1018-1025.
13. de Castro, T.; Menchaca, A.; Rubianes, E. (2007). Fisiología reproductiva y control del desarrollo folicular en ovejas y cabras. Fisiología y manejo reproductivo en pequeños rumiantes. Instituto de Reproducción Animal de Uruguay-2007, Curso de posgrado. Reproducción en Rumiantes. Montevideo, Uruguay. p. 8-19.
  14. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. DICOSE (2008). Disponible en: [www.mgap.gub.uy/DGSG/DICOSE/Informe2008/DJ2008\\_Total.pdf](http://www.mgap.gub.uy/DGSG/DICOSE/Informe2008/DJ2008_Total.pdf)  
Fecha de consulta: 12/05/2009.
  15. Durán del Campo, A. (1980<sub>1</sub>). Anatomía, fisiología de la reproducción e inseminación artificial en ovinos. Montevideo. Hemisferio Sur. 264 p.
  16. Durán del Campo, A. (1980<sub>2</sub>). Mortalidad embrionaria en ovinos con especial referencia a la mortalidad embrionaria tardía. Segundas jornadas veterinarias de ovinos. Tacuarembó, Uruguay. p. 1-16.
  17. Durán del Campo, A. (1993). Manual práctico de reproducción e inseminación artificial en ovinos. Montevideo. Agropecuaria Hemisferio Sur. 199 p.
  18. Durán Hontou, G. (1993). Sincronización de celo. En: Durán del Campo, A. Manual práctico de reproducción e inseminación artificial en ovinos. Montevideo. Agropecuaria Hemisferio Sur. p. 165-174.
  19. Evans, G.; Maxwell, WMC. (1987). Salamon's Artificial Insemination of sheep and goats. Sydney. Betterworth. 194 p.
  20. Fernández Abella, D. (1987) Temas de reproducción ovina. Montevideo. División publicaciones y ediciones Universidad de la República. 253 p.
  21. Fernández Abella, D. (1993). Principios de la fisiología reproductiva ovina. Montevideo. Hemisferio Sur. 247 p.
  22. Fernández Abella, D. (1995). Temas de reproducción ovina e inseminación artificial en bovinos y ovinos. Salto. Facultad de Agronomía. 206 p.
  23. Fernández Abella, D.; Villegas, N.; Bellagamba, M. (1998). Comparación de la fertilidad obtenida con semen ovino conservado a 5°C utilizando diferentes diluyentes y métodos de inseminación. *Producción Ovina*; 11:51-62.
  24. Fernández Abella, D.; Bonilla Riera, C.; Bonilla Riera, R.; Villegas, N.; Ibañez, W. (2001). Efecto de la refrigeración de semen de carnero a 4-5°C sobre el transporte espermático. *Producción Ovina*; 14:55-63.

25. Fernández Abella, D.; Castells, D.; Piaggio, L.; Deleón, N. (2006). Estudio de la mortalidad embrionaria y fetal en ovinos I. Efecto de distintas cargas parasitarias y su interacción con la alimentación sobre las pérdidas embrionarias y la fecundidad. *Producción Ovina*; 18:25-31.
26. Fernández Abella, D.; Folena, G.; Formoso, D.; Irabuena, O. (2008). Estudio de la mortalidad embrionaria y fetal en ovinos IV. Efecto del estrés pluviométrico artificial y natural sobre la actividad ovárica y las pérdidas reproductivas. *Producción Ovina*; 20:21-29.
27. Fernández Abella, D.; Formoso, D. (2007). Estudio de la mortalidad embrionaria y fetal en ovinos II. Efecto de la condición corporal y de la dotación sobre las pérdidas embrionarias y fetales. *Producción Ovina*; 19:5-13.
28. Fernández Abella, D.; Formoso, D.; Goicoechea, I.; Locatelli, A.; Scarlato, S.; Ibañez, W.; Irabuena, O. (2007). Estudio de la mortalidad embrionaria y fetal en ovinos III. Efecto de la asignación de forraje y de un estrés pluviométrico artificial sobre la tasa ovulatoria y pérdidas reproductivas en ovejas Corriedale. *Producción Ovina*; 19:15-23.
29. Fernández Abella, D.; Hernández, Z.; Kemayd, J.; Soares de Lima, A.; Urrutia, J.; Villegas, N.; Bentancur, O. (2000). Efecto de los nematodos gastrointestinales sobre la productividad de ovejas Corriedale y Merino II. Actividad ovárica, mortalidad y crecimiento de corderos. *Producción Ovina*; 12:105-106.
30. Fernández Abella, D.; Preve, MO.; Villegas, N. (2003). Insemination time and dilution rate of cooled and chilled ram semen affects fertility. *Theriogenology*; 60(1):21-26.
31. Fernández Moro, D.; Veiga López, A.; Ariznavarreta, C.; Tresguerres, JAF.; Encinas, T.; González Bulnes, A. (2008). Preovulatory follicle development in goats following oestrous synchronization with progestagens or prostaglandins. *Reprod. Dom. Anim.*; 43(1):9-14.
32. Fierro, S. (2005). Comportamiento de diferentes diluyentes en base a leche con adición de yema de huevo y glicerol para la preservación de semen de carnero refrigerado (5°C): ensayos "in vitro" e "in vivo" en majadas del Programa Merino Fino. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria. Montevideo, Uruguay. 45 p.
33. Fierro, S.; Gil, J.; Olivera, J. (2005). Preservación de semen de carnero a 5°C por 24 horas en diferentes diluyentes: Resultados in-vivo. Resúmenes VI Simposio Internacional de Reproducción Animal. IRAC. Córdoba, Argentina. p. 495.
34. Fierro, S.; Olivera, J.; Gil, J. (2007). Inseminación artificial a tiempo fijo con semen fresco y refrigerado en ovinos con el protocolo Synchrovine®. XXXV Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay. p. 334-335.
35. Forichi, S.; Olivera, J.; Correa, M.; Gil, J.; Menchaca, A.; Rubianes, E. (2004). Reproductive response to two different Oestrus synchronisation protocols using PGF2 $\alpha$  in sheep. *Reprod. Fert. Dev.*; 16:506.

36. Fossati, F.; Martincorena, M.; Regusci, M. (2008). IATF en ovinos con semen fresco: comparación biológica y económica de protocolos de sincronización estral. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria. Montevideo, Uruguay. 53 p.
37. Gibbons, A.; Cueto, M. (1995). Manual de inseminación artificial en la especie ovina. Disponible en:  
<http://www.inta.gov.ar/bariloche/info/documentos/animal/reproduc/pa281.htm>  
Fecha de consulta: 23/11/2008.
38. Gil, J. (2003<sub>1</sub>). Inseminación artificial en ovinos. En: Ungerfeld, R. Reproducción en los animales domésticos. Montevideo. Melibea. Tomo II. p. 319-338.
39. Gil, J. (2003<sub>2</sub>). Preservación de semen ovino. En: Ungerfeld, R. Reproducción en los animales domésticos. Montevideo. Melibea. Tomo II. p. 365-385.
40. Gil, J.; Olivera, J. (2005). Preservación (Refrigeración y Congelación) de semen ovino y su uso en inseminación cervical. XXXIII Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay. p. 55-67.
41. Gil, J.; Olivera, J.; Fierro, S.; Durán, G.; Gamarra, J.; Teixeira, V.; Araujo, A.; Stoletniy, G. (2006). Inseminación intrauterina con semen congelado en majadas Merino Fino: comparación de protocolos de sincronización. INIA Tacuarembó. Serie de Actividades de Difusión; 475:16-20.
42. Gillan, L.; Maxwell, WMC.; Evans, G. (2004). Preservation and evaluation of semen for artificial insemination. *Reprod. Fertil. Dev.*; 16:447-454.
43. Ginther, OJ.; Kot, K.; Wiltbank, MC. (1995). Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrus cycles in ewes. *Theriogenology*; 43(3):689-703.
44. González Bulnes, A.; Veiga López, A.; García, P.; García García, RM.; Ariznavarreta, C.; Sánchez, MA.; Tresguerres, JAF.; Cocero, MJ.; Flores, JM. (2005). Effects of progestagens and prostaglandin analogues on ovarian function and embryo viability in sheep. *Theriogenology*; 63:2523-2534.
45. Griffiths, JG.; Gunn, RG.; Doney, JM. (1970). Fertility in Scottish blackface ewes as influenced by climatic stress. *J. Agric. Sci.*; 75:485-488.
46. Haydock, KP.; Shaw, NH. (1975). The comparative yield method for estimating dry matter yield of pasture. *Austr. J. Exp. Agric. Anim. Husb.*; 15:663-670.
47. Hawk, HW. (1973). Uterine motility and sperm transport in the estrous ewe after prostaglandin induced regression of corpora lutea. *J. Anim. Sci.*; 37:1380-1385.
48. Hawk, HW.; Conley, HH. (1971). Sperm transport in ewes administered synthetic progestagen. *J. Anim. Sci.*; 33:255-256.

49. Hawk, HW.; Conley, HH. (1975). Involvement of the cervix in sperm transport failures in the reproductive tract of the ewe. *Biol. Reprod.*; 13:322-328.
50. Hawk, HW.; Cooper, BS. (1977). Sperm transport into the cervix of the ewe after regulation of estrus with prostaglandin or progestogen. *J. Anim. Sci.*; 44:638-644.
51. Hawk HW.; Cooper, BS.; Conley, HH. (1987). Inhibition of sperm transport and fertilization in superovulating ewes. *Theriogenology*; 28(2):139-153.
52. Hawk, HW.; Cooper, BS.; Pursell, VG. (1981). Increased sperm death in the cervix and uterus of estrous ewes after regulation of estrus with prostaglandin or progestagen. *J. Anim. Sci.*; 52:601-610.
53. Houghton, JAS.; Liberati, N.; Schrick, FN.; Townsend, EC.; Dailey, RA.; Inskip, EK. (1995). Day of estrous affects follicular dynamics after induced luteolysis in ewes. *J. Anim. Sci.*; 73:2094-2101.
54. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (2008). GRAS. Clima. Estaciones agroclimáticas INIA. Normales Climatológicas (estadísticas). Estaciones de INIA (datos). Disponible en:  
[http://www.inia.org.uy/online/site/base\\_clima\\_esta\\_mens\\_vizu.php?bus=Tacuarembó&base=72](http://www.inia.org.uy/online/site/base_clima_esta_mens_vizu.php?bus=Tacuarembó&base=72) Fecha de consulta: 4/03/2009.
55. Keisler, DH.; Keisler, LW. (1989). Formation and function of GnRH-induced subnormal corpora lutea in cyclic ewes. *J. Reprod. Fert.*; 87:265-273.
56. Kleemann, DO.; Walker, SK. (2005). Fertility in South Australian commercial Merino flocks: relationships between reproductive traits and environmental cues. *Theriogenology*; 63(9):2416-2433.
57. Larson, LL.; Ball, PJH. (1992). Regulation of estrous cycles in dairy cattle: a review. *Theriogenology*; 38(2):255-267.
58. Lunstra, DD.; Christenson, RK. (1981). Fertilization and embryonic survival in ewes synchronized with exogenous hormones during the anestrous and estrous seasons. *J. Anim. Sci.*; 53:458-466.
59. Maxwell, WMC.; Salamon, S. (1993). Liquid Storage of Ram Semen: a Review. *Reprod. Fertil. Dev.*; 5:613-638.
60. Maxwell, WMC.; Watson, P. (1996). Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.*; 42(1-4):55-65.
61. Mederos, A.; Casaretto, A.; Ferreira, G.; Bonino, J.; Scremini, P. (2001). Evaluación de pérdidas productivas debidas a footrot en ovinos. *Producción Ovina*; 14:65-70.

62. Menchaca, A.; Miller, V.; Gil, J.; Pinczak, A.; Laca, M.; Rubianes, E. (2004). Prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  treatment associated with Timed Artificial Insemination in ewes. *Reprod. Dom. Anim.*; 39(5):352-355.
63. Menchaca, A.; Pinczak, A. (2003). Inseminación artificial y conservación de semen en caprinos. En: Ungerfeld, R. *Reproducción en los animales domésticos*. Montevideo. Melibea. Tomo II. p. 339-351.
64. Menchaca, A.; Pinczak, A.; Queirolo, D. (2005). Storage of ram at 5°C: effects of preservation period and timed artificial insemination on pregnancy rate in ewes. *Anim. Reprod.*; 2(3):195-198.
65. Menchaca, A.; Rubianes, E. (2004). New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reprod. Fert. Dev.*; 16:403-413.
66. Menchaca, A.; Rubianes, E. (2007). Sincronización de la ovulación en ovejas y cabras. *Fisiología y manejo reproductivo en pequeños rumiantes*. Instituto de Reproducción Animal de Uruguay-2007, Curso de posgrado. *Reproducción en Rumiantes*. Montevideo. Uruguay. p. 21-40.
67. Menchaca, A.; Ungerfeld, R.; de Castro, T.; Rubianes, E. (2003). Tratamientos hormonales para la inducción y sincronización de celos en ovejas y cabras. En: Ungerfeld, R. *Reproducción en los animales domésticos*. Montevideo. Melibea. Tomo II. p. 483-493.
68. Montossi, F.; de Barbieri, I. (2007). Proyecto Merino Fino del Uruguay: una visión con perspectiva histórica. *INIA Tacuarembó. Boletín de divulgación*; 90. 312 p.
69. Montossi, F.; San Julián, R.; de Mattos, D.; Ferreira, G.; Pérez Jones, J. (1998). Producción de lana fina: una alternativa de valorización de la producción ovina sobre suelos superficiales del Uruguay con escasas posibilidades de diversificación. *INIA. Serie Técnica*; 102:307-315.
70. Nari, A.; Cardozo, H. (1987). Enfermedades causadas por parásitos internos. En: Bonino, J.; Durán del Campo, A.; Mari, JJ. *Enfermedades de los lanares*. Montevideo. Hemisferio Sur. Tomo I. p. 1-155.
71. Olivera, J.; Gil, J. (2005). Estudio de diferentes alternativas para la sincronización de celos en ovinos: descripción y valorización económica. *XXXIII Jornadas de Buiatría*. Paysandú, Uruguay. p. 195-196.
72. Olivera, J.; Gil, J. (2006). Reproducción asistida en ovinos: avances en la preservación seminal y protocolos de IA a tiempo fijo. *Seminario de Discusión Técnica*. Estación Experimental "Mario A. Cassinoni", Facultad de Veterinaria- DILAVE Paysandú, Uruguay. 21 p.
73. Olivera, J.; Gil, J.; Araujo, A.; Gamarra, J.; Texeira, V.; Fierro, S. (2005). Preservación seminal para la IA cervical en majadas del Proyecto Merino Fino: Semen Refrigerado (24 y

48 horas). Avances obtenidos en el Proyecto Merino Fino del Uruguay: Núcleo Fundacional U.E. "Glencoe" 1999 - 2005. INIA. Actividades de Difusión; 439:15-20.

74. Olivera, J.; Gil, J.; Fierro, S.; Araujo, A.; Filliol, E.; Stoletniy, G. (2007<sub>1</sub>). Sincronización de celos en ovinos: Efecto del intervalo entre dosis de PGF2 $\alpha$  y del momento de IA a tiempo fijo con el protocolo Synchrovine<sup>®</sup>. XXXV Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay. p. 330-331.
75. Olivera, J.; Gil, J.; Fierro, S.; Durán, G.; Alabart, JL. (2007<sub>2</sub>). Pérdidas embrionarias entre el no retorno al servicio y la fertilidad a ecografía en ovinos bajo diferentes tecnologías de IA. INIA Tacuarembó. Serie de Actividades de Difusión; 523:54-59.
76. Olivera, J.; Gil, J.; Fierro, S. (2007<sub>3</sub>). La preservación de semen de carnero en forma líquida y su potencial de uso en los servicios de nuestras majadas. Cangüé; 29:32-37.
77. Paulenz, H. (2004). Artificial insemination in sheep with liquid and frozen-thawed semen. Thesis for the degree of Doctor philosophiae. Norwegian School of Veterinary Science. Oslo. 49 p.
78. Paulenz; H.; Soderquist, L.; Pérez Pé, R.; Andersen Berg, K. (2002). Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. Theriogenology; 57(2):823-836.
79. Piedra Mora<sup>®</sup> (2008). Registro de marca. Dirección Nacional de la Propiedad Industrial. Ministerio de Industria, Energía y Minería. Montevideo, Uruguay. Protocolo de preservación seminal refrigerada anaeróbica en carneros. Olivera, J.; Gil, J.; Fierro, S. Expediente N° 376.971. Clase Internacional 5.
80. Pinczak, A.; Menchaca, A. (2007). Preservación de semen en ovinos y caprinos. Fisiología y manejo reproductivo en pequeños rumiantes. Instituto de Reproducción Animal de Uruguay-2007, Curso de posgrado. Reproducción en Rumiantes. Montevideo. Uruguay. p. 82-90.
81. Riet, F. (1987). Enfermedades del aparato locomotor. En: Bonino, J.; Durán del Campo, A.; Mari, JJ. Enfermedades de los lanares. Montevideo. Hemisferio Sur. Tomo II. p. 219-233.
82. Rodríguez Almeida, F.; Ávila Cota, C.; Anchondo Garay, A.; Sánchez Ramírez, B.; Jiménez Castro, J. (2008). Capacitación espermática inducida por la conservación de semen de carnero diluido, refrigerado o congelado. Agrociencia; 42:399-406.
83. Rubianes, E.; Menchaca, A.; Carbajal, B. (2003). Response of the 1 to 5-day aged ovine corpus luteum to Prostaglandin F2 $\alpha$ . Anim. Reprod. Sci.; 78(1-2):47-55.
84. Rubianes, E.; Menchaca, A.; Gil, J.; Olivera, J. (2004). Reproductive performance of a new timed artificial insemination protocol (Synchrovine<sup>TM</sup>) in sheep. Reprod. Fert. Dev.; 16:508.



85. Rubianes, E.; Ungerfeld, R.; de Castro, T. (1999). Inducción y sincronización de celo en ovejas y cabras. III Simposio internacional de Reproducción Animal. Córdoba- Argentina. p. 109-131.
86. Rusell, AJF.; Doney, JM.; Gunn, RG. (1969). Subjective assessment of body fat in live sheep. *J. Agric. Sci.*; 72:451-454.
87. Salamon, S.; Maxwell, WMC. (1995). Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. A Review. *Anim. Reprod. Sci.*; 37(3-4):185-249.
88. Salamon, S.; Maxwell, WMC.; Firth, JH. (1979). Fertility of ram semen after storage at 5°C. *Anim. Reprod. Sci.*; 2(4):373-385.
89. Salgado, C. (2009). El Mercado de carne ovina en lananoticias. *Lananoticias*; 151:15-18.
90. Sigel, S. (1956). *Nonparametric statistic for the behavioral sciences*. New York. McGraw-Hill. International Student Edition. 313 p.
91. Secretariado Uruguayo de la Lana (2009). Disponible en: [www.sul.org.uy/Plan\\_estrategico/Presentación\\_Plan\\_Estratégico\\_10\\_Dic\\_2008.pdf](http://www.sul.org.uy/Plan_estrategico/Presentación_Plan_Estratégico_10_Dic_2008.pdf)  
Fecha de consulta: 12/05/2009.
92. Synchrovine® (2003). Registro de marca. Ministerio de Industria, Energía y Minería. Montevideo, Uruguay. Protocolo de sincronización de celos con Prostaglandina F2 $\alpha$  e inseminación artificial a Tiempo Fijo en ovinos ciclando. Rubianes, E.; Menchaca, A.; Gil, J.; Olivera, J.
93. Ungerfeld, R. (2002). *Reproducción en los animales domésticos*. Montevideo. Melibea. Tomo I. 289 p.
94. Ungerfeld, R. (2003). *Reproducción en los animales domésticos*. Montevideo. Melibea. Tomo II. 584 p.
95. Ungerfeld, R.; Rubianes, E. (1999). Effectiveness of short progestagen priming for the induction of fertile oestrus with eCG in ewes during late seasonal anoestrus. *Anim. Sci.*; 68:349-353.
96. Vázquez, MI.; Blanch, MS.; Alanis, GA.; Chaves, MA.; González Bulnes, A. (2009). Effects of treatment with a prostaglandin analogue on developmental dynamics and functionality of induced corpora lutea in goats. *Anim. Reprod. Sci.*; doi:10.1016/j.anireprosci.2009.05.016. Disponible en: [http://www.sciencedirect.com.proxy.timbo.org.uy:443/science?\\_ob=ArticleURL&\\_udi=B6T43-4WK4B1F-1&\\_user=7632284&\\_coverDate=06%2F21%2F2009&\\_alid=1046138126&\\_rdoc=3&\\_fmt=high&\\_orig=search&\\_cdi=4963&\\_sort=r&\\_docanchor=&\\_view=c&\\_ct=12&\\_acct=C000072357](http://www.sciencedirect.com.proxy.timbo.org.uy:443/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T43-4WK4B1F-1&_user=7632284&_coverDate=06%2F21%2F2009&_alid=1046138126&_rdoc=3&_fmt=high&_orig=search&_cdi=4963&_sort=r&_docanchor=&_view=c&_ct=12&_acct=C000072357)

97. Vilariño, M.; Menchaca, A. (2007). Inseminación artificial en pequeños rumiantes. Fisiología y manejo reproductivo en pequeños rumiantes. Instituto de Reproducción Animal de Uruguay-2007, Curso de posgrado. Reproducción en Rumiantes. Montevideo. Uruguay. p. 41-51.
98. Viñoles, C.; Paganoni, B.; Milton, M.; Martin, GB. (2007). El uso de esponjas y eCG en programas de inseminación artificial a tiempo fijo promueve una mejor fertilidad que la prostaglandina. XXXV Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay. p. 264-265.
99. 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.
100. White, LM.; Keisler, DH.; Dailey, RA.; Inskeep, EK. (1987). Characterization of ovine follicles destined to form subfunctional corpora lutea. *J. Anim. Sci.*; 65:1595-1601.
101. Windsor, DP. (1997). Variation between ejaculates in the fertility of frozen ram semen used for cervical insemination in Merino ewes. *Anim. Reprod. Sci.*; 47(1-2): 21-29.

## 11. ANEXOS

**Cuadro I.** Organigrama de trabajo.

Día	Fecha	Actividad	Hora
1	22-mar	- Evaluación clínica de la majada y ecografía para descarte de preñez - Examen clínico y evaluación reproductiva de carneros	
7	28-mar	- Extracción y evaluación de semen	
13	03-abr	- <b>Grupo Control:</b> 1ª inyección de PGF2α (0,5 ml SINCRON-DL® i/m)	13:00
14	04-abr	- <b>Grupos Synchron® (42R, 48R y 54R):</b> 1ª inyección de PGF2α (0,5 ml SINCRON-DL® i/m)	13:00
20	10-abr	- <b>Grupo Control:</b> 2ª inyección de PGF2α (0,5 ml SINCRON-DL® i/m) - Extracción y evaluación de semen	13:00
21	11-abr	- <b>Grupo 54R:</b> 2ª inyección de PGF2α (0,5 ml SINCRON-DL® i/m) - <b>Grupo 48R:</b> 2ª inyección de PGF2α (0,5 ml SINCRON-DL® i/m) - <b>Grupo 42R:</b> 2ª inyección de PGF2α (0,5 ml SINCRON-DL® i/m) - 1ª inyección de testosterona a capones (1 ml Testosterona Ultra Lenta i/m)	07:00 13:00 19:00
22	12-abr	- Extracción, evaluación, dilución y refrigeración de semen unificado - <b>IATF a Grupo Control</b> con semen fresco	13:00 13:00
23	13-abr	- <b>IATF a Grupos 42R, 48R y 54R</b> con semen refrigerado	13:00
28	18-abr	- 2ª inyección de testosterona a capones (1 ml Testosterona Ultra Lenta i/m)	
35	25-abr	- 3ª inyección de testosterona a capones (1 ml Testosterona Ultra Lenta i/m)	
36	26-abr	- 1 <sup>er</sup> día de Repaso. Detección de celo natural e IA con semen fresco	
37	27-abr	- 2 <sup>do</sup> día de Repaso. Ídem	
38	28-abr	- 3 <sup>er</sup> día de Repaso. Ídem	
39	29-abr	- 4 <sup>to</sup> día de Repaso. Ídem	
40	30-abr	- 5 <sup>to</sup> día de Repaso. Ídem	
41	01-may	- 6 <sup>to</sup> día de Repaso. Ídem	
42	02-may	- 7 <sup>mo</sup> día de Repaso. Ídem	
43	03-may	- 8 <sup>vo</sup> día de Repaso. Ídem	
90	19-jun	- <b>Grupos 42R, 48R, 54R y Grupo Control:</b> Diagnóstico de gestación y detección del número de embriones por ecografía	