

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**INSEMINACIÓN A TIEMPO FIJO DE OVEJAS
SINCRONIZADAS CON DOS DOSIS DE PGF2 α
SEPARADAS 7 DÍAS CON O SIN GnRH.**

POR



María Noel CORREA VAZ

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

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2005**

038 TG
Inseminación a
Correa Vaz, María Noel



FVI/26637

TRABAJO FINAL aprobado por:

Presidente de Mesa:

Nombre completo y firma

Segundo Miembro (Tutor):

Nombre completo y firma

Tercer Miembro:

Nombre completo y firma

Co Tutor:

Nombre completo y firma

Fecha:

Autores:

Nombre completo y firma

AGRADECIMIENTOS

A los Dres. Julio Olivera y Edgardo Rubianes, tutor y cotutor respectivamente, por compartir vuestra tarea y colaborar con la elaboración de este trabajo. A nuestros colaboradores, Dres. Alejo Menchaca, Jorge Gil y Stefanía Forichi. A la cátedra de ovinos de la Estación Experimental Mario A. Cassinoni de la Facultad de Agronomía (EEMAC, Pdú.) representada por Gianni Bianchi y Gustavo Garibotto por brindar las ovejas para realizar estos ensayos. Un reconocimiento para el personal de campo de la EEMAC por colaborar con el manejo y supervisión de los animales.

A laboratorios que suministraron los fármacos para realizar los ensayos. Efraín Campos y Sergio Kmaid (Universal Lab Uruguay) por la prostaglandina análoga (Glandinex). Jorge Amaro (Dispert, Uruguay) por la testosterona.

TABLA DE CONTENIDO

Página

PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	IV
1) <u>RESUMEN</u>.....	
2) <u>SUMMARY</u>	
3) <u>INTRODUCCIÓN</u>.....	1
4) <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	3
4.1) RECORDATORIO FISIOLÓGICO DEL CICLO ESTRAL OVINO.	
4.2) MÉTODOS DE SINCRONIZACIÓN DE CELOS EN OVINOS.	
4.3) PROTOCOLO SYNCHROVINE ®.	
4.4) FECUNDACIÓN Y PÉRDIDAS EMBRIONARIAS.	
4.5) HORMONA GNRH.	
5) <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>.....	12
6) <u>RESULTADOS</u>	13
7) <u>DISCUSIÓN</u>.....	16
8) <u>CONCLUSIONES</u>	19
9) <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	20

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

CUADRO I: Uso de GnRH asociado a Synchronine ®: resultados reproductivos obtenidos a los 30 días del servicio.

CUADRO II: Uso de GnRH asociado a Synchronine ®: resultados reproductivos del celo posterior al inducido.

CUADRO III: Uso de GnRH asociado a Synchronine ®: resultados reproductivos del celo posterior al inducido.

FIGURA I: Uso de GnRH asociado a Synchronine ®: porcentaje diario de manifestación estral en el ciclo posterior al inducido.

1) RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de una dosis de GnRH administrada al momento de la IA en un protocolo de sincronización de celos con PGF2 α (Synchrovine®). Se utilizó un total de 215 ovejas Corriedale y cruzas durante la estación reproductiva. Los grupos tratados fueron, (1) protocolo Synchrovine® (n=111): dos dosis de PGF2 α cada 7 días con IA Tiempo Fijo a las 42 h de la segunda dosis de PGF2 α (Delprostenate im, 160 μ g/dosis; Glandinex®), y (2) Synchrovine® + GnRH (n=104): ídem protocolo con una dosis de GnRH al momento de la inseminación (acetato de Buserelina im, 8 μ g, Receptal®). Todas las ovejas fueron inseminadas con semen fresco sin diluir. La concepción, prolificidad y fecundidad fue determinada a los 30 días del servicio mediante ultrasonografía transrectal. Los resultados fueron analizados mediante χ^2 o test de Brown. No se observaron diferencias significativas en los parámetros reproductivos evaluados al primer ni segundo servicio ($P>0.05$). Concepción (0.49 vs 0.37), prolificidad (1.12 vs 1.28) y fecundidad (0.55 vs 0.48) grupo sin y con GnRH respectivamente.

El agregado de GnRH al protocolo Synchrovine® e IATF no mejoró los parámetros reproductivos en nuestras condiciones experimentales.

2) SUMMARY

The aim of this work was to evaluate the effect of GnRH given at the time of timed artificial insemination using the Synchrovine® protocol. In total, 215 Corriedale and crossbreed ewes were used during the breeding season. The treatment groups were: (1) Synchrovine®: n=111 two doses intramuscular of PGF2 α (160 μ g delprostenate, Glandinex®, Universal Lab, Uruguay), given 7 days apart, and (2) Synchrovine® + GnRH: n=104 Synchrovine® plus a GnRH dose at the moment of AI (8 μ g of Buserelina acetate, I/M; Receptal®). All ewes were inseminated 42h after the second PGF2 α dose. Fresh undiluted semen was used for cervical insemination. Conception, prolificacy and fecundity were determined 30 days after AI by transectal ultrasound. Results were analyzed by χ^2 or Brown test. No significant differences between groups at first or second service were found ($P>0.05$). Synchrovine® protocol plus GnRH at TAI did not improve fertility results under our experimental conditions.

3) INTRODUCCIÓN

La economía de nuestro país depende en gran parte de la producción del sector agropecuario, y dentro del mismo, la producción ovina representa en promedio de los últimos años un 20% de Producto Bruto generado por este sector, siendo explotado en la actualidad por unos 24.000 productores que representan el 50% del total de establecimientos (DIEA, 2004).

La población ovina es la base principal del potencial de producción de este rubro. La misma ha sufrido una caída de 60% del stock en la última década (Salgado, 2004). El número de lanares declarados al cierre del ejercicio 2004/2005 fue de 9.700 miles de cabezas (DICOSE, 2005). Se destaca un descenso pero a un ritmo inferior a los años anteriores (-4.7%), lo que marca una tendencia estabilizadora del stock. Sin embargo, la recuperación del mismo será muy lenta debido en gran medida a los bajos índices de señalada registrados en la majada nacional, que data de 60% en promedio durante los últimos 10 años (Salgado, 2004). Este valor está indicando una importante deficiencia a nivel del potencial reproductivo de esta especie. Esto lleva a que hoy sea imperativo mejorar los aspectos reproductivos, en especial los porcentajes de señalada, para aumentar el stock y la extracción, lo que repercutirá en un aumento de los ingresos del sector.

Los componentes para una mejora del indicador "tasa de señalada o procreo" son: la *fertilidad* de las ovejas encarneradas (Nº de ovejas paridas/ovejas encarneradas), la *prolificidad* de las ovejas paridas (Nº de corderos nacidos/oveja parida) y la *supervivencia* de los corderos (Nº de corderos señalados o destetados/corderos nacidos) (Azzarini, 2000). Modificando en mayor o menor grado cada uno de estos componentes se apreciarán cambios importantes en resultado final del "sistema ovino".

En los niveles más extensivos de producción, característicos de nuestras explotaciones ovinas, el aporte de biotecnología reproductiva tal vez no tenga un lugar como para desarrollar todo su potencial. No obstante, existen prácticas sencillas que pueden contribuir a mejorar los índices reproductivos, tales como ajustes en el manejo alimenticio, sanidad, mejora genética, etc. (Bonino, 2004). Cuando se avanza en la escala de complejidad de los sistemas y los elementos de los mismos son más variados (mejores posibilidades nutricionales sobre la base de

pasturas o suplementos, genotipos más prolíficos, mayor grado de supervisión, etc.) son muchos los cambios que pueden introducirse para aprovechar al máximo el potencial reproductivo de esta especie. Dentro de este contexto, y una vez levantadas restricciones de orden alimenticio, manejo y sanidad, parece importante viabilizar distintas técnicas que permitan optimizar los componentes fertilidad y/o prolificidad, y de esta forma mejorar la eficiencia reproductiva de las majadas.

Las técnicas a implementar deberían cumplir ciertos requisitos tales como ser económicas, de fácil aplicación, que requieran la menor cantidad de mano de obra, que su efecto sea uniforme sobre toda la población, y fundamentalmente no reducir el potencial reproductivo esperado en la majada (Bonifacino y col., 1980). Una de ellas, es el control de la presentación de los estros o celos para la realización sincronizada de los servicios.

Estas técnicas permiten programar mejor las tareas relacionadas con la reproducción, facilitando entre otros la aplicación de la Inseminación Artificial (IA), al concentrar el trabajo en unos pocos días. Así mismo, la planificación de los servicios posibilitaría una utilización más eficiente de los recursos disponibles en un predio: alimentación racional pre-servicio y pre-parto de las ovejas, parición concentrada y más controlada, etc., pilares básicos en la disminución de la mortandad perinatal y por ende en la mejora de la tasa de señalada. Estudios recientes, plantean el uso de nuevos protocolos de sincronización de celos con prostaglandinas e inseminación artificial a tiempo fijo en ovinos (Rubianes y col., 2003; Menchaca y col., 2004). La fertilidad potencial alcanzada con este protocolo, denominado Synchronine®, es aun tema de estudio y validación.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de incluir análogos químicos de la hormona liberadora de gonadotropinas (buserelina) a un protocolo de sincronización de celos con prostaglandinas e inseminación artificial a tiempo fijo en ovinos (Synchronine®), con el propósito de mejorar la fertilidad obtenida, y de ésta manera viabilizar este protocolo.



4) REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1) RECORDATORIO FISIOLÓGICO: CICLO ESTRAL OVINO.

El ciclo estral de la oveja es un conjunto de eventos que se repiten sucesivamente en la estación reproductiva. Tiene una duración de 17 ± 2 días y consta de una fase luteal desde el día 2 (estro: día 0), y una fase folicular desde el día 14 hasta el día 1 (Rubianes y col., 2002). En la fase folicular o preovulatoria la frecuencia de pulsos de hormona luteinizante (LH) aumenta, lo cual conduce a la ovulación del o los folículos dominantes y su posterior luteinización. La formación del cuerpo lúteo es el responsable de la secreción de progesterona, quien inhibe la secreción de prostaglandina F2 alfa ($PGF2\alpha$), suprime la secreción de hormona liberadora de gonadotropinas a nivel hipotalámico (GnRH), por lo que se inhibe la secreción tónica de LH, a nivel hipofisario.

Hacia el día 11-12 del ciclo estral se desencadena el mecanismo de retroalimentación positivo oxitocina luteal- $PGF2\alpha$ endometrial, que tiene como efecto la lisis del cuerpo lúteo (CL). Esto lleva a una subsecuente caída de los niveles de progesterona sérica lo que permite el aumento de estradiol del ovario (por aumento de pulsaciones de GnRH y LH a nivel hipofisario), conduciendo a comportamiento estral y ovulación con posterior luteinización, iniciándose un nuevo ciclo.

La hormona GnRH induce la liberación de LH y FSH que a su vez producen la ovulación y luteinización del folículo dominante e inician una nueva onda folicular.

4.2) MÉTODOS DE SINCRONIZACIÓN DE CELOS EN OVINOS.

El concepto de inducción de celo implica el desencadenamiento de una fase folicular que, asociado a un comportamiento estral culmine con la ovulación. La sincronización se refiere a la simultaneidad de ambos eventos en un grupo de animales que hayan sido expuestos al tratamiento (Rubianes y col., 2000a). Por su parte, una técnica de sincronización de celos debería inducir una respuesta estral fértil y alto porcentaje de preñez.

Hay ciertos parámetros que permiten evaluar los resultados de un programa de sincronización, estos son: respuesta estral (porcentaje de hembras en

celo/hembras tratadas), tasa de concepción (porcentaje de hembras preñadas/hembras inseminadas ó servidas), tasa de preñez (porcentaje de hembras preñadas/hembras tratadas) y fecundidad final (corderos obtenidos/ hembra tratada).

Algunos de los métodos utilizados en la sincronización de celos y ovulaciones incluyen aquellos que inician la actividad ovulatoria en forma "espontánea", tales como la introducción de carneros antes del comienzo de la estación reproductiva o "efecto macho". La respuesta a la introducción súbita de los carneros a la majada durante la estación no reproductiva se caracteriza por la presencia de dos picos de celos entre los 17-20 y 22-25 días, dadas por diferentes tipos de respuesta ovárica y endocrina (Ungerfeld, 2003). La potencialidad del uso del "efecto macho" es muy alta, ya que se han obtenido resultados similares a los observados con tratamientos hormonales.

Por otro lado, existen métodos que producen el control del ciclo estral a través del uso de progesterona o progestágenos sintéticos en forma oral, inyectable, esponjas u otros dispositivos vaginales. Esta técnica se fundamenta en el papel inhibitorio que tiene la progesterona y sus análogos sobre el eje hipotálamo-hipofisario, asegurando así, el no desencadenamiento del mecanismo luteolítico y subsiguiente ovulación. La duración del estímulo es de 12-14 días generalmente (vida media del CL en un ciclo normal), una vez retirado el mismo, los valores de la misma decaen. Este método suele asociarse fuera y en la estación reproductiva con tratamientos gonadotróficos al momento ó poco antes de retirar las esponjas para aumentar la tasa reproductiva (Durán del Campo, 1993). El más utilizado de estos tratamientos es la gonadotrofina coriónica equina (eCG o PMSG). Se observa manifestación estral en las próximas 48-72 horas de retirados los dispositivos, lo cual permite la realización de protocolos de I.A a tiempo fijo. Recientemente se ha reportado un efecto negativo de la eCG sobre la tasa de preñez, dada su capacidad inmunogénica en cabras y ovejas. Esto se ha atribuido a su origen heterólogo, a su alto peso molecular ó a su nivel de glicosilación (Menchaca y Rubianes, 2004). Por lo expuesto sería promisorio el uso de otras alternativas, como por ejemplo la hormona liberadora de gonadotropinas.

La duración clásica del tratamiento con progestágenos ha sido cuestionada en los últimos tiempos (Viñoles y col. 2000). Esto podría ser la causa de la menor fertilidad observada en celos inducidos respecto de los espontáneos. La paulatina

disminución de la progesterona presente en los dispositivos vaginales podría generar en algunos animales un ambiente endocrino "subluteal". Se han probado tratamientos cortos en ovejas en anestro utilizando esponjas por solo 5-6 días (Ungerfeld y Rubianes, 1999), los cuales resultaron en buena fertilidad. En estación reproductiva Viñoles y col. (1999), obtuvieron una fertilidad un 20% superior a la tradicional de 12 días de tratamiento (87 vs. 67%, tratamiento corto y de 12 días, respectivamente). Estos ensayos parecerían comprobar que aumentando el recambio folicular se inducen ovulaciones de folículos jóvenes, con ovocitos saludables, contrarrestando el efecto negativo de los tratamientos más extensos. A su vez, los tratamientos cortos presentarían como atractivo una mayor flexibilidad del manejo de los animales en condiciones de campo.

Finalmente, existen métodos que producen regresión y lisis del CL utilizando prostaglandinas y/o sus análogos sintéticos (Durán del Campo, 1993). Las prostaglandinas son compuestos que se encuentran en numerosos tejidos animales y poseen las propiedades más diversas. Las prostaglandinas naturales acusan escasas concentraciones plasmáticas y tisulares, no se acumulan, se degradan rápidamente y sus vidas medias se reducen a algunos segundos. Las que intervienen en la regulación de la fertilidad son las $PGF2\alpha$ (Moller, 1980).

A fines de la década de los 60' se comienza a utilizar $PGF2\alpha$ (McCracken y col., 1970). Actualmente se conocen una serie de análogos sintéticos de la $PGF2\alpha$, que se diferencian de la prostaglandina natural por su mejor tolerancia y más alta eficacia. La medicina veterinaria encontró su interés en los análogos de la $PGF2\alpha$ por su poder lítico sobre los tejidos productores de progesterona (CL), favoreciendo además las contracciones de la musculatura uterina y la dilatación del cuello del útero (Moller, 1980). El uso de la $PGF2\alpha$ está restringido a la estación reproductiva, debido a que es imprescindible la presencia de un CL para que la droga lo pueda lizar y de esa forma desencadenar la ovulación.

Cuando se administra $PGF2\alpha$ para sincronizar celos y realizar IA en una majada, ha de tenerse en cuenta que ello no implica forzosamente la fecundación y el mantenimiento de la gravidez, variables estas sometidas a numerosos factores. Por tanto, en ningún caso han de esperarse resultados de preñez superiores a los límites fisiológicos.

Se han practicado programas de sincronización de celos con PGF2 α . A nivel de campo se ha difundido el protocolo de una única dosis en ovejas ciclando e IA en el celo posterior al inducido; ésta IA diferida mejora los resultados de fertilidad en un 30% respecto a la inmediata y tiene menor costo (Bonifacino y Aragunde, 1980; Durán del Campo, 1982, 1993; Olivera y col. 2003). También se han ensayado tratamientos con dos dosis de PGF2 α separadas 12-14 días (Durán del Campo, 1982), resultando en una alta sincronización de celos (mayor a 80%), pero una menor fertilidad respecto al tratamiento anterior.

En general, la respuesta a una dosis de PGF2 α depende del estado de funcionalidad del CL, siendo inefectiva cuando el mismo está en formación. Así es, que el periodo de sensibilidad del CL en la oveja estaría entre los días 5 y 14 del ciclo estral (Acritopoulou y Haresign, 1980; Wiltbank y Niswender, 1992). Recientes estudios (Rubianes y col., 2003) demuestran que desde el día 2.5 a 3 de iniciado el ciclo estral se podría inducir luteólisis. En este estudio se inyectaron ovejas con PGF2 α análoga los días 1, 3 y 5 pos-estro. Todos los animales que presentaban CL de 3 y 5 días ovularon (8/8) y sólo uno de 1 día de edad (1/8). Se ha demostrado que la variabilidad de la respuesta a la PGF2 α en vacas (Kastelic y Ginter, 1991) y en ovejas (Viñoles y Rubianes, 1998) está determinado en gran medida por el estado de la población ovárica de cada individuo. El mismo tiene relación con el día del ciclo en que el animal es inyectado, cuanto más desarrollado el CL, más demorará la luteólisis (Houghton y col., 1995). Esto se explica por el estado de desarrollo de la onda folicular. Si está en fase de crecimiento al momento de la dosis, el estro y la ovulación demoran menos que cuando la luteólisis es inducida cuando la onda está regresando, un nuevo folículo necesita emerger y el estro y la ovulación ocurrirá más tarde. Ni la duración del celo ni la tasa ovulatoria se vería modificada por el día de administración de la PGF2 α (Rubianes y col., 2003).

Al administrar prostaglandina a una población ciclando, la respuesta es variable. El tiempo desde la administración de la PGF2 α hasta la primer hora de celo es en promedio de 53 a 60 horas (Hawk, 1973). Esto coincide con las observaciones de Barret y col. (2002), que encontraron un intervalo PGF2 α - celo de $2,5 \pm 0,3$ días.

Otros estudios señalan un 70-80% de celos en las siguientes 72 horas pos inyección (Bonifacino y Aragunde, 1980; Durán del Campo 1982). Esta dispersión de 3 a 4 días limitaría la posibilidad de implementar protocolos de IA a tiempo fijo luego de tratamientos tradicionales de sincronización de celos con PGF2 α . Sin embargo, Rubianes y col. (2003), luego de una dosis de PGF2 α en ovejas tratadas tempranamente en el ciclo estral observó que todas las ovejas tratadas al día 3 del ciclo respondieron a la dosis y ovularon entre las 48 y 72 horas pos inyección. El intervalo PGF2 α -ovulación fue en promedio de 60 horas. La alta sincronización de la ovulación de la primera onda fue observada en respuesta a un tratamiento temprano en la fase luteal. La baja variabilidad de esta respuesta habilitaría a desarrollar protocolos de IA a tiempo fijo.

4.3) PROTOCOLO SYNCHROVINE®

En base a los resultados expuestos anteriormente sería posible desarrollar un protocolo de sincronización de celos con dos dosis de PGF2 α separadas 7 días. En el mismo, al suministrar la primera dosis se induciría luteólisis en las próximas 48-72 h en las ovejas con CL sensible, con formación de un nuevo CL que se encontrará en los primeros días del ciclo al administrar la segunda dosis. Asimismo, aquellas ovejas con CL no sensible (días 1 y 2 del ciclo) o que ya tienen cuerpo lúteo regresando (días 14 a 16) estarán con un CL sensible al momento de administrar la segunda PGF2 α . Este protocolo no solo evitaría el uso de protocolos largos (dos dosis cada 9-12 días), sino que además garantizaría una importante sincronización de los celos (80% de los animales tratados entre las 25 y 48 horas) y de las ovulaciones (48 a 72 hs) pos segunda dosis, lo que permitiría aplicar inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) (Rubianes y col., 2003).

En un trabajo reciente Menchaca y col. (2004), compararon tres momentos de inseminación artificial con semen fresco luego de la segunda dosis, a las 42, 48 y 54

horas resultando en tasas de preñez de 36.8, 25.8 y 22.5%, respectivamente. Estos resultados demuestran que se podría, ajustando el momento del servicio a 42 h., realizar IATF utilizando PGF2 α , con resultados promisorios (protocolo Synchrovine®).

Sin embargo, sincronizar aun más los celos y asegurar las ovulaciones, permitiría quizás mejorar los resultados en fertilidad y/o prolificidad obtenidos hasta el presente momento.

4.4) FECUNDACIÓN Y PÉRDIDAS EMBRIONARIAS.

El mejor porcentaje de preñez con IATF en el ensayo de Menchaca y col. (2004), fue de 36.8% a los 30 días del servicio. La alta repetición de celos observada estaría indicando fallas en la fecundación, en el reconocimiento materno ó alta mortalidad embrionaria.

Las fallas en la fecundación podrían deberse a un transporte espermático disminuido, ovulación retardada o dispersa, o no ovulación.

Se ha demostrado un efecto negativo del uso de la PGF2 α sobre la motilidad espermática, provocando una reducción en la cantidad de células espermáticas que llegan al oviducto luego de IA (Quinlivan y Robinson, 1969; Hawk y Conley, 1972). Se ha postulado también, que los tratamientos con prostaglandinas tendrían efectos negativos sobre la fertilidad por producir cambios en las contracciones uterinas (Hawk, 1973), y en la secreción de mucus cervical (Smith y Allison, 1971).

La ovulación retardada o dispersa podría ser la explicación a las probables fallas en fertilización observadas. En el protocolo Synchrovine® la segunda PGF2 α es administrada a los 7 días y el folículo mayor en crecimiento tiene entre 3 a 5 días de edad siendo el CL sensible a la PGF2 α . Este pool homogéneo de folículos resulta en un período ovulatorio sincrónico que ocurre aproximadamente a las 60 \pm 12 h de la segunda PGF2 α (Rubianes y col., 2003).

Las fallas de fecundación observadas en el protocolo Synchrovine® podrían estar ocurriendo también debido a una gran proporción de celos sin ovulación, lo cual se transforma en otra hipótesis de trabajo.

Respecto a la incidencia de mortalidad embrionaria, se sabe que la mayor parte de las pérdidas embrionarias se originan en los primeros 40 días luego de la fertilización y pueden llegar a ser elevadas, alcanzando cifras de hasta un 30% (Azzarini, 1990; Fernández Abella, 2002). Algunas causas de reabsorción embrionaria temprana descritas han sido defectos en los gametos y /o fallas en el reconocimiento materno. En cuanto a defectos de los óvulos, se reporta una relación entre la calidad ovocitaria y la vida del folículo ovulatorio, demostrándose que una prolongación de su vida media, "envejecimiento folicular", disminuye la fertilidad (Revah y Butler, 1996, citado por Rubianes 2001). Este no sería el caso si la luteólisis se indujera en fase temprana como ocurre en el protocolo Synchrovine®.

Las fallas en el reconocimiento materno se pueden deber a no emisión de la señal embrionaria (calidad embrionaria: producción de interferon tau, Martal y col., 1997) ó, a fallas maternas en el impedimento de la luteólisis (calidad de los CL).

Por otra parte, sería interesante establecer si independientemente de la ocurrencia de celo, la ovulación y fecundación efectivamente ocurre en el protocolo Synchrovine®. Una de las técnicas a desarrollar para confirmar esto podría ser el lavado de los cuernos uterinos a los 7-8 días del ciclo estral en un grupo representativo de ovejas buscando ovocitos y/o embriones y evaluando su calidad (Restall, 1976a, b). De esta forma se podría cuantificar los fallos en ovulación y fertilización ocurridos, y/o una probable degeneración embrionaria. Si la proporción de embriones observada a este día es aceptable los fallos en fertilidad a la ecografía se deberían a pérdidas embrionarias generadas a partir del reconocimiento materno (día 9 a 12 del ciclo estral).

Una medida alternativa para asegurar la ovulación sería el uso de hormonas gonadotróficas, con la ventaja de ser aplicadas a nivel de campo y su efecto se reflejaría en todos los individuos.

4.5) HORMONA GnRH.

En el año 1971, Schally y col. lograron dilucidar la estructura química de la GnRH, gonadotropina aislada del tejido hipotalámico del cerdo. A partir de ella se desarrolló por modificación de los aminoácidos el análogo químico denominado busserelina. Este análogo tiene una mayor resistencia a la degradación enzimática de

las peptidasas y por ello puede provocar una liberación prolongada de gonadotrofinas con una dosis activa notablemente menor que la de la GnRH natural (Moller, 1980). Luego de la aplicación, el péptido se combina con receptores del lóbulo anterior de la hipófisis. Ello da lugar a un aumento de la secreción de gonadotrofinas, de tal manera que la secreción de LH aumentaría más rápidamente que la FSH. La acción fisiológica resultante es la de estimular la maduración de los folículos, desencadenar la ovulación y formar los cuerpos lúteos (luteinización).

El patrón del pico de LH resultante de un pico endógeno de GnRH o de una inyección de 100 µg de GnRH (la dosis estándar para bovinos), es diferente. Con la GnRH exógena hay un pico mayor a diferencia del producido por vía endógena. Sin embargo, la duración del pico de LH es menor administrando GnRH vía exógena que el producido vía endógena. A pesar de estas diferencias, ambos serían suficientes para producir ovulación de un folículo dominante (Wiltbank y Haughian, 2003). Existen varios estudios que reafirman que una dosis de GnRH es capaz de inducir un pico de LH, tanto en vacas (Foster, 1978; Twagiramungu y col., 1994, 1995) como en ovejas (Revees, 1970, Quirke y col., 1979; Rubianes, 1997, 2000b).

El pico máximo de LH en respuesta a un análogo de GnRH, se produce a las 2-3 horas posteriores a su aplicación en anestro (Rubianes, 2000b), y de 1-2 h. en estación reproductiva (Rubianes y col., 1997), y el mismo fue de menor magnitud si se administran juntas la PGF 2α y GnRH, que separadas 36 h. Otros autores hallaron plazos menores, desde 2,5 a 10 minutos (Revees, 1970). Sin embargo, los resultados sugieren que la respuesta a la GnRH sería menos dependiente del pico de LH que ella genera que del estadio folicular. La ovulación no ocurriría en todos los casos de tratamientos con GnRH. El hecho de que se produzca la ovulación depende del desarrollo del folículo al momento del tratamiento, es la razón de resultados poco alentadores con esta hormona.

La administración de un agonista de GnRH produce liberación de FSH y LH por parte de la hipófisis, ante la presencia de un folículo de gran tamaño puede inducir su ovulación. Sin embargo si el folículo ha iniciado el camino de la atresia, la aplicación de GnRH no cambiará su destino (Twagiramungu, 1995). Rubianes (2000b), observaron algo similar ya que en ovejas en anestro la respuesta a la GnRH fue errática, ya que las ovejas que ovulan tienen folículos en crecimiento, mientras que otras presentarían una respuesta retardada o lo harían con folículos

quísticos, son aquellas cuyos folículos mayores que están en fase estática o de regresión .

Twagiramungu y col. (1994), observaron que el tratamiento con buserelina en vacas postparto indujo ovulación si las concentraciones de progesterona eran menores a 4 ng/ml, pero no lo hizo, si la progesterona era mayor a 8 ng/ml. Por tanto la respuesta parece también depender del momento del ciclo estral. Rubianes y col. (1997), observaron que los folículos en la fase luteal tardía al recibir una dosis de GnRH no ovularon mientras las concentraciones de progesterona fueran altas aún cuando el estímulo de LH sea adecuado. Esos folículos persistieron y ovularon cuando la progesterona bajó.

Se ha observado la función de la GnRH como sincronizador de ovulaciones. Quirke y col. (1979), luego de un tratamiento con progestágenos por 12 días y PMSG al retiro en ovejas, administró GnRH a las 24 hs logrando un 100% de ovulaciones a las 58 hs .

Luego de un tratamiento con Synchrovine®, obtendremos un folículo en activo crecimiento, con pocos días de vida. Parecería entonces promisorio y aplicable en condiciones de campo sumar GnRH al protocolo de IATF Synchrovine®, como forma de asegurar la ovulación y una mayor sincronización entre las mismas.

Teniendo en cuenta lo expuesto en la revisión bibliográfica se plantea como hipótesis de trabajo que, la incorporación de una dosis de GnRH al momento de la inseminación en un protocolo de sincronización de celos con dos dosis de PGF2 α separadas 7 días (Synchrovine®), producirá un pico de LH sobre el folículo dominante que asegurará una ovulación sincronizada en la majada, y en consecuencia permitirá mejorar los resultados reproductivos de este protocolo de IATF. Para incrementar la eficacia global del protocolo, se prevé un seguimiento del ciclo estral posterior al inducido, mediante detección de celo e IA en los días 15 a 22 luego de la segunda dosis de PGF2 α . Este programa en su conjunto presentaría la ventaja de reducir los días de trabajo a sólo 9 (1 día de IATF luego de Synchrovine® y 8 días de detección de celo e IA).

El objetivo general del trabajo fue evaluar el comportamiento de un protocolo de sincronización de celos en una majada con dos dosis de PGF2 α separadas 7 días e IATF a las 42 h de la última dosis, con o sin, la incorporación de una dosis de GnRH al momento de la inseminación. Se analizará la tasa de concepción,

prolificidad y fecundidad de los dos protocolos. Y se prevé realizar un seguimiento del ciclo estral posterior al inducido: evaluar la distribución de celos y los parámetros reproductivos en ambos grupos.

5) MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se realizó en la Estación Experimental "Mario A. Cassinoni" de la Facultad de Agronomía (33° LS; Paysandú, Uruguay), durante los meses de marzo y abril de 2003, sobre una majada de 215 ovejas nulíparas y multíparas de raza Corriedale y cruza (Corriedale por Texel, Ile de France o Milchschaf). A fines experimentales se formaron dos grupos homogéneos según raza, edad y estado corporal, cuyas edades oscilo entre 2 y 6 años, y una condición corporal promedio $3,5 \pm 0,1$ (escala 0 a 5, Rusell y col., 1969).

Previo a ello, se realizó una dosificación con un endectocida (Moxidectin oral, dosis 1 mg/10 Kg. PV; CIDECTIN®; Cyanamid S.A., Uruguay) y un tratamiento preventivo de patologías podales (sulfato de Zn al 15 % por 30 minutos). Las ovejas permanecieron hasta 1 mes después del ensayo pastoreando sobre campo natural. Los carneros a utilizar en IA fueron revisados y certificados como aptos con 2 meses de antelación al inicio de su uso.

A los dos grupos se les realizó un protocolo de dos dosis de un análogo de PGF2 α cada 7 días (160 μ g de delprostenate por dosis, im.; Glandinex®, Universal Lab, Uruguay), con IATF a las 42 h de la segunda dosis de PGF2 α (grupo Synchrovine®), incorporando al Grupo 2 una dosis de un análogo de GnRH (8 μ g de acetato de Buserelina, im; Receptal®, Hoechst Roussel Vet., Argentina) al momento de la inseminación (grupo Synchrovine® + GnRH).

La IA se realizó utilizando semen fresco, no diluido, colectado mediante la técnica de vagina artificial, proveniente de un grupo de 5 carneros de razas Poll Dorset, Corriedale y Southdown, respectivamente. El semen de cada carnero se distribuyó en forma equitativa entre los dos grupos. El semen se evaluó macro y microscópicamente inmediatamente de colectado. Dentro de la evaluación macroscópica se tuvo en cuenta el volumen (no menor a 0.75 ml), color y actividad en masa, y microscópicamente se evaluó motilidad ($\geq 70\%$ de células móviles), utilizando un microscopio binocular con contraste de fase. La concentración se

determinó utilizando espectrofotometría (Spermacue®, Minitub; Tiefenbach, Alemania).

La técnica de IA que se usó fue la cervical (Durán del Campo, 1993), utilizando un vaginoscopio tubular con luz y una pistola multidosis de inseminación (Walmur® Instrumentos Veterinarios; Montevideo, Uruguay). La dosis de inseminación utilizada por oveja fue de 200 millones de espermatozoides.

Para el servicio de repaso las ovejas fueron inseminadas a celo visto utilizando un sistema de detección AM-PM. Los celos fueron detectados dos veces por día, utilizando capones androgenizados. Los mismos fueron tratados con tres dosis de testosterona (Ciclopentilpropionate, im, 100 mg/dosis, Lab. Dispert, Uruguay) suministradas cada 7 días siendo la última un día previo a comenzar el ensayo. Los capones fueron pintados en la zona periprepucial utilizando una mezcla de tierra de color y agua dos veces por día. Estos permanecieron con las ovejas en una relación del 10%.

Se determinó, el número de ovejas en celo y porcentaje diario en el ciclo estral posterior al inducido en ambos protocolos (Día 0= 2^{da} dosis de PGF2 α). Se evaluó, concepción (ovejas preñadas/ovejas inseminadas), prolificidad (número de embriones/oveja preñada) y fecundidad (tasa de fertilidad x prolificidad) a los 30 días de la primera y de la segunda IA por ultrasonografía transrectal, utilizando un ecógrafo provisto de un scanner lineal de 5,0 MHz (Aloka® 500, Japón). Las tasas de concepción, y fecundidad que se obtuvieron en cada grupo fueron analizadas estadísticamente mediante el test de χ^2 o test exacto de Fisher (Sigel, 1956). La prolificidad se analizó mediante el test de Brown, (Brown,1988).

6) RESULTADOS

6.1) Tasa de concepción, prolificidad y fecundación del primer servicio.

Los resultados se resumen en el Cuadro 1. La tasa de concepción, prolificidad y fecundidad observada al primer servicio no presentó diferencias significativas entre ambos grupos ($P > 0.05$). La fertilidad tendió a ser mayor en el grupo Synchrovine® aunque la prolificidad tendió a ser menor ($P = 0.07$).

Cuadro I: Uso de GnRH asociado a Synchrovine®: resultados reproductivos obtenidos a los 30 días de servicio.

Grupo	Concepción	Prolificidad	Fecundidad
Synchrovine® (n=111)	0.49 (55/111)	1.12 (62/55)	0.55 (62/111)
Synchrovine® + GnRH (n=104)	0.37 (39/104)	1.28 (50/39)	0.48 (50/104)

6.2) Seguimiento del ciclo estral posterior al inducido y parámetros reproductivos.

Los resultados de distribución de celos para ambos protocolos se presentan en la figura I.

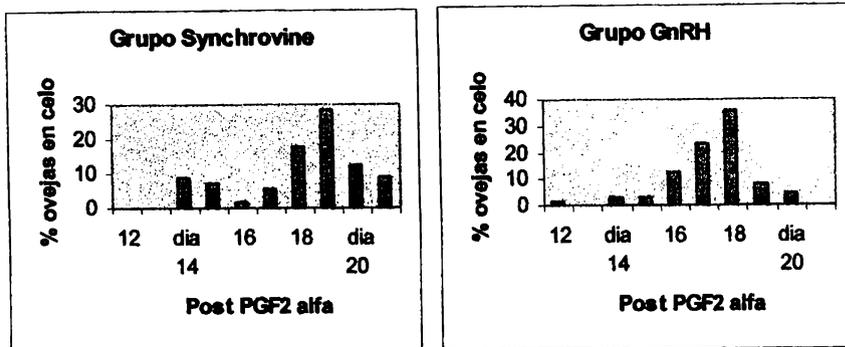


Figura I: Uso de GnRH asociado a Synchronvine®: porcentaje diario de manifestación estral en el ciclo posterior al inducido.

La distribución de celos para el segundo servicio ha sido similar entre los grupos comparados, aproximándose a una distribución normal. La duración del celo para el Grupo Synchronvine® fue de 18 ± 2 días y el grupo con GnRH $17 \pm 1,5$. Para el grupo Synchronvine® la mayor concentración de celos se observó a los días 18 y 19 pos segunda PGF2 α (18 y 29%, respectivamente). En el grupo Synchronvine® + GnRH los celos se concentraron en los días 17 y 18 (23 y 35%, respectivamente).

Respecto a los parámetros reproductivos evaluados en este ciclo, los mismos se resumen en el Cuadro II.

Cuadro II: Uso de GnRH asociado a Synchronvine®: resultados reproductivos del celo posterior al inducido.

Grupo	Concepción	Prolificidad	Fecundidad
Synchronvine® (n= 51)	0.53 (27/51)	1.37 (37/27)	0.72 (37/51)
Synchronvine® + GnRH (n=59)	0.61 (36/59)	1.44 (52/36)	0.88 (52/59)

Las tasas de concepción, prolificidad y fecundidad observada al segundo servicio no presentaron diferencias significativas entre ambos grupos ($P > 0.05$). Sin

embargo, se aprecia una mejor respuesta en los parámetros reproductivos del grupo Synchrovine® + GnRH, así como se observa una mayor concentración en los celos.

Los resultados reproductivos finales de ambos protocolos (1er + 2do servicio) se resumen en el Cuadro III.

Cuadro III: Uso de GnRH asociado a Synchrovine®: resultados reproductivos finales de ambos protocolos.

Grupo	Concepción	Prolificidad	Fecundidad
Synchrovine® (n= 111)	0.74 (82/111)	1.20 (99/82)	0.89 (99/111)
Synchrovine® + GnRH (n=104)	0.72 (75/104)	1.36 (102/75)	0.98 (102/104)

Los resultados no presentaron diferencias significativas ($P>0.05$).



7) DISCUSIÓN

La incorporación de una dosis de un análogo de GnRH al momento de la inseminación, a un protocolo de sincronización de celos con dos dosis de PGF2 α separadas 7 días e IA a las 42 h (protocolo Synchrovine®), no mejoró en forma significativa los resultados reproductivos de este protocolo.

El protocolo Synchrovine® presentó en este ensayo una concepción superior a la registrada por otros autores en forma previa (Menchaca y col., 2004). La fertilidad óptima del citado ensayo (grupo con celo natural), no fue registrada al no incluirse en el diseño experimental. Un estudio contemporáneo al presentado aquí (Forichi, 2003; Forichi y col., 2004), evidenció una fertilidad con celo natural al primer servicio, similar al grupo Synchrovine® de nuestro ensayo (49%). Este resultado plantea la hipótesis de un posible efecto año (pluviometría, estado sanitario y condición corporal de la majada al servicio), sobre los resultados anteriormente

alcanzados con Sincrovine®. En otro sentido, esta comparación deja en evidencia las ventajas de manejo del protocolo Sincrovine® (menos días de trabajo y no detección de celos) ante similares resultados reproductivos.

En nuestras condiciones experimentales el agregado de un análogo de GnRH al protocolo Sincrovine® (con el fin de sincronizar aún más la ovulación), no produjo un aumento de la concepción, tendiendo incluso a ser menor que sin ella. Resulta difícil explicar este resultado. Una posible respuesta se podría encontrar en el momento de inclusión de la dosis de GnRH del protocolo establecido. Se ha postulado que la generación de un pico natural y de un pico inducido de LH, en diferentes momentos, generaría un doble pico de LH que podría estar tendiendo a reducir la fertilidad observada (Murdoch y col., 1998; citado por Fernández Abella y Villegas, 2002). Ensayos en ovejas en los que se combina un tratamiento de PGF2 α y posterior GnRH (Rubianes y col., 1997), se obtuvo un pico de LH mayor al administrarlas separadas 36 h. respecto a administrarlas simultáneamente. Fernández Abella y Villegas (2002), comprobaron que luego de un tratamiento con progestágenos por 12 días el momento óptimo para administrar la GnRH fue a las 35 h. de retiradas las esponjas, logrando una fertilidad mayor a un grupo control sin GnRH. En nuestro ensayo, la dosis es administrada a las 42 h. de la segunda prostaglandina (momento de la IATF), luego de la luteólisis los niveles de progesterona habrán descendido y la acción de la GnRH se verá beneficiada.

Otra posible respuesta a los resultados observados podría estar en la dosis aplicada de buserelina. Algunos autores afirman que una dosis elevada de GnRH no mejoraría los resultados esperados de fertilidad (Foster, 1978; Convey, 1973). Un ensayo con ovinos utilizando una dosis de 4 μ g de buserelina seguido 5 días de una dosis de PGF2 α (100 μ g de clorprostenol) (Beck, 1996), logró un 90 % de sincronización de celo y buen nivel de preñez. A nivel nacional, Fernández Abella y Villegas (2002), en el tratamiento antes citado administró una dosis de 10 μ g, obtuvo una preñez significativamente mayor que un grupo control sin GnRH. Por tanto, la dosis utilizada en nuestro ensayo (8 μ g), no parecería en principio inadecuada.

Por otra parte, si bien la prolificidad en el grupo Sincrovine con inclusión de GnRH no fue diferente, esta tendió a ser mayor. Esto estaría acorde al posible aumento en el número de ovulaciones provocado por la inclusión de GnRH, al

estimular la acción de la LH y FSH y su papel fisiológico (estimular la maduración de los folículos, desencadenar la ovulación y facilitar la luteinización de los cuerpos lúteos). En el mismo sentido, un estudio realizado en forma contemporánea al nuestro (Forichi, 2003; Forichi y col., 2004), si bien evidenció una fertilidad similar al primer servicio, mostró una prolificidad mayor en el grupo Control (celo natural), respecto a nuestro grupo Synchrovine® ($P > 0.05$). Esta comparación y la mejora observada con la inclusión de GnRH, estaría evidenciando un posible efecto negativo en la prolificidad de las ovejas, del uso de $PGF2\alpha$ para sincronizar celos bajo el protocolo Synchrovine®.

El seguimiento del ciclo estral posterior al inducido, distribución de celos y comportamiento reproductivo, no evidenció diferencias entre el protocolo Synchrovine® con y sin la inclusión de GnRH. Mediante este seguimiento, se pudo reconocer una duración normal del ciclo estral en ambos grupos de sincronización. Primariamente se deja en evidencia la sensibilidad a la $PGF2\alpha$ del CL de tan sólo 3 días de edad como lo había postulado Rubianes y col. (2003). En el grupo con GnRH, se observó una duración normal del ciclo estral con una alta concentración de celos (70%) entre los días 16 y 18 del mismo. Se podría confirmar la efectividad del uso de la GnRH en la etapa temprana del ciclo estral en la oveja como lo ha demostrado Rubianes (1997), que tratando ovejas con $PGF2\alpha$ y GnRH simultáneamente a los 4 días del ciclo obtuvo un pico de LH con ovulación a las 48 h., seguido de un ciclo de duración normal. Por tanto, los fallos en fertilización que se observan, fundamentalmente en el lote GnRH, no se deberían a una falta de ovulación en primera instancia. Cabría investigar, si el momento y la sincronía con que ella ocurrió fue la esperada.

Los mejores resultados reproductivos del segundo servicio coinciden con la literatura (Durán del Campo y col., 1982; Durán del Campo, 1993; Bonifacino y Aragunde, 1980; Forichi, 2003), donde en tratamientos con $PGF2\alpha$, el servicio en el ciclo estral posterior al inducido resulta de una superior fertilidad. Se ha demostrado un efecto negativo del uso de la $PGF2\alpha$ sobre la fertilidad por producir cambios en las contracciones uterinas (Hawk, 1973), y en la secreción de mucus cervical (Smith y Allison, 1971).

La incorporación de otras tecnologías, como por ejemplo el seguimiento ecográfico, la endoscopia ovárica y el lavado uterino 7 días post-servicio a un subgrupo de ovejas, brindaría información más precisa de la dinámica de éste protocolo. Estaríamos en condiciones ciertas de evaluar si las ovejas ovulan o no, y de acuerdo a las estructuras que encontremos, si hay problemas en la fertilización o en el desarrollo embrionario. Ello podría explicar la menor fertilidad con que se asocia el uso de prostaglandinas en la sincronización de celos en ovinos.

Una mejora sustancial en la fertilidad de los protocolos de IATF utilizando PGF2 α generaría una importante disminución de los días de servicios y por ende de la dispersión de los partos, permitiendo así, realizar una utilización eficiente de los recursos disponibles en un predio (mano de obra y alimentación estratégica etc.), pilares básicos en la mejora de la tasa de señalada de nuestras majadas. Ventajas de orden sanitario, manejo y genético, hacen de la validación comercial de estas propuestas, valiosas herramientas para difundir la IA en un mayor número de majadas de nuestro país.

8) CONCLUSIONES

a) El agregado de una dosis de GnRH al momento de la inseminación a un protocolo de sincronización de celos con dos dosis de PGF2 α separadas 7 días e IA a las 42 h (protocolo Synchrovine®) no mejoró los resultados de concepción, prolificidad y fecundidad final de este protocolo.

b) La distribución de celos y el comportamiento reproductivo del ciclo estral posterior al inducido no presentó diferencias significativas entre ambos protocolos.

c) Se destacan ventajas de manejo y económicas, al disminuir los días de trabajo respecto a los tradicionales y prescindir de la detección de celos.

9) BIBLIOGRAFÍA

- 1- Acritopoulou, S.; Haresign, W. 1980. Response of ewes to a single injection of an analogue of PGF 2α given at different stages of oestrus cycle. *J Reprod Fert* 58: 219-223.
- 2- Azzarini, M. 1990. Producción de ovinos en América Latina. En: III Seminario Técnico de Producción Ovina. SUL. Paysandú, Uruguay. 7-56.
- 3- Azzarini, M. 2000. Consideraciones y sugerencias para mejorar los procreos ovinos. En: Una propuesta para mejorar los procreos ovinos. Boletín SUL. 3-35.
- 4- Barret, D; Bartewsky, S; Cook, S; Rawling, N. 2002. Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to PGF 2α given at different stages of luteal phase in ewes. *Theriogenology* 58: 1409-1424.
- 5- Bonino, J. 2004. Incremento de los procreos ovinos. XXXII Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay. 38-45.
- 6- Bonifacino, L.A.; Sapelli, L.; Maceira, P.; Sienna, I. 1980. Algunos aspectos del control Reproductivo en ovinos. En: Segundas Jornadas Veterinarias de Ovinos. Tacuarembó, Uruguay. 1-30.
- 7- Bonifacino, LA. y Aragunde, M. 1981. Control reproductivo en ovinos:segunda comunicación. 3as Jornadas Veterinarias de Ovinos. Tacuarembó 27 y 28 de Noviembre. 13 pp.
- 8- Beck, N.F.; Jones,M.; Davies, B.; Peters, A.R.; Williams 2002. Oestrus synchronization in ewes: the effect of combining a prostaglandin analogue with a GnRH agonist (buserelin). *J An Sci.*1996,62: 85-87.
- 9- Brown, G.H. 1988 The statistical comparisons of reproduction rates for groups of sheep. *Aust J Agric Res* 39: 899-905.
- 10- Convey, E. M. 1973. Neuroendocrine relationships in farms animals: a review. *J An Sci*, vol 37, nº3.745-755.
- 11- DIEA. 2004
- 12- DICOSE. 2005.
- 13- Durán del Campo, A.; Cash Stirling, RC. 1982 Sincronización de celos en ovinos mediante uso de prostaglandina. Resúmenes del III Congreso Nacional de Veterinaria, Noviembre, Montevideo. 345-353.

- 26- Menchaca, A; Rubianes, E. 2004. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reprod, Fert Devel* 16, 403-413.
- 27- Moller-Holtkamp, P.1980. Conceptual e lliren dos nuevas hormonas para combatir los trastornos de la reproducción en los animales. IV Jornadas Uruguayas de Buiatría, 1980, Paysandú, Uruguay.
- 28- Olivera, J.; Dighiero, M.; Oliveira, G. 2003. Sincronización de estros con un análogo de prostaglandina F2 α : Viabilidad productiva y económica. XXXI Jornadas de Buiatria. Paysandú, Uruguay .160-163.
- 29- Quinlivan, T.D; Robinson, T.J. 1969. Numbers of spermatozoas in the genital tract alter artificial insemination of progestagen treated ewes. *J Reprod Fert* 19 (1): 73-86.
- 30- Quirke, J. F.; Jennins, J. J.; Hanrahan, J. P.; Gosting, J. P.1979. Oestrus, time of ovulation, ovulation rate and conception rate in progestagen treated ewes given Gn-RH, Gn-RH analogues and gonadotrophins. *J Reprod Fert* 56: 479-488.
- 31- Restall, B.J.; Brown, G.H.; Blockey, M. de B.; Cahill, L.; Kearins, R. 1976a Assessment of reproductive wastage in sheep. 1. Fertilization failure and early embryonic survival. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry*. 16: 80, 329-335.
- 32- Restall, B.J.; Griffiths, D.A. 1976b. Assessment of reproductive wastage in sheep. 2. Interpretation of data concerning embryonic mortality. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry*. 16: 80, 336-343.
- 33- Revees, 1970. Studies on dose response relationship of luteinizing hormone- releasing hormone (LH-RH) in sheep. *J An Sci* 31: 933.
- 34- Rubianes, E; Beard, A; Diersche. D; Bartewski, P; Adams,G; Rawlings, N. (1997) Endocrine and ultrasound evaluation of the response to PGF2 α and GnRH given at different stages of luteal phase in cyclic ewes. *Theriogenology* 48:1093-1104.
- 35- Rubianes, E; Ungerfeld, R; de Castro, T. 2000a. Inducción y sincronización de celos en ovejas y cabras. Publicación del Departamento de Fisiología. Facultad de Veterinaria. Montevideo. Uruguay.
- 36- Rubianes, E. 2000b. Tesis de Doctorado, PEDECIBA, área biología, Universidad de la República, Uruguay.

- 37- Rubianes, E; Menchaca, A.; Ungerfeld, R. 2001. Avances en las técnicas de sincronización de celos en ovinos y caprinos. 4º Simposio Internacional de Reproducción Animal. 61-70.
- 38- Rubianes, E.; Ungerfeld, R.; Menchaca, A. (2002) Sincronización de celos en ovinos: Bases fisiológicas y distintas técnicas de manejo hormonal. XXX Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay. 117-122.
- 39- Rubianes, E; Menchaca, A; Carbajal, B. 2003. Response of the 1-5 day aged ovine corpus luteum to prostaglandin F 2 alpha. *An Reprod Sci* 78 :47-55.
- 40- Salgado, C. 2004. Producción Ovina: Situación Actual y Perspectivas. En: Seminario Producción Ovina. 29 y 30 de julio. Paysandú, Uruguay. 7-13.
- 41- Sigel, S. 1956. *Nonparametric statistic for the behavioral sciences*. International student edition, 313 pp.
- 42- Smith, J F and Allison, AJ. 1971. The effect of exogenous progestagen on the levels of cervical mucus in the ewe. *J Reprod Fert.* 24:279-82.
- 43- Twagiramungu, H.; Guilbault, L.; Proulx, J.; Dufour, J. 1994. Influence of corpus luteum and induced ovulation on ovarian follicular dynamics in postpartum cyclic cows treated with buserelin and cloprostenol, *J An Sci.* 72:1796-1805.
- 44- Twagiramungu, H.; Guilbault, L.; Dufour, J. 1995. Sincronization of ovarian follicular waves with a gonadotropin- releasing hormone agonist to increase the precision of oestrus in cattle: a review, *J An Sci* 73:3141-3151.
- 45- Ungerfeld, R. y Rubianes, E. 1999. Effectiveness of short-term progestogen priming for the induction of fertile oestrus with eCG in ewes during late seasonal anoestrous. *J An Sci.* 68:349-353.
- 46- Ungerfeld, R. 2003 Reproductive response of anoestrous ewes to the introduction of rams. Tesis Doctoral. *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae. Veterinaria* 163. 64 pp.
- 47- Viñoles, C; Rubianes, E. 1998. Origin of the preovulatory follicle after induced luteolysis during the early luteal phase in ewes. *Canadian J Anim Sci.* 78:429-431.
- 48- Viñoles, C.; Meikle, A.; Forsber, M.; Rubianes, E. 1999. The effect of subluteal levels of exogenous progesterone on follicular dynamics and endocrine patterns during the early luteal phase of the ewe. *Theriogenology* 51: 1351-1361.

49- Viñoles, C.; Forsberg, M.; Banchero, G.; Rubianes, E. 2000. Effect of long-term and short term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. *Theriogenology* 55:993-1004.

50- Wiltbank, M.; Haughian, J.; 2003. "GnRH: de la fisiología a la "sinc"-ología". En: Quinto simposio internacional de reproducción animal, Irac.

51- Wiltbank, M. C.; Niswender, G. D. 1992. *Anim Reprod Sci* 28: 103-110.