UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

RESPUESTA EMBRIONARIA A LA SUPEROVULACIÓN CON ALTAS O BAJAS CONCENTRACIONES DE PROGESTERONA EN OVEJAS MERINO

“por”

Hernán ARCAUS

Diego JUANENA

Rodrigo PERERA

TESIS DE GRADO presentada como uno de los requisitos para obtener el título de Doctor en Ciencias Veterinarias.

Orientación: PRODUCCIÓN ANIMAL

MONTEVIDEO
URUGUAY
2014

1. PÁGINA DE APROBACIÓN

Presidente de Mesa:

.....
Dr. Danilo Fila

Segundo Miembro:

.....
Dr. Alejo Menchaca

Tercer Miembro:

.....
Dra. Yael Filipiak

Cuarto Miembro:

.....
Dr. Federico Cuadro

Fecha: 30 / 12 / 2014

Autores:

.....
Hernán Arcaus Caminada.

.....
Diego Juanena Dondo.

.....
Rodrigo Perera Negrotto.

2. AGRADECIMIENTOS

- A nuestro tutor, Dr. Alejo Menchaca por darnos la oportunidad de realizar este trabajo, por su enseñanza continua, tiempo y dedicación brindada.
- A nuestro co-tutor, Dr. Federico Cuadro por el material brindado su dedicación y su ayuda en la corrección del trabajo escrito.
- A la Dra. Andrea Pinczak por su ayuda y enseñanza tanto en la clasificación de embriones como en la evaluación andrológica.
- Al Dr. Pedro Claudino por su ayuda en el trabajo de laparoscopía y evaluación de embriones.
- A todo el personal del Instituto de Reproducción Animal Uruguay (IRAUy) por el apoyo brindado.
- A nuestra casa de estudios Facultad de Veterinaria UdelaR.
- A nuestras familias por el apoyo incondicional, paciencia y esfuerzo que han hecho a lo largo de la carrera.
- A nuestros amigos que han sido parte no solo de nuestra carrera sino parte de nuestras vidas.
- A la Dra. Ema Dondo por su colaboración en la traducción del abstract.
- A todos los compañeros y docentes del orientado producción animal en Paysandú por brindarnos su ayuda y principalmente por su cariño y amistad.
- Al personal de la Biblioteca de Facultad de Veterinaria por la ayuda en la corrección de las referencias bibliográficas.
- A Sra. Leticia Ogando y la Comisión de tesis de grado por el asesoramiento en la gestión de la entrega de la tesis.
- A la Fundación IRAUy por darnos la posibilidad y financiar este proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

1. PÁGINA DE APROBACIÓN.....

3. LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS:

Tabla 1.

Respuesta obtenida con la superovulación……página 22

FIGURAS:

Figura 1.

Representación esquemática del diseño experimental. ……página 19

Figura 2.

Criterio utilizado para la clasificación de embriones. ……página 21

Figura 3.

Número de estructuras colectadas por donantes. ……página 22

Figura 4.

Porcentaje de embriones en cada estadío de desarrollo. ……página 23

4. RESUMEN

El objetivo del presente trabajo de tesis fue evaluar el efecto de la suplementación con progesterona durante la administración con FSH en un protocolo de superovulación de la primera onda folicular (protocolo Día 0) en ovejas Merino. El protocolo Día 0 consiste en iniciar la superestimulación con FSH al Día 0 del ciclo cuando ocurre la

with FSH was administered during the first follicular wave in the early luteal phase during the first 3,5 days of the cycle when the levels of progesterone are low. A control group was kept with this treatment (Protocol group Day 0; n= 33) while another received a device with progesterone DICO during the administration with FSH (Protocol group Day 0 + P4; n=38). Both groups received two doses of PGF2α with the last two doses of FSH. Twenty-four (24) hours after the first dose of PGF2α a dose of GnRH was administered and the artificial insemination was carried out 16 and 24 hours later. Six days (6) later the uterus was cleaned in order to collect the embryos and the response to the superovulation is evaluated. The results show that the supplementation with progesterone did not modify the number of luteal bodies per donor, compared to Protocol Day 0 which did not receive any progesterone (9,7 ± 0,9 vs. 8,2 ±0,7, respectively. P=NS). Nonetheless it allowed a greater percentage of oocytes fertilized compared to Protocol Day 0 (93,3% vs. 83,3%) respectively, (P<0,05), as well as a greater number of embryos liable to be transferred per donor (5,4 ± 0,6 vs. 3,0 ± 0,7) and a better quality in them with 83,9% vs. 72,7% (P<0,05) in G1and G2. To conclude, the supplementation with progesterone during the superovulation of the first follicular wave in its early luteal phase increases the rate of fertilization as well as the quality of the embryos in sheep.

6. INTRODUCCIÓN

HISTORIA Y PRODUCCIÓN OVINA

Los ovinos pertenecen a la clase mamíferos, orden Arteodactilos, sub orden Rumiantes, subfamilia Ovinae, genero Ovis, especie Ovis Aries (Ibáñez, 1991).

El género Ovis se clasifico en 3 subgéneros o formas ovinas salvajes: Muflón (ovejas salvajes del sur de Europa y Asia menor), Urial (originario del sudoeste asiático) y Argali (en Asia central). Estos ovinos son considerados los antecesores de los ovinos actuales (Hiendleder y col., 2001).

El origen de la domesticación de la oveja tiene lugar en el oriente medio correspondiente a la región del antiguo Egipto y Persia, donde por los ovinos pasaron a ser comunidades sedentarias de economía productoras (Zohary y col., 1998). La introducción de las ovejas de pelo al continente Americano está relacionada con los viajes de Colón. Con la esclavitud aumentan los viajes y entran a las Américas otras razas ovinas que concluyeron con la formación de razas iberoamericanas (Gonzales – Stagnaro, 1997; Wildeus, 1997). La producción ovina mundial en el año 2010 se estimó en 1068 millones de cabezas (IWTO 2010). Casi la mitad se encuentran en Asia y Oceanía. Los principales productores a nivel mundial son Nueza Zelanda en rubro carne y Australia en lana (IWTO 2010).

Uruguay se encuentra entre los principales productores ovinos, el rubro se destaca por ser extensivo a cielo abierto y cría junto con vacunos. Los principales productos son lana carne y cueros, generando entre lana y carne más del 9,6% del valor bruto de la producción agropecuaria (MGAP-DIEA 2013). El stock ovino actualmente es de 8.2

millones de cabeza de las cuales el 52% son ovejas de cría, 5% borregas de 2 a 4 dientes, 25% corderos y el resto lo completan capones, carneros ovejas de descarte, corderas, corderos, borregos diente de leche (MGAP-DIEA 2013). La producción se desarrolla en suelos basálticos en los departamentos de Salto, Artigas, Tacuarembó, Paysandú y Durazno en su mayoría (MGAP-DIEA 2013). Las principales razas del país son Corriedale (65%), Merino Australiano (14%), Ideal (8%), Merilín (3%) y Romney Marsh (2%) (IWTO 2010).

En el país se utilizan tres sistemas de producción, uno lanero donde el Merino Australiano es raza predominante, uno carnicero con razas como Texel, Hampshire Down, Poll Dorset, Southdown, entre otras, y un sistema mixto para obtención de carne y lana con razas de doble propósito como Merino Dohne o Corriedale.

La reproducción representa un pilar fundamental dentro de la producción animal y las biotecnologías de la reproducción en particular son herramientas que permiten optimizar el potencial reproductivo de los individuos. Estas biotecnologías han tenido un importante desarrollo en los últimos años, siendo probablemente las más utilizadas la sincronización del estro e inseminación artificial ya que se caracterizan por ser de fácil aplicación y no requerir un alto costo. Por su parte la superovulación y transferencia de embriones (MOET por su sigla en inglés *Multiovulation and Embryo Transfer*) han tenido un menor adopción en la producción ovina debido a su mayor costo, procedimientos quirúrgicos y mano de obra capacitada, todo esto asociado a una importante variabilidad en los resultados obtenidos (Cognié y col., 2003). Esta técnica busca obtener a partir de progenitores de alto mérito genético el mayor número posible de descendientes, utilizando el útero de receptoras de menor interés productivo o valor económico para llevar la gestación a término.

7. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

FISIOLOGIA REPRODUCTIVA EN LA OVEJA

1. Estacionalidad reproductiva.

El ovino es una especie poliéstrica estacional de día corto, la cual tiene una estación reproductiva donde la oveja es receptiva al macho y un período de inactividad denominado anestro. La duración de la estación reproductiva es regulada por diferentes factores tanto genéticas, ambientales, nutricionales y edad. La variación anual en la duración del día, las horas de luz, juegan un rol preponderante en el ciclo reproductivo. La información lumínica es recibida en fotoreceptores ubicados en la retina, por vía nerviosa (nervio óptico) es transmitida al núcleo supraquiasmático que se encuentra en el hipotálamo anterior, el núcleo supraquiasmático es el principal centro de generación de ritmos circadianos. Este transmite la información por el ganglio cervical superior a la glándula pineal. Esta glándula libera una respuesta endócrina donde la hormona melatonina juega un rol crítico en la regulación de la actividad hipotálamo – hipófisis – gonadal (Arendt, 1986; Hasting y col., 1985). Al disminuir las horas de luz cada día, aumenta la liberación de melatonina, que estimula la liberación de GnRH del hipotálamo. Cambios en la liberación de GnRH provocan

cambios correspondientes en la secreción de LH, que son responsables de la presencia o ausencia de ovulación en las hembras (Blaszczyk y col., 2004).

2. Fisiología del ciclo estral.

El ciclo estral es un conjunto de eventos que se repiten sucesivamente, lo podemos definir como el intervalo entre dos estros y se encuentra bajo control neuro-endócrino, donde participan fundamentalmente 4 órganos (hipotálamo, hipófisis, ovarios y útero) los cuales se comunican a través de hormonas. En la oveja tiene una duración de 17 ± 2 días tomando el día de la ovulación como día 0. Podemos dividir el ciclo según los cambios morfológicos y de comportamiento interconectados a una dinámica neuro-endócrina, de este modo podemos decir que el ciclo presenta 4 fases (proestro, estro, metaestro y diestro). El proestro, dura aproximadamente 3 días, el cuerpo lúteo regresa y se inicia el crecimiento terminal de los folículos, la hembra se prepara para el estro o celo. El estro es un período que varía entre 30 y 36 h en el cual la hembra es receptiva al macho, al final de esta fase, generalmente, se produce la ovulación. La fase que continúa el ciclo es el metaestro y se caracteriza por la formación del cuerpo lúteo. El diestro comienza a partir del día 5-7 del ciclo estral y cuenta con un cuerpo lúteo totalmente desarrollado, el cual en caso de existir fecundación se mantiene durante toda la preñez. A su vez lo podemos dividir en dos; fase luteal y fase folicular. La fase luteal va desde el día 2-3 del ciclo hasta alrededor del día 13 y la fase folicular que va desde la luteólisis (regresión del cuerpo lúteo), hasta el día 2 (Ungerfeld y Rubianes, 2002). La fase folicular comienza con la regresión del cuerpo lúteo, junto con la caída de la progesterona aumenta la frecuencia de los pulsos de LH aumentando los niveles basales hasta que se desencadena el pico preovulatorio de LH (Thiery y Martin, 1991). Por un lado existe una retroalimentación positiva entre GnRH y LH y los estrógenos por otro. Ante cada pulso de GnRH la hipófisis responde con uno de LH y el folículo responde con a la LH secretando estrógenos. Estos determinan que se produzca rápidamente un nuevo pulso de LH, el que inducirá un nuevo incremento de estrógenos. A su vez, el estradiol incrementa la sensibilidad de la hipófisis a la GnRH (Reeves y col., 1971) dando así el pico de LH.

Por otro lado la secreción de FSH durante el ciclo estral se caracteriza, según estudios, por la presencia de dos picos principales. El primero coincide con el pico preovulatorio de LH y el segundo aproximadamente 24-30 h después, en las cercanías de la ovulación (L'Hermite y col., 1972; Miller y col., 1981; Bister y Paquay, 1983). El primer incremento de FSH parece estar gobernado por los mismos mecanismos que determinan el pico de LH, es decir, un estímulo de la secreción de la GnRH provocado por estrógenos ováricos. El segundo incremento no está gobernado por los mismos mecanismos que el pre-ovulatorio, en este caso la GnRH parece no tener ningún efecto, siendo la desaparición de los retrocontroles negativos ováricos (principalmente inhibina y estradiol) producida por la ovulación lo que permite un aumento tónico de FSH (Ungerfeld y Rubianes, 2002). Este aumento de FSH determina el reclutamiento folicular y la emergencia de la primera onda folicular del ciclo estral.

Luego de la ovulación, las células de la teca y de la granulosa se luteinizan dando comienzo a la fase luteal, los niveles de estrógenos caen y aumentan los niveles plasmáticos de la progesterona, siendo su principal fuente de secreción el cuerpo lúteo, alcanzando un máximo entre el día 7 y 8 que se mantiene hasta el día 12. En caso de no producirse la fecundación y establecerse la gestación los niveles de

desarrollo. Las células de la teca interna poseen receptores para LH y por su estímulo producen andrógenos que pasan a través de la membrana basal a las células de la granulosa y mediante su aromatización por acción de la FSH se transforman en estrógenos. Las células de la granulosa del folículo dominante también desarrollan receptores de LH los que le permite crecer en bajas concentraciones de FSH y finalmente responder al pico preovulatorio (Bó, 2013).

Progesterona

La Progesterona es una hormona esteroidea que se sintetiza a partir del colesterol. El colesterol es un esteroide de 27 carbonos que se convierte en pregnenolona y ésta se convierte en progesterona que posee 21 carbonos. A su vez, la progesterona puede convertirse en andrógenos o en estrógenos. En rumiantes, la progesterona es secretada por las células del CL, por la placenta y por las glándulas adrenales, y es transportada a la sangre por una globulina. La regulación de la secreción de esta hormona está dada fundamentalmente por la LH y la PGF2α. La función de la progesterona es preparar al endometrio para la implantación del embrión y el mantenimiento de la preñez, mediante el incremento en el número de glándulas secretorias endometriales y la inhibición de la motilidad del miometrio. A su vez, provoca el desarrollo del tejido secretorio de las glándulas mamarias (Bó, 2013).

Con el desarrollo de la ultrasonografía transrectal se han podido combinar el radioinmunoanálisis junto con esta última técnica para el estudio del ciclo estral (González-Bulnes y col., 1999). Los altos niveles de progesterona tienen un efecto inhibitorio sobre la pulsatilidad de LH tanto en la vaca, como en la oveja. Los niveles de progesterona se correlacionan negativamente con el tamaño folicular y está demostrado que niveles altos de progesterona inducen el recambio folicular en la vaca (Adams y col., 1992) y en la oveja (Rubianes y col., 1996). Por otro lado, los niveles subluteales de progesterona provocan la persistencia del folículo dominante que desencadena la ovulación de un folículo con fertilidad disminuida (Revah y Butler, 1996). El rol de la progesterona en la maduración de ovocitos y su potencial impacto en la calidad de los mismos no ha sido bien definida. Sin embargo, hay evidencias que sugieren que existe tal rol. Elevada progesterona durante el desarrollo del folículo ovulatorio es asociado con mejores rangos de preñez (Wiltbank y col., 2011), el cambio de dominancia de estradiol a progesterona en el fluido folicular de los folículos preovulatorios en el período entre el pico de LH y la ovulación (Dieleman y col., 1983), coincide con la reanudación de la meiosis y maduración del ovocito. La inhibición de producción de progesterona *in vitro* es asociado con reducción del desarrollo embrionario (Aparicio y col., 2011)

Estrógenos

El principal estrógeno que se secreta en el ovario es el 17β-estradiol, también estrona y estriol son secretados en concentraciones menores. Las células de la teca de los folículos antrales tienen receptores de LH y las células de la granulosa de FSH. La LH induce la producción de andrógenos por parte de las células tecales que difunden hacia las células de la granulosa. Estos andrógenos son los precursores de los estrógenos bajo el estímulo de la FSH. En la medida que el folículo dominante crece, la FSH induce la formación de LH en las células de la granulosa para producir mayor

cantidad de andrógenos que resultan en mayor cantidad de estrógenos producidos por el folículo dominante (Bó, 2013).

El ciclo estral es una cadena de eventos donde el hipotálamo, la hipófisis, los ovarios y el útero interaccionan para coordinar la función reproductiva. El estradiol, así como la progesterona, tienen un rol fundamental en el control de este mecanismo. El control endócrino que realizan los estrógenos sobre el ciclo estral está determinado por la unión de estas hormonas a sus receptores (ERα y ERβ) que se ubican en diferentes sitios del tracto reproductivo.

La fase folicular del ciclo estral en rumiantes comienza con la luteólisis, donde la disminución de las concentraciones de progesterona hace que se elimine la retroalimentación negativa sobre la secreción de LH y la hipófisis comienza a secretar un pulso de LH cada 60 minutos (revisado por Bó, 2006). El incremento en los pulsos de LH estimula el desarrollo del folículo dominante, que a su vez incrementa la secreción de estrógenos (principalmente 17β-estradiol). Los niveles de estradiol aumentan desde la regresión luteal hasta el inicio del celo y este aumento en la secreción de estradiol es el responsable del comportamiento estral de las hembras y de la inducción del pico preovulatorio de LH. Para desencadenar este pico preovulatorio el estradiol aumenta la sensibilidad hipofisaria al estímulo de la GnRH, aumenta el número de receptores de GnRH en las células hipofisarias, se estimula la síntesis de gonadotropinas, aumenta el efecto "preparador" de la GnRH (la GnRH incrementa la respuesta hipofisaria a exposiciones sucesivas de esta hormona), se establece un mecanismo a nivel hipotalámico que termina en una descarga de GnRH que induce el pico preovulatorio de gonadotropinas (revisado por Bó, 2006). El pico preovulatorio de LH produce un aumento del riego sanguíneo en el ovario, se disocia el cúmulus oophurus y se deja de inhibir la meiosis del ovocito que se encontraba en profase I. Se produce un aumento y cambio en la secreción de esteroides que se manifiesta con un aumento en la secreción de progesterona a partir de la ovulación.

El estradiol también interviene en el mecanismo luteolítico al interactuar con sus receptores endometriales e inducir la síntesis de receptores para oxitocina. Luego la oxitocina circulante se une a los receptores, activa la fosfolipasa A, libera ácido araquidónico, y esto lleva a la producción de PGF2α. Como ya fue descrito la PGF2α estimula la liberación de oxitocina por parte del CL, y esta oxitocina luteal induce una mayor secreción de PGF2α por el endometrio y establece un feedback positivo que determina la lisis del CL (Bó, 2013).

SUPEROVULACIÓN Y TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

La transferencia de embriones es un método de reproducción que consiste en obtener embriones generados por una hembra donante y que posteriormente serán transferidos a hembras receptoras, lo que permite que a partir de un número reducido de reproductoras en un corto período de tiempo maximice la producción de individuos de alto valor genético.

Los primeros trasplantes de embriones de pequeños rumiantes se realizaron hace casi 80 años (Warwick y col., 1934; citado por Amstrong y Evans., 1983). A partir de

entonces ha habido muchos avances en la tecnología reproductiva de los pequeños rumiantes. El desarrollo en los programas de superovulación y transferencia de embriones ha sido bastante lento en el correr de los años debido a la variabilidad en la respuesta ovárica, a el bajo porcentaje de fertilidad asociado a la alta respuesta ovulatoria y a la alta incidencia de regresión temprana de cuerpo lúteo (Cognié., 1999). A pesar de que en los últimos años se ha avanzado mucho en el conocimiento de superovulación y transferencia de embriones, esta técnica tiene sus limitantes, principalmente vinculada a la variabilidad en la respuesta obtenida.

4. Tratamientos de superovulación

Protocolo tradicional.

Los protocolos tradicionales de superovulación (Greve y col., 1995) consisten en la aplicación de un dispositivo intravaginal de progesterona por un intervalo de 12-14 días. Antes del retiro del dispositivo de progesterona (48 h) se le aplica una dosis de un análogo de prostaglandina (PGF2α), más 6-8 dosis de FSH en dosis decrecientes con intervalos de 12 h. A las 12 h de finalizada la última dosis de FSH, se le administra una dosis de un análogo de GnRH (Cognie y col., 2003). El protocolo continúa con la inseminación entre las 16 a 26 h luego de la aplicación de la GnRH. En estos protocolos tradicionales en general se comienza el tratamiento de superovulación en presencia de un folículo dominante (Cognie y col., 2003). El principal efecto negativo de comenzar un tratamiento de superovulación en presencia de un folículo dominante es la supresión que este ejerce sobre los folículos de menor tamaño (menos de 2 mm) ya que al secretar inhibina A y estradiol inhiben la secreción de FSH provocando la atresia de los folículos subordinados (Webb y col., 2003) a su vez el folículo dominante puede cambiar la dependencia de FSH a LH mediante la adquisición de receptores de LH en la célula de la granulosa y continúa creciendo en la ausencia de FSH. Existe evidencia que el folículo dominante ejerce su dominancia no solo en las vías sistémicas, sino también en factores locales (González–Bulnes y Veiga –Lopez., 2008), esto refuerza la necesidad de iniciar el tratamiento de superovulación en ausencia de grandes folículos, pero sin embargo los protocolos tradicionales inician el tratamiento con FSH en presencia de grandes folículos en un 70-80% de las donantes (Veiga-Lopez y col., 2005; Menchaca y col., 2007b).

Por otro lado muchos estudios aseguran que comenzar un tratamiento de superovulación en ausencia de un folículo dominante resulta en un mejor reclutamiento folicular, tasa de ovulación y/o producción de embriones por oveja (Rubianes y col., 1997, González-Bulnes y col., 2002). En los últimos tiempos se han descripto nuevos aspectos en el control del desarrollo folicular que deben ser considerados en la aplicación de la tecnología de la reproducción asistida.

Teniendo en cuenta lo anterior se buscó iniciar los tratamientos de superovulación en ausencia de un folículo dominante, debido a la dificultad de conocer cuando se inician las ondas foliculares buscando solo la presencia de folículos pequeños (Menchaca y

co

negativamente afectada (Revah y Butler., 1996). Sin embargo la mayoría de los estudios que se han realizado han estado enfocados en el efecto negativo de la exposición a bajos niveles de progesterona por periodos prolongados (i.e. a la formación de folículos persistentes). Esta problemática fue superada por tratamientos que inducen el recambio folicular como el Protocolo Día 0, ya que se evita la formación de folículos persistentes. En esta tesis no se apunta a evaluar el efecto de bajos niveles de progesterona por periodos prolongados sobre la formación de folículos persistentes, sino a evaluar el efecto de altas o bajas concentraciones durante el desarrollo de folículos jóvenes en crecimiento.

En el Protocolo Día 0 la FSH se administra durante la fase luteal temprana y en general la superovulación ocurre con bajos niveles de progesterona. En este sentido, se han realizado algunos estudios en bovinos que estudian esta situación (Denicol y col., 2012), utilizaron 989 vacas lecheras en lactación con 38 ± 3 días postparto, dividiéndolas en tres grupos con tratamientos diferentes. En un grupo se indujeron los animales a ovular en la primera onda folicular (FFW), en el segundo se realizó lo mismo pero con agregado de progesterona (FFW+P4) y en un tercer grupo se indujo la ovulación de la segunda onda folicular (SFW) cuando la progesterona endógena alcanza concentraciones más altas. En este estudio la tasa de preñez fue mayor en vacas del grupo SFW y grupo FFW+P4 comparado con las del grupo FFW. Los folículos de los animales que se indujeron a ovular de la segunda onda folicular así como de la primera onda suplementada con progesterona, se desarrollan en un ambiente con niveles de progesterona más altos (≥ 1 ng/ml). Este trabajo sugiere una correlación interesante entre la concentración de progesterona durante el desarrollo folicular y la tasa de preñez.

Por su parte (Nasser y col., 2011) utilizaron 20 vacas Nelore las cuales se dividieron en 2 grupos al azar, en uno de ellos se superestimuló con FSH vacas que se encontraban en su primer onda folicular, y en un segundo grupo se realizó el mismo tratamiento pero con el agregado de progesterona exógena. Los autores demostraron que en el grupo con progesterona exógena se obtuvo mayor cantidad de embriones transferibles. A su vez se encontró mejor calidad de los embriones producidos en el grupo suplementado con progesterona.

En otro experimento (Nasser y col., 2011) compararon dos grupos de 5 vacas Nelore cada uno, superestimulados al comienzo de la emergencia de la primera onda con y sin progesterona exógena y 12 h después de la inyección de LH se sacrificaron los animales, colectándose los ovocitos por aspiración folicular una hora más tarde y evaluándose los complejos del cumulus oocitario (COC), clasificándolos en maduros a los que presentaban las células del cumulus expandidas e inmaduros a los que las mantenían compactas. No se encontraron diferencias significativas en la cantidad de folículos > 8 mm colectados entre los grupos sin progesterona y con progesterona. Sin embargo en el grupo con agregado de progesterona se obtuvieron COC más maduros que el grupo sin progesterona exógena. Observándose que en los animales que no

contaban con una fuente exógena de progesterona la respuesta de expandir las células del cumulus a la fuente exógena de LH fue menor.

Rivera y col., (2011) realizaron un estudio donde evaluaron el efecto de concentraciones de progesterona en la calidad de embriones de vacas lecheras en lactación inducidas a superovular en la primera onda. Se dividieron los animales en tres grupos, uno se indujo a ovular en la primera onda, al segundo grupo también en la primera onda pero con el agregado de progesterona y un tercer grupo de animales que eran inducidos a ovular la segunda onda folicular. Se demostró que alta concentración de progesterona durante la superestimulación aumentaba la calidad de embriones colectados el día 7 después del estro. Se obtuvo un mayor porcentaje de embriones transferibles en el grupo superestimulado e inducido a ovular en la segunda onda, seguido por el grupo inducido en la primera onda con el agregado de progesterona y por último el grupo sin progesterona. Lo mismo sucedió con el porcentaje de embriones congelables para cada grupo respectivamente. En cuanto a la calidad de los embriones se ve un mayor porcentaje de embriones degenerados en el grupo sin progesterona seguido por el grupo de la primera onda con agregado de progesterona y por último el grupo sincronizado en la segunda onda.

Por lo tanto, en ovejas es de interés conocer si el agregado de progesterona durante la superovulación de la Onda 1 mejoraría el resultado en la cantidad y calidad de embriones obtenidos. Esto nos ha llevado a evaluar el efecto de agregar un dispositivo intravaginal de progesterona durante la administración de FSH. El tratamiento nos permitiría aprovechar los beneficios de superovular la onda 1, asegurando a la vez altos niveles de progesterona durante el tratamiento.

8. HIPOTESIS

La suplementación con progesterona durante la superestimulación con FSH de la onda 1 en la fase luteal temprana mejora la producción de embriones en ovejas.

9. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el efecto de la suplementación con progesterona durante el desarrollo folicular sobre la tasa de fertilización y la calidad embrionaria en ovejas sometidas a un tratamiento de superovulación de la primera onda folicular.

Objetivos específicos

Determinar el efecto de la progesterona sobre:

- La tasa de fertilización del ovocito.

- La tasa de desarrollo embrionario *in vivo* durante 6 días luego de la fertilización
- La calidad de los embriones producidos.

10. MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES Y MANEJO

El experimento se realizó en los meses de Junio-Julio en el Instituto de Reproducción Animal Uruguay (IRAUY) ubicado en Camino Cruz del Sur 2250, Jacksonville, Montevideo, Uruguay.

Se utilizaron 71 ovejas Merino australiano entre 2 y 4 años de edad, de 40 ± 3 kg de peso corporal (media ± EE) con una condición corporal de 3,75 ± 0,25(escala 0 a 5). Los animales se mantuvieron sobre campo nativo suplementados diariamente con fardo de alfalfa y ración balanceada (1000 y 500 gr/oveja/día respectivamente), con acceso al agua *ad libitum*. Los animales fueron desparasitados previo al experimento y tuvieron un periodo de adaptación al manejo de 15 días antes de iniciar el tratamiento.

GRUPOS EXPERIMENTALES

El diseño experimental consistió en realizar una pre-sincronización del total de los animales para luego dividirlos en 2 grupos experimentales (Protocolo Día 0, n=33; Protocolo Día 0 + P4, n= 38) balanceados por edad y condición corporal.

El diseño experimental se muestra en la Figura 1. Todas las ovejas recibieron un tratamiento para inducir la emergencia de la primera onda folicular mediante la sincronización de la ovulación. La sincronización de la ovulación se logró mediante el uso de un Tratamiento Corto descrito por Menchaca y col. (2004) que consistió en la utilización de esponjas intravaginales con un análogo de progesterona (60 mg de acetato de medroxiprogesterona, Progespon, Syntex, Buenos Aires, Argentina) durante 6 días, asociado a 300 UI de eCG (Novormon, Syntex, Buenos Aires , Argentina) y 80 ug de un análogo de PGF2α (cloprostenol sódico, Ciclase DL, Syntex, Buenos Aires, Argentina) al momento del retiro de la esponja. Para asegurar un mayor grado de sincronización de la ovulación, 36 h luego del retiro de la esponja se administró una dosis de 8 μg de un análogo de GnRH i.m. (acetato de buserelina, Receptal, Intervet, Buenos Aires, Argentina). Este tratamiento permite que a las 72-84 h luego del retiro de la esponja, más del 90% de las hembras alcanzaron la ovulación (Menchaca y col. 2007b), sincronizando así la emergencia de la primera onda del ciclo.

El tratamiento de superovulación comenzó con la primera dosis de FSH administrada a las 48 h de retirar la esponja, es decir al Día 0 del ciclo estral. Para trabajar con bajos niveles de progesterona las ovejas recibieron el tratamiento con FSH tal como ha sido descrito en trabajos previos utilizando el Protocolo Día 0 durante la fase luteal temprana (Menchaca y col., 2010). Para trabajar con altos niveles de progesterona, utilizando el mismo diseño que el grupo anterior, las ovejas recibieron adicionalmente

la administración permanente de progesterona mediante un dispositivo intravaginal liberador de esta hormona (DICO, 0,3 g de progesterona, Syntex, Buenos Aires, Argentina). En ambos grupos la FSH fue administrada en ocho dosis decreciente (2,5, 2,5, 1,8, 1,8, 1,2, 1,2, 0,5 y 0,5 ml) cada 12 h durante 3,5 días. En ambos grupos junto con las dos últimas dosis de FSH se administró dos medias dosis de un análogo de PGF2α i.m. (80 µg cada una, Clopostenol sódico, Ciclase DL, Syntex, Buenos Aires, Argentina). En el grupo con progesterona alta, el DICO se removió con la primera dosis de PGF2α. En ambos grupos a las 12 h de la última FSH se administró una dosis i.m. de 8 µg análogo de GnRH y 16 y 24 h más tarde se realizó la inseminación. Este procedimiento se realizó por vía intrauterina utilizando un laparoscópio (Karl Storz Hopkins, Tuttlingen, Germany) y con semen fresco de un carnero previamente evaluado por motilidad y morfología espermática utilizando 100 millones de espermatozoides por cada inseminación.

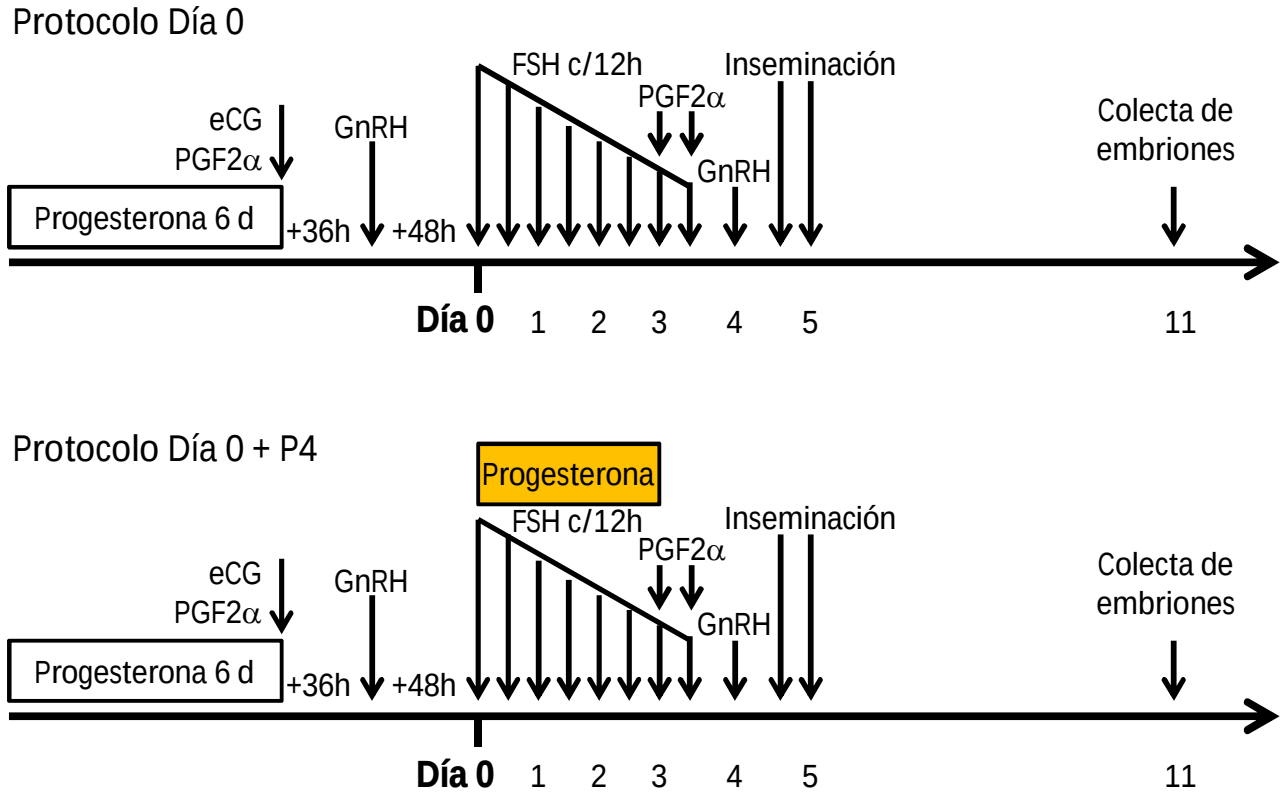

Figura 1. Representación esquemática del diseño experimental en el que se comparó la respuesta ovulatoria y embrionaria de un tratamiento de superovulación de la onda 1 durante la fase luteal temprana (Protocolo Día 0) suplementado con progesterona (Protocolo Día 0 + P4).

INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

Las ovejas se mantuvieron previo a la inseminación 24 h en ayuno sólido y 12 h en ayuno líquido. Antes de ingresar al quirófano los animales fueron sedados por medio de acepromacina al 10% a una dosis de 0.1mg/kg peso vivo, luego los animales se colocaron en una camilla especial para esta técnica con una inclinación de 45º

colocándolas en decúbito dorsal. Luego se realizaron dos pequeñas incisiones por donde ingresan los trocars para luego colocar el explorador en uno y el laparoscópio en el otro. En la exploración se ubican los cuernos del útero y ya cargada la jeringa inseminadora se aplicó en cada cuerno la mitad de la dosis de semen. Posteriormente se retiraron los trocars, y se aplicó cicatrizante local y antibiótico sistémico por vía intramuscular (Cloridrato de oxitetraciclina).

COLECTA DE EMBRIONES

La colecta de embriones se realizó 6 días posteriores a la inseminación, se colocaron los animales en la camilla con una inclinación de 45º, se esquilaron y se realizó una tricotomía en la zona ventral, luego se realizaron 3 lavados con una solución iodada y detergente neutro en la zona con el fin de desinfectar la piel y eliminar restos de suciedad. Al ingresar al quirófano se les aplicó un pre-anestésico intravenoso utilizando Diazepam (7.5 mg i.v., Unizepan, Unimedical, Montevideo, Uruguay) y Ketamina (100 mg i.v., Vetanarcol, Konig, Buenos Aires, Argentina) para luego pasar a una anestesia inhalatoria con Isofluorano (eter1-cloro-2.2.2-trifluoroetil-difluorometilico, Forane, Abbott, Reino Unido).

Una vez el animal dormido en el quirófano y colocados los campos quirúrgicos estériles correspondientes se realizó una incisión de 5 cm de longitud paralela a la línea media y craneal a la ubre que permitió exteriorizar los cuernos uterinos, cada cuerno uterino fue lavado por separado insertando un catéter de 18G próximo a la unión utero-tubal por el cual se hizo pasar 30 ml de medio de lavado (Complete Flushing Solution, ICP, Auckland, Nueva Zelanda) que fue colectado con una sonda Foley 8 o 9 Fr insertada en la bifurcación externa del cuerno. Los embriones fueron colectados en una caja de Petri de 90 mm.

Todo esto se efectuó de una forma aséptica (con instrumental, guantes, campos estériles) y separación de zona sucia-zona limpia para evitar la contaminación del animal y desinfección del quirófano entre cada animal que ingresó. Luego de la cirugía a cada animal se le aplicó una dosis de PGF2α y un antibiótico de larga acción por vía intramuscular (Cloridratro de oxitetraciclina a la dosis 1ml / 10 kg de peso vivo).

EVALUACIÓN DE EMBRIONES

Las estructuras colectadas se clasificaron de acuerdo a las normas establecidas por la *International Embryo Transfer Society* (IETS; Stringfellow, 2009) utilizando para ello una lupa estereoscópica. El criterio para la clasificación de los embriones se muestra en la Figura 2.

comparación a vacas expuestas a altas concentraciones de progesterona. El IGF-1 es un factor de crecimiento importante para el desarrollo y diferenciación de las células de la granulosa y la teca afectando por lo tanto la capacidad de desarrollo de los folículos y los oocitos (Shahiduzzaman y col., 2010). A su vez las bajas concentraciones de progesterona resulta en un aumento de la frecuencia de pulsos de LH aumentando la secreción de estradiol folicular y prolongando el crecimiento del folículo dominante, llevándolo a una maduración precoz (Bridge y Fortune, 2003). Este adelanto en la maduración del ovocito cuando el folículo aún no está próximo a la ovulación, es debido a que la meiosis II se reinicia prematuramente y esto reduce su fertilidad (Mihm y col., 1994) con respecto a los folículos expuestos a concentraciones de progesterona más altas. En nuestro trabajo no generamos la presencia de folículos persistentes porque el Protocolo Día 0 fue diseñado justamente para evitar este fenómeno (Menchaca y col., 2010), pero sí es probable que el efecto negativo de bajas concentraciones de progesterona sobre IGF-1 esté presente.

En los animales del Protocolo Día 0 más el agregado de progesterona exógena se observó un aumento en el número de embriones transferibles, el resultado dio por encima del 40% en este grupo, así como también un aumento de 11 puntos porcentuales en el número de los embriones congelables, encontrándose una mayor proporción de embriones Grado 1 y Grado 2. Estos resultados coinciden con estudios anteriores donde se encontraron resultados similares comparando vacas Nelore (Nasser y col., 2011) y vacas lecheras en lactación (Rivera y col., 2011) superovuladas durante la onda 1 con y sin el agregado de progesterona exógena. De esta manera vemos como se compromete la calidad de los embriones cuando la superovulación se administra durante la fase luteal temprana cuando los niveles de progesterona son bajos. Si bien en nuestro estudio no contamos con información que pueda explicar el mecanismo responsable de esta respuesta, Nasser y col. (2011) realizaron un estudio que puede ayudarnos a comprender este resultado. En su experimento estos autores utilizaron 10 vacas Nelore divididas al azar en dos grupos en los que se sincronizó la emergencia de la primera onda folicular y uno de ellos recibió el agregado de progesterona exógena. En este caso se sacrificaron las vacas 12h luego de la inseminación y de administrada una dosis de pLH, los complejos del cumulus ovocitario (COC) fueron obtenidos por aspiración folicular para su posterior evaluación. Si bien se obtuvieron números similares de COC en ambos grupos, los que se obtuvieron en el grupo sin agregado de progesterona exógena presentaban menos expansión de las células del cumulus, reflejando menor grado de maduración. La menor calidad de los COC en el grupo sin progesterona exógena puede explicar la reducción de la calidad de los embriones producidos en los otros estudios y en nuestro propio experimento. Por lo tanto, la menor expansión de las células del cumulus en el grupo sin progesterona se ha relacionado con una incapacidad intrínseca del ovocito para lograr la maduración reduciendo así la competencia ovocitaria y el desarrollo embrionario posterior. Como una explicación alternativa Nasser y col. (2011) proponen que esta respuesta pudo haber estado relacionada con una concentración de estradiol más alta en las vacas con menos progesterona, interfiriendo con el medio interno del oviducto alterando la fertilización y el desarrollo embrionario posterior debido a la disminución en la actividad de las células secretoras del oviducto.

En lo referido a la mejor calidad de los embriones obtenidos con la suplementación de progesterona, contamos con poca información que nos pueda explicar los resultados. Un estudio realizado por Ahmad y col. (1995) muestra que los folículos persistentes derivados de la exposición a bajas concentraciones de progesterona tenían diámetros más grandes y tenían menos probabilidades de producir embriones que lleguen a la fase de 16 células o embriones que puedan ser clasificados como excelentes. Sin embargo, en nuestro experimento si bien no fue medida la dinámica folicular, estudios previos demuestran que no se generan folículos persistentes cuando se superovula la onda 1 (Menchaca y col., 2010), sino todo lo contrario ya que este protocolo fue diseñado justamente para evitar esta situación. Por otra parte (Denicol y col., 2012) demostró la existencia de una correlación entre la concentración de la progesterona durante el crecimiento del folículo y el porcentaje de vacas que producen embriones de calidad excelentes o muy buenos cuando presentan una concentración de progesterona sanguínea mayor o igual a 2ng/ml que resulta en el mayor porcentaje de vacas produciendo al menos un embrión en condiciones de excelencia para el congelamiento. Este antecedente es coincidente con nuestros resultados, demostrando ahora en ovejas que el fenómeno también está presente en esta especie.

13. CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo permiten concluir que la suplementación con progesterona exógena durante la superestimulación con FSH de la primera onda folicular permite:

- Aumentar significativamente la tasa de fertilización.
- Colectar una mayor cantidad de embriones transferibles.
- Mejorar la calidad de los embriones colectados obteniendo un mayor número de embriones Grado 1 y 2.

14. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1) **-Adams G, Matteri R, Kastelic J, Ko J, Ginther O. (1992)**. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. J Reprod Fert; 94: 177-188.
2) **-Ahmad N, Schrick F, Buthcher R, Inskeep E. (1995)**. Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cows. Biol Reprod; 52: 1129–35.
3) **-Aparicio I, Garcia-Herreros M, O'Shea L, Hensey C, Lonergan P, Fair T. (2011)** Expression, regulation and function of genomic and non-genomic progesterone receptors in bovine cumulus oocyte complexes during in vitro maturation. Biol Reprod; 84: 910–921.

4) **-Armstrong D, Evans G. (1983).** Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. Theriogenology; 19: 31-42.
5) **-Arendt, J. (1986).** Role of the pineal gland and the melatonin in seasonal reproductive function in mammals. Biol Reprod; 8: 266-320.
6) **-Baerwald A, Adams G, Pierson R. (2003)**. A new model for ovarian follicular development during the human menstrual cycle. Fert Steril; 80: 116–122.
7) **-Baird D, Campbell B, Mann G, Mc Neilly A, (1991)**. Inhibin and oestradiol in the control of FSH secretion in the sheep. J Reprod Fert; 43: 125-138.
8) **-Bartlewski P, Beard A, Cook S, Chandolia R, Honaramooz A, Rawlings N. (1999).** Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. J Reprod Fert; 115: 111-124.
9) **-Bister J, Paquay R. (1983**). Fluctuations in the plasma levels of the follicle-stimulating hormone during estrous cycle, anestrous, gestation and lactation in the ewe: evidence for an endogenous rhythm of FSH release. Theriogenology; 19: 565-582.
10) **-Blaszczyk B, Udala J, Gaczarzewicz D. (2004).** Changes in estradiol, progesterone, melatonin, prolactin and thyroxin concentrations in blood plasma of goats following induced estrus in and outside the natural breeding season. Small Rum Res; 51: 209-219.
11) **-Bó G. (1996).** Manipulación de la dinámica folicular en el ganado Bovino: Su aplicación en el trabajo de transferencia de embriones. I Simposio Internacional de Reproducción Animal 2 Córdoba, Argentina. pp. 53-67.
12) **-Bó G. (2013).** Especialidad en reproducción Bovina. Fisiología de la reproducción de la vaca. pp. 5-30.
13) -**Bridges P, Fortune J. (2003**). Characteristics of developing prolonged dominant follicles in cattle. Domest. Anim. Endocrinol; 25: 199–214.
14) **-Campbell B, Scaramuzzi R, Webb R. (1995).** Control of follicle development and selection in sheep and cattle. J Reprod Fert Suppl; 49: 335-35.
15) **-Cerri, R, Chebel R, Rivera F, Narciso C, Oliveira R, Amstalden M, Baez-Sandoval G, Oliveira L, Thatcher W, Santos J. (2011)**. Concentration of progesterone during the development of the ovulatory follicle: II. Ovarian and uterine responses. J. Dairy Sci; 94: 3352-3365.
16) **-Cognie Y, Baril G, Poulin P, Mermillod P. (2003**). Current status of embryo technologies in sheep and goat. Theriogenology; 59: 171-188.
17) -**Cognie Y. (1999).** State of the art in sheep-goat embryo transfer. Theriogenology; 51: 105-116.
18) **-Denicol A, Lopes G, Mendoca L, Rivera F, Guagnini F, Perez R, Lima J, Bruno R, Santos J, Chebel R. (2012)**. Low progesterone concentration during the development of the first follicular wave reduces pregnancy per insemination of lactating dairy cows. J Dairy Sci; 95: 1794-1806.
19) **-Dieleman S, Bevers M, Poortman J, Van Tol H. (1983)**. Steroid and pituitary hormone concentrations in the fluid of preovulatory bovine follicles relative to the peak of LH in the peripheral blood. J Reprod Fertil; 69: 641–649.17
20) **-Driancourt M. (2001).** Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation or reproduction. Theriogenology; 55: 1211-1239.

21) **-Evans A, Duffy P, Hynes N, Boland M. (2000).** Waves of follicle development during the estrous cycle in the sheep. Theriogenology; 53: 699-715.
22) **-Gibbons J, Kot K, Thomas D, Wiltbank M, Ginther O. (1999).** Follicular and FSH dynamics in ewes with a history of high and low ovulation rates. Theriogenology; 52: 1005-1020.
23) **-Ginther O, Kot K, Kulick L, Wiltbank M. (1997).** Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. Theriogenology; 48: 75-87.
24) **-Ginther O, Kot K, Wiltbank M. (1995)**. Association between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. Theriogenology; 43: 689-703.
25) **-Ginther O, Kot K. (1994).** Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. Theriogenology; 42: 987-1001.
26) **-Ginther O, Knopf L, Kastelic J. (1989)**. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. J Reprod Fert; 87: 223–230.
27) **-Goding, J. (1974).** Demonstration that PGF2a is the uterine luteolysin in the ewe. J Reprod Fert; 38: 261-271.
28) **-González-Bulnes A, Veiga-Lopez A. (2008).** Evidence of intraovarian follicular dominance effects during controlled ovarian stimulation in a sheep model. Fert Steril; 89: 1507–1513.
29) **-Gonzalez-Bulnes A, Santiago-Moreno J, Cocero M, Souza C, Groome N. (2002)**. Measurement of inhibin A and follicular status predicts the response of ewes to superovulatory FSH treatments. Theriogenology; 57: 1263-1272.
30) **-González-Bulnes A, Santiago-Moreno J, Gómez-Brunet A, Inskeep E, Towsend E, López S. (1999).** Follicular dynamics during estrous cycle in dairy goats. Anim Sci; 68: 547-554.
31) **-González-Stagnaro C. (1997).** Comportamiento maternal y s

38) **-Leymarie P, Martal J. (1993).** The corpus luteum from cycle to gestation. En: Thibault C, Levasseur M, Hunter R. Reproduction in mammals and in man. Paris, Ellipses. pp: 413–434
39) **-Leyva V, Buckrell B, Walton J. (1998).** Regulation of follicular activity and ovulation in ewes by exogenous progestagen. Theriogenology; 50: 395-416.
40) **-Levasseur M. (1983).** Utero-ovarian relationships in placental mammals: role of uterus and embryo in the regulation of progesterone secretion by the corpus luteum. A review. Reprod Nutri Develop; 23: 783-816.
41) **-Menchaca A, Vilariño M, Crispo M, De Castro T, Rubianes E. (2010).** New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. Reprod Fert Develop; 22: 113–118.
42) **-Menchaca A, Miller V, Salveraglio V, Rubianes E. (2007a).**Endocrine, luteal and follicular responses after the use of the shorttermprotocol to synchronize ovulation in goats. Anim Reprod Sci; 102: 76–87.
43) **-Menchaca A, Vilariño M, Crispo M, Pinczak A, Rubianes E. (2007b)**. Day 0 protocol: Superstimulatory treatment initiated in the absence of a large follicle improves ovarian response and embryo yield in goats. Theriogenology; 68: 1111-1117.
44) **-Menchaca A, Miller V, Gil J, Pinczak A, Laca M, Rubianes E. (2004)**. Prostaglandin F2alpha treatment associated with timed artificial insemination in ewes. Reprod Domest Anim. 39:352-355.
45) **-Menchaca A, Pinczak A, Rubianes E. (2002).** Follicular recruitment and ovulatory response to FSH treatment initiated on Day 0 or Day 3 postovulation in goats. Theriogenology; 58: 1713-1721.
46) **-MGAP-DIEA, Dirección Estadística Agropecuaria. (2013)**. Anuario Estadístico Agropecuario 2013. Disponible en: http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,754,O,S,0,MNU;E;27;9;MNU. Fecha de consulta: 25/05/2014.
47) **-Mihm M, Baguisi A, Boland M, Roche J. (1994**). Association between the duration of dominance of the ovulatory follicle and pregnancy rate in beef heifers. J. Reprod. Fertil; 102: 123–130.
48) **-Miller K, Nordheim, E, Ginther, O. (1981**). Periodic fluctuations in FSH concentrations during the ovine estrous cycle. Theriogenology; 16: 669-679.
49) **-Nasser L, Só Filho M, Reis E, Rezende C, Mapletoft R, Bó G, Baruselli P. (2011).** Exogenus progesterone enhances ova and embryo quality following superestimulation of the first folicular wave in Nelore (Bos indicus) donors. Theriogenology; 76: 320-327.
50) **-Pant H, Hopkinson C, Fitzpatrick R. (1977).** Concentration of oestradiol, progesterone, luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in the jugular venous plasma of ewes during the oestrus cycle. J Endocri; 73: 247-255.
51) **-Pierson J, Baldassarre H, Keefer C, Downey B. (2003).** Influence of GnRH administration on timing of the LH surge and ovulation in dwarf goats. Theriogenology; 60: 397-406.
52) **-Ravindra J, Rawlings N, Evans A, Adams G. (1994)**. Ultrasonographic study of ovarian follicular dynamics in ewes during the oestrous cycle. J Reprod Fert; 101: 501-509.

53) **-Reeves J, Arimura A, Schally A, (1971).** Changes in pituitary responsiveness to luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) in anestrous ewes pretreated with estradiol benzoate. Biol Reprod; 4: 88-92.
54) **-Revah I, Butler W. (1996).** Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. J Reprod Fert; 106: 39-47.
55) **-Rivera F, Mendonca L, Lopes G, Santos J, Perez R, Amstalden M, Correa-Calderon A, Chebel R. (2011).** Reduced progesterone concentration during growth of the first follicular wave affects embryo quality but has no effect on embryo survival post transfer in lactating dairy cows. Reproduction; 141: 333-342.
56) **-Rubianes E, Ungerfeld R, Viñoles C, Rivero A, Adams G. (1997).** Ovarian response to gonadotropin treatment initiated relative to wave emergence in ultrasonographically monitored ewes. Theriogenology; 47: 1479–1488.
57) **-Rubianes E, de Castro T, Carbajal B. (1996)**. Effect of high progesterone levels during the growing phase of the dominant follicle of Wave 1 in ultrasonically monitored ewes. Can J Anim Sci; 76: 473-475.
58) **-Shahiduzzaman A, Beg M, Palhao M, Siddiqui M, Shamsuddin M, Ginther O. (2010).** Stimulation of the largest subordinate follicle by intrafollicular treatment with insulin-like growth factor 1 is associated with inhibition of the dominant follicle in heifers. Theriogenology; 74: 194–201.
59) **-Shrick F, Sourface R, Pritchard J, Dailey R, Townsend E, Inskeep E. (1993).** Ovarian structures during the estrous cycle and early pregnancy in ewes. Biol Reprod; 49: 1133-1140.
60) **-Stankov B, Kanchev L. (1984).** Plasma concentrations of testosterone androstenedione, progesterone, oestradiol 17β, LH and FSH during the preovulatory period in the ewe. Anim Reprod Sci; 7: 521-529.
61) **-Stringfellow D. (2009).** Recommendations for the sanitary handling of in vivo derived embryos. En: International Embryo Transfer Society. Manual of the International Embryo Transfer Society. 4a ed., IETS, Savoy, p. 65-68.
62) **-Thiery J, Martin G. (1991).** Neurophysiological control of the secretion of gonadotrophin releasing hormone and luteinizing hormone in the sheep. Reprod Fert Develop; 3: 137-173.
63) **-Thomas G. (1985).** Use of active immunization to evaluate the roles of progesterone during the oestrus cycle of the ewe. En: Lindsay, DR, Pearce DT. Reproduction in sheep London, Cambridge University, pp. 7-9.
64) **-Ungerfeld R, Rubianes E. (2002).** Short term primings with different progestogen intravaginal devices (MAP, FGA and CIDR) for eCG-estrous induction in anestrus ewes. Small Rum Res; 46: 63-66.
65) **-Veiga-Lopez A, González-Bulnes A, García-García R, Domínguez V, Cocero M. (2005).** The effects of previous ovarian statuson ovulation rate and early embryo development in response to superovulatory FSH treatments in sheep. Theriogenology; 63: 1973–1983.
66) **-Viñoles C, Forsberg M, Banchero G, Rubianes E. (2002).** Ovarian follicular dynamics and endocrine profiles in Polwarth ewes with high and low body condition. Anim Sci; 74: 539-545.

67) **-Viñoles, C, Banchero, G, Rubianes, E. (1999a)**. Follicular wave pattern and progesterone concentrations in cycling ewes with high and low body condition score. Theriogenology; 51: 437.
68) **-Viñoles C, Meikle A, Forsberg M, Rubianes E. (1999b).** 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.
69) **-Webb R, Nicholas B, Gong J, Campbell B, Gutierrez, C, Garverick H, Armstrong D. (2003).** Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. Reproduction Supp; 61: 71–90.
70) **-Wildeus S. (1997).** Hair sheep genetic resources and their contribution to diversified small rumiant production in the United State. J Anim Sci; 75: 630-640.
71) **-Wiltbank M, Souza A, Carvalho P, Bender R, Nascimento A. (2011).** Improving fertility to timed artificial insemination by manipulation of circulating progesterone concentrations in lactating dairy cattle. Reprod Fert Dev; 24: 238–243.
72) **-Zohary D, Tchernov E, Kolska Horwitz L. (1998).** The role of unconscious selection in the domestication of sheep and goats. J Zoo; 245 (2): 129-135.