

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

**RESPUESTA REPRODUCTIVA EN OVEJAS SINCRONIZADAS CON DOS DOSIS
DE UN ANÁLOGO SINTÉTICO DE PROSTAGLANDINA F_{2α} ADMINISTRADA A
DIFERENTES INTERVALOS de TIEMPO**

por

Ramiro DUTRA DA SILVERA

Dolores SOLER SIENRA

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

MODALIDAD: Ensayo experimental

MONTEVIDEO
URUGUAY
2013

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

Rodolfo Ungerfeld

Segundo miembro (Tutor):

Dr. Julio Olivera Muzante

Tercer miembro:

Dr. Jorge Gil Laureiro

Fecha:

20 / 12 / 13

Autores:

Ramiro Dutra Da Silvera

Dolores Soler

AGRADECIMIENTOS

- A nuestro tutor el Dr. Julio Olivera quien nos apoyó a lo largo de todo este trabajo, brindándonos sus valiosos aportes y dedicando su tiempo para la elaboración del mismo.
- A nuestro co-tutor el Dr. Sergio Fierro por la realización del trabajo ecográfico y por sus aportes, dedicación y opiniones en la elaboración de este trabajo.
- A nuestras familias, amigos y compañeros que desde un principio nos han acompañado en este camino y nos brindaron su apoyo incondicional en los momentos más difíciles para seguir adelante.
- A la dirección de la Escuela Agraria “La Carolina” por el aporte de los animales, instalaciones y el alojamiento ofrecido durante el trabajo de campo.
- Al trabajo de los funcionarios, pasantes, y de los estudiantes en cursos curriculares (2012) de la Escuela Agraria “La Carolina”, sin el mismo la realización del trabajo de campo de ésta tesis no hubiera sido posible.
- A la Facultad de Veterinaria en la EEMAC por brindarnos alojamiento y salones de clase las veces que fueron necesarias.
- A funcionarios/as de Biblioteca de la Facultad de Veterinaria por su tiempo dedicado.
- A la Universidad de la República por la financiación de este proyecto - CCI (Cursos de Educación Permanente de Facultad de Veterinaria del Norte).

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	5
RESUMEN	6
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN.....	8
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
A) RECORDATORIO FISIOLÓGICO: CICLO ESTRAL	9
B) INSEMINACIÓN ARTIFICIAL	12
C) MÉTODOS DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL (IA).....	13
D) SINCRONIZACIÓN E INDUCCIÓN DE ESTROS EN OVINOS	13
E) PROTOCOLOS DE SINCRONIZACIÓN DE ESTROS PARA IATF	14
HIPÓTESIS	19
OBJETIVOS	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
RESULTADOS.....	23
A) RESPUESTA ESTRAL Y DISPERSIÓN OBSERVADA EN LOS ESTROS CON LOS DISTINTOS PROTOCOLOS DE PROSTAGLANDINA	23
B) VALORACIÓN REPRODUCTIVA	24
DISCUSIÓN	26
CONCLUSIONES	29
BIBLIOGRAFÍA	30

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Pág.

TABLAS

Tabla 1. Modificaciones realizadas al protocolo de IATF Synchrovine® (dos dosis de prostaglandina separadas siete días) y resultados de fertilidad (%) y prolificidad obtenidos por diferentes autores.....17

Tabla 2. Resultados reproductivos de diferentes protocolos de sincronización e IA a estro detectado en base a prostaglandinas (separación de 10,12,14 y 16 días entre dosis), y estro espontáneo pre-sincronizado.....24

FIGURAS

Figura 1. Esquema del crecimiento folicular en ondas en la oveja.....10

Figura 2. Esquema de regulación hormonal del eje hipotálamo-hipófisis-ovario.....12

Figura 3. Esquema del diseño experimental21

Figura 4. Dispersión de estros previo y posterior a una segunda dosis de prostaglandina y total acumulado pos segunda dosis de prostaglandina en diferentes protocolos de sincronización (separación de 10, 12, 14 y 16 días entre dosis).....23

RESUMEN

El objetivo general de este trabajo fue el estudio de la respuesta reproductiva obtenida en ovejas sincronizadas con dos dosis de PGF 2α (PG), administradas a diferentes intervalos de tiempo. El experimento fue realizado en UTU-Escuela Agraria "La Carolina" (33° S – 57° O), durante la estación reproductiva (marzo-abril), con 164 ovejas Corriedale multíparas asignadas por estado corporal y peso vivo a cuatro protocolos de sincronización de estros: dos dosis separadas 10, 12, 14 ó 16 días (PG10, PG12, PG14 y PG16, respectivamente; n=33 ovejas/grupo); y un grupo control de estro espontáneo (ovejas pre-sincronizadas con dos dosis de PG y detección del estro espontáneo posterior al inducido; EE, n=32). Se evaluó la respuesta estral (ovejas en estro/sincronizadas*100) mediante el uso de retarjos (3/100 ovejas), el porcentaje de ovejas que ovularon y la tasa ovulatoria (TO) mediante ecografía trans-rectal al Día 10 (Día 0= día de administración de la segunda PG), y los resultados reproductivos del servicio de IA vía cervical a estro detectado por ecografía trans-rectal (Día 35). La respuesta estral pos segunda PG fue de 97, 100, 94 y 73 % (grupos PG10, PG12, PG14 y PG16 respectivamente), siendo PG16 inferior a los demás grupos ($P<0,05$). El porcentaje de ovejas que demostró estro entre las 24 y las 60 h pos segunda PG fue mayor ($P< 0,05$) en el grupo PG12 (97 %) respecto a los grupos PG14 (73 %) y PG16 (70 %), sin diferencias con el grupo PG10 (91%). El porcentaje de ovejas que ovularon en el grupo PG16 (70%) fue inferior a los demás grupos ($P<0,05$). No se obtuvieron diferencias en TO entre grupos de PG, ni con el grupo de EE ($P>0,05$). Una mayor fertilidad (ovejas gestantes/ovejas sincronizadas) y concepción (ovejas gestantes/ovejas inseminadas) fue observada para los grupos PG14 (55%) y EE (52%) respecto a los grupos PG10 (23%) y PG12 (22%) ($P<0,05$), sin diferencias estadísticas con el grupo PG16 (42%). La prolificidad (fetos/oveja gestante) fue mayor para el grupo PG12 (1,57) en comparación con el grupo de EE (1,12) ($P<0,05$), y el grupo PG10 (1,17) ($0,05>P<0,08$), sin diferencias con los demás grupos. Se observó una mayor fecundidad (fetos/ovejas sincronizadas) de los grupos PG14 (70%) y EE (58%) respecto a los grupos PG10 (25%) y PG12 (33%), y del grupo PG14 respecto al grupo PG16 (40%) ($0,05>P<0,08$). Se concluyó que: 1) los grupos PG10 y PG12 serían los protocolos más adecuados para evaluar en programas de IATF; 2) el uso de protocolos de PG con separaciones de 10, 12, 14 y 16 días no alteraría la TO en comparación con el estro espontáneo; 3) los protocolos PG14, PG16 y EE serían de elección en programas de IA vía cervical con semen fresco y estro detectado.

ABSTRACT

The aim of this trial was to evaluate the reproductive performance obtained with the use of different PG-based protocols in synchronized sheep. The experiment was carried out during breeding season (March to April) at UTU-Escuela Agraria "La Carolina" (33° S – 57° W). Multiparous Corriedale ewes (164) were assigned according to body and live weight to a four synchronized groups: two separated PG doses given 10, 12, 14 and 16 d apart (PG10, PG12, PG14 and PG 16 respectively; n= 33 ewes per group); and a control group (pre-synchronized: two doses 8 d apart and detection of the following spontaneous oestrus after induced oestrus; EE, n= 32). Oestrus response (oestrus ewes/synchronized ewes) measured by the use of teasers (3/100), ovulated ewes, ovulation rate (OR) and reproductive performance after AI at detected oestrus (by trans-rectal ultrasonography, Day 10 and 35 respectively) were evaluated. Oestrus response after second PG was higher in PG10, PG12, PG14 compared PG16 (97, 100, 94 y 73%; $P<0,05$). Oestrus response between 24 to 60 h after second PG was higher in PG12 (97%) compared PG14 (73%) and PG16 (70%), but without statistical differences with PG10 (91%). The percentage of ovulated ewes was lower in PG16 (70%) compared other groups. OR was similar among synchronized groups and with EE group ($P>0.05$). Fertility (pregnant/synchronized ewes) and conception rates (pregnant/inseminated ewes) in PG14 (55%) and EE (52%) were higher compared with PG10 (23%) y PG12 (22%) ($P<0.05$), but no differences were observed with PG16 (42%). Prolificacy (foetus/pregnant ewe) was higher in PG12 (1.57) compared with EE (1.12) ($P<0.05$) and PG10 (1.17) ($0.05>P<0.08$), but without differences with the other groups. Fecundity (foetus/synchronized ewes) was higher in PG14 (70%) and EE (58%) compared with PG10 (25%) and PG12 (33%); and PG14 compared with PG16 (40%) ($0.05>P<0.08$). It was concluded that: 1) groups PG10 and PG12 were the selected groups for TAI programs; 2) the use of PG-based protocols with 10, 12, 14 and 16 days of PG doses intervals did not affect OR in comparison with spontaneous oestrus; 3) protocols PG14, PG16 and EE were a better option to use in cervical AI at detected oestrus with fresh semen.

INTRODUCCIÓN

Luego de una importante caída del stock ovino en las dos últimas décadas, nuestro país vive un período de aparente estabilidad en lo que se refiere a la producción ovina y sus productos, con la aparición de nuevos mercados y mejores valores de exportación tanto para lana como para carne ovina de calidad (SUL, 2013). Esto ha provocado una nueva revalorización del rubro y un incremento ya visible en sus existencias (DICOSE, 2012). Es por ello que se visualiza el interés de muchos productores ligados aún al rubro (MGAP-DIEA, 2011), a maximizar la producción y la eficiencia económica con el mismo.

Entre las herramientas disponibles para incrementar el retorno con ovinos, la Inseminación Artificial (IA) es una tecnología que permite maximizar el uso de los mejores reproductores logrando así optimizar el progreso genético de las majadas (Menchaca y Rubianes, 2004). En un contexto de explotaciones cada vez más eficientes, las cuales demandan nuevas técnicas de reproducción, la IA a Tiempo Fijo (IATF) aparece como una alternativa útil para minimizar algunos problemas de manejo, de disponibilidad de mano de obra, de errores en la detección de estros, de problemas sanitarios concomitantes, y de costos derivados de la IA tradicional a estro detectado. La IATF permitiría el uso de un mismo semental en varios establecimientos en la misma estación de cría, maximizando de esta forma la difusión del mismo y permitiendo a grupos de productores acceder a la compra de reproductores de alto valor. Además la IATF permitiría, por concentrar en forma importante los eventos, una utilización más eficiente de los escasos recursos disponibles en un predio como ser una alimentación focalizada pre-servicio y pre-parto, el uso eficiente de la mano de obra por posibilitar una parición concentrada y por ende mejor controlada, además de progenies mucho más parejas para su recría e invernada (Olivera y Gil, 2005).

Para lograr una IATF exitosa es importante lograr una efectiva sincronización de estros y ovulaciones para luego poder inseminar el mayor número de hembras por día sin la necesidad de detectar estros (Menchaca y Rubianes, 2004). Pero para masificar esta biotecnología es importante alcanzar aceptables resultados por la vía cervical, con protocolos mucho menos costosos, de fácil implementación, y que consideren aspectos del bienestar "humano-animal-ambiental" (residuos en carne y leche, estrés animal por manejos prolongados, residuos en ambiente; Olivera-Muzante y col., 2011a). Para ello es necesario investigar y validar otros protocolos de sincronización de estros, que equiparen los resultados de los tradicionales métodos utilizados hasta el momento. Es éste el principal fundamento de la línea del trabajo de Tesis de Grado aquí presentado.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

A) RECORDATORIO FISIOLÓGICO: CICLO ESTRAL

La mayoría de las razas ovinas son poliéstricas estacionales, es decir empiezan a reproducirse cuando las horas de luz disminuyen, por lo que se llaman reproductores de día corto. Cuando los días comienzan a acortarse luego del solsticio de diciembre el fotoperiodo actúa estimulando el eje glándula pineal-hipotálamo-hipófisis-ovarios. La melatonina secretada por la glándula pineal hace de mediador en la respuesta a los cambios de las horas-luz, es decir actúa como una señal para el eje neuroendocrino (Durán del Campo, 1980).

El ciclo estral es un conjunto de eventos endocrinos donde cada uno inicia el paso siguiente. En la revisión de Ungerfeld (2002a) se expone que la duración promedio del ciclo estral en la oveja es de 17 ± 3 días y se divide en una fase luteal y una fase folicular, según el esteroide ovárico que predomine en cada período. En la misma revisión se cita que tomando el día del estro como Día 0, la fase luteal se extiende desde el Día 2-3 hasta el Día 13 aproximadamente. La fase folicular comienza con la luteólisis (regresión del cuerpo lúteo -CL-) que se produce entre los Días 13 y 14 llegando hasta el Día 2.

Durante el ciclo estral la emergencia de los folículos que crecen desde 3 hasta 6 mm ocurre en ondas, en un rango de 2 a 5 ondas foliculares en cada ciclo, siendo el patrón predominante de 3 ondas que emergen respectivamente alrededor de los días 0, 6 y 11 del ciclo estral ovino (Figura 1). En los casos que se encontró una cuarta onda, la onda 3 emerge más tempranamente y la onda 4 emerge el día 14 (Ginther y col., 1995; Viñoles y col., 1999; Evans y col., 2000).

Existe una relación entre la concentración de la hormona FSH (hormona folículo estimulante) y la emergencia folicular, donde un aumento en la concentración de FSH precede la emergencia de cada onda (Ginther y col., 1995; Souza y col., 1997). Los folículos en desarrollo secretan inhibina, generando una disminución en los niveles de FSH, lo cual limita el número de folículos que continúa su crecimiento (McNeilly y col., 1991 citado por Fierro, 2010; Figura 1). El cambio en la dependencia de FSH a LH (hormona luteinizante) es clave en la selección folicular. Mediante un cambio en el soporte gonadotrófico (Campbell y col., 1999 citado por Fierro, 2010), la LH pasa a ser determinante para que se seleccione un folículo (denominado "folículo dominante"), que a diferencia de los demás folículos de la onda, continuará creciendo en un ambiente con bajos niveles de FSH (Ginther y col., 1996, 2000). Ese folículo dominante continúa su crecimiento a una tasa de 1 mm/día, alcanzando su máximo tres días luego de la emergencia (Viñoles y col., 2001). Mientras crece, este folículo dominante sintetiza estradiol (E2), que inhibe los niveles de FSH, impidiendo el reclutamiento de otros folículos en la misma onda. De ésta manera se limita la cuota ovulatoria (Baird, 1983 citado por Fierro, 2010; Figura 1 y 2).

La existencia del fenómeno denominado dominancia folicular se caracteriza por: a) la divergencia en el diámetro de los folículos en crecimiento, donde el folículo que alcanza el mayor diámetro es el dominante mientras que los otros de menor diámetro se atresian (subordinados), b) el retraso en la emergencia de una nueva onda folicular hasta cuando el folículo dominante comienza a regresar (Ginther y col., 1995).

La razón por la cual el folículo dominante puede crecer con niveles bajos de FSH mientras que los subordinados se atresian puede estar relacionado con la síntesis de receptores para LH en las células de la granulosa del folículo dominante (Ginther y col., 1996). Todos los folículos poseen receptores de LH en las células de la teca y de FSH en la granulosa pero sólo el folículo dominante adquiere receptores de LH en las células de la granulosa (Ireland, 1987 citado por Bo y Caccia, 2002). Los receptores de LH aumentan abruptamente a partir del día 3 de la onda, cuando el folículo dominante tiene más de 5 mm de diámetro. La LH se unirá a los receptores de las células de la granulosa estimulando una mayor producción de E₂ que le permitirá al folículo seguir creciendo aún cuando disminuyen los niveles de FSH (Ginther y col., 1996).

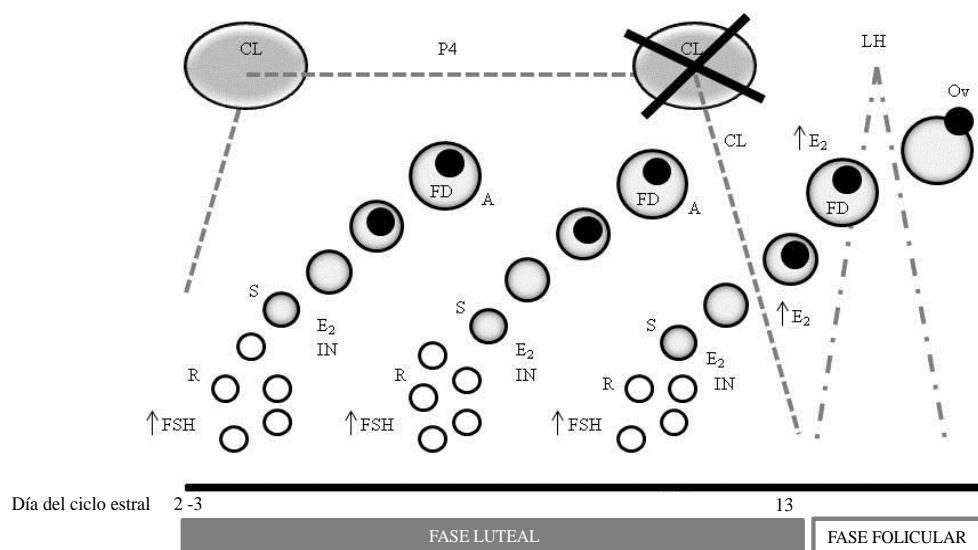


Figura 1: Esquema del crecimiento folicular en ondas en la oveja (Adaptado de Fierro, 2010).

CL: cuerpo lúteo; P4: progesterona; FSH: hormona folículo estimulante; LH: hormona luteinizante; S: selección folicular; FD: folículo dominante de la onda folicular; A: atresia (en presencia de altos niveles de P4, el FD de esa onda se atresia, se produce el recambio folicular –R–, y una nueva onda comienza con un pico previo de FSH, el cual se produce en presencia del FD de la onda anterior); IN: inhibina; E₂: 17 β – estradiol; el FD secreta E₂, por retroalimentación positiva se libera LH y se genera el pico preovulatorio de LH, el cual dará lugar a la ovulación (Ov) del/los FD.

Cuando los niveles plasmáticos de progesterona (P4) son elevados, se inhiben la frecuencia de pulsos de LH, el folículo dominante cesa su producción de E₂ significando el fin de su dominancia funcional. La FSH aumenta nuevamente, estimulando la emergencia de una nueva onda folicular (Ginther y col., 1995), fenómeno denominado “recambio folicular” (Figura 1). Los niveles de P4 por su efecto

sobre la frecuencia de pulsos de LH, modulan el recambio folicular. Ginther y col. (1995), observaron que la dominancia folicular es menor durante la fase luteal, mientras que es máxima durante la fase folicular (López-Sebastián y col., 1997; Rubianes y col., 1997a; Evans y col., 2000; González-Bulnes y col., 2004). Los niveles crecientes de P4 durante la fase luteal temprana suprimen el crecimiento del folículo dominante de la onda 1 en ovejas (Rubianes y col., 1996) y aceleran la emergencia de la siguiente onda folicular. En contraposición, niveles subluteales de P4 prolongan la sobrevivencia del folículo dominante y extienden su dominancia (Viñoles y col., 1999). La dominancia en la fase luteal temprana del ciclo estral es mayor comparada con la que ocurre en fase luteal media o tardía (Seekallu y col., 2010). Esto podría tener implicancias en el número de folículos disponibles para ovular al momento de la segunda PG, y por ende en la TO alcanzada.

También es necesario un efecto “priming” (efecto previo) de la P4 sobre los centros comportamentales del cerebro para que junto con el aumento posterior de los niveles de E2 se produzca el estro. Los niveles luteales de P4 generan un retrocontrol negativo sobre la frecuencia de pulsos de GnRH inhibiendo por tanto la pulsatilidad de LH (Figura 2). Por otro lado al principio de la fase luteal la P4 inhibe la secreción uterina de PG, determinando el momento de la luteólisis. También inhibe la formación de receptores endometriales para oxitocina lo que evita que se desencadene una luteólisis prematuramente. Contrariamente, los E2 estimulan la síntesis de éstos receptores (Revisión Ungerfeld, 2002a).

Luego de producida la luteólisis, disminuye la P4, se libera la inhibición de esta hormona sobre la frecuencia pulsátil de LH, lo que estimula al folículo dominante a producir más E2, que induce el pico pre ovulatorio de LH, dando lugar a la ovulación (Figura 2). Evans y col. (2000), sostienen que además del efecto sistémico de dominancia generada por el folículo dominante sobre el desarrollo folicular, existen reportes de la existencia de un efecto de dominancia intraovárico. Por otra parte González-Bulnes y col. (2004), indicó que el crecimiento de los folículos pequeños en el ovario ipsilateral al folículo dominante es menor al contra lateral, y la emergencia del folículo dominante de la onda consecutiva se produce en el ovario contra lateral al que previamente contenía el folículo dominante. No obstante, la oveja es capaz de desarrollar más de un folículo dominante, fenómeno denominado co-dominancia, lo que permite la ocurrencia de ovulaciones múltiples. Las ovulaciones múltiples pueden ocurrir por el reclutamiento de un mayor número de folículos dentro de una misma onda, o por la ovulación de folículos dominantes de dos ondas consecutivas (Scaramuzzi y col., 1993).

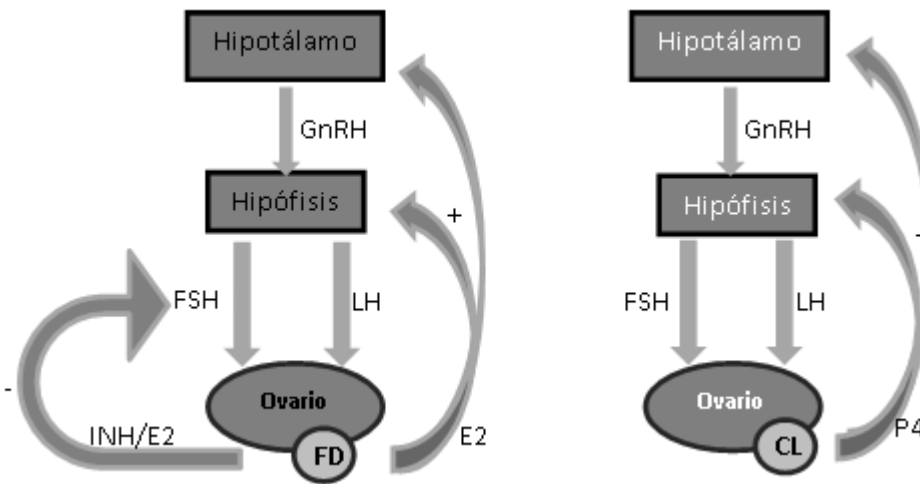


Figura 2: Esquema de regulación hormonal del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Elaborado en base a revisión Ungerfeld, 2002a).

CL: cuerpo lúteo. P4: progesterona. FD: folículo dominante. E2: 17 β – estradiol. INH: inhibina. + : retroalimentación positiva. - : retroalimentación negativa. El hipotálamo libera GnRH, esta hormona actúa sobre la hipófisis liberando esta última FSH y LH; este mecanismo es regulado de dos maneras diferentes según la estructura ovárica presente (CL o FD). El CL secreta P4 que produce una retroalimentación negativa a nivel del hipotálamo e hipófisis, inhibiéndose de esta manera la secreción de LH. El FD secreta E2 e INH que producen una retroalimentación negativa sobre la síntesis de FSH.

Viñoles y col. (2002), sostienen que la condición corporal (CC) afecta el número de ondas que se desarrollan durante el ciclo. Ovejas con buena CC (4,1 puntos de CC; escala 0 a 5, Russel y col., 1969) desarrollan un patrón constante de 3 ondas, mientras que ovejas flacas (1,9 puntos de CC) desarrollan 2 o 3 ondas. Dado que las ovejas gordas tienen una tasa ovulatoria (TO) más alta que las flacas (peso “estático”), se plantea la asociación positiva entre la CC, el número de ondas foliculares y la TO.

B) INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

La IA es un método de reproducción asistida en el que se obtiene el semen del macho para posteriormente depositarlo en el tracto reproductivo de la hembra de forma manual, por medio de instrumentos especiales. En este sistema no existe contacto directo entre el macho y la hembra (Durán del Campo 1980).

La IA en la oveja presenta como dificultad el atravesar el cérvix con la cánula de inseminación y alcanzar la luz uterina por vía transcervical. Esto se debe al menor tamaño corporal y a las particularidades anatómicas del tracto reproductivo en esta especie. El cérvix de la oveja presenta 4-7 anillos y varios pliegues que obstaculizan el pasaje, actuando como barrera entre la vagina y el útero. Existe una alta correlación entre la profundidad del cérvix donde es depositado el semen y el índice de concepción obtenido (Salamon y Lightfoot, 1970). Cuando se trata de borregas surge otro inconveniente que es la amplitud reducida a nivel del vestíbulo vaginal, ello dificulta la introducción del vaginoscopio y supone un mayor estrés (Gil, 2003).

C) MÉTODOS DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL (IA)

Existen distintas técnicas de IA en ovinos como ser vaginal profunda, cervical o peri-cervical o intrauterina.

Inseminación vaginal profunda

Consiste en depositar el semen cranealmente en la vagina sin ubicar el cérvix, es la técnica más sencilla de todas pero la mayoría de los trabajos reportan menores resultados comparando con IA cervical (Durán del Campo y col., 1993). Por lo tanto dicha técnica sólo se utiliza en caso de no ser posible la IA cervical, aumentando dos o tres veces la dosis de semen (Fernández Abella y Villegas, 1995).

Inseminación cervical

Ésta es la técnica más utilizada hasta el momento. La deposición de semen se realiza en la entrada del cérvix con el uso de un vaginoscopio y la pistola de inseminación. Los resultados obtenidos reflejados en el porcentaje de preñez dependen del tipo de preservación seminal. Cuando se utiliza semen fresco da como resultado una alta fertilidad, cercana a la que se obtiene con monta natural (Evans y Maxwell, 1990).

Inseminación Intrauterina (IAIU)

Más difícil y costosa que las anteriores, ésta técnica permite depositar el semen directamente en el cuerno uterino evitando la barrera cervical. De esta forma se logran con semen congelado resultados similares a la IA cervical con semen fresco. El procedimiento más utilizado para IAIU es la laparoscopia (Revisión Ungerfeld, 2002b).

D) SINCRONIZACIÓN E INDUCCIÓN DE ESTROS EN OVINOS

Se entiende como inducción a la intervención con el fin de desencadenar el estro y la ovulación en un período de anestro. Paralelamente, la sincronización hace referencia a la inducción de la simultaneidad de dichos eventos en un grupo de animales tratados (Rubianes y col., 1999).

Métodos de inducción de estros

Siendo el ovino poliéstrico estacional de día corto, lo que conlleva un período de anestro variable, puede ser necesaria la inducción de estro y ovulación dentro de dicho período. La inducción de estros se puede conseguir mediante métodos hormonales o de bioestimulación. Algunas de las hormonas utilizadas para este fin son: eCG, hCG, FSH, LH, GnRH y melatonina (Fernández Abella, 1995).

En cuanto a la bioestimulación se destaca el efecto macho, basado en la introducción de machos a un grupo de ovejas que previamente estuvieron aisladas un tiempo de todo contacto con los mismos (Revisión Ungerfeld, 2002a).

Métodos de sincronización de estros

La sincronización de estros implica el desencadenamiento de una fase folicular que asociada al comportamiento estral culmine en la ovulación (Rubianes y col., 1999). Una técnica de sincronización de estros efectiva debe inducir respuesta estral fértil y altamente sincronizada en un número importante de hembras tratadas.

E) PROTOCOLOS DE SINCRONIZACIÓN DE ESTROS PARA IATF

Los protocolos que se utilizan en ovinos para sincronización de estros e IATF se basan en el uso de P4 ó progestágenos asociados con gonadotrofinas y/o en el uso de análogos sintéticos de prostaglandinas F2 α .

Protocolos en base a uso de P4-eCG.

Los protocolos en base a P4 pueden ser utilizados tanto en anestro como en la estación reproductiva (Menchaca y Rubianes, 2004), y su objetivo es simular la fase luteal de un ciclo normal, siendo la duración de los protocolos entre 5 a 14 días (Gordon, 1999; Ungerfeld y Rubianes, 1999). Los resultados en cuanto a fertilidad mejoran cuando estos protocolos son utilizados por menos tiempo y el tratamiento se reduce a 5-7 días (Ungerfeld y Rubianes, 1999; Viñoles y col., 2001). Se aplica mediante uso de dispositivos vaginales (siendo las esponjas intravaginales impregnadas en medroxiprogesterona el dispositivo más utilizado), que se asocian con gonadotrofinas al retirar las esponjas. La utilización de las gonadotrofinas es para asegurar la sincronía de la ovulación, la más utilizada es la gonadotropina coriónica equina (eCG o PMSG). La ovulación ocurre aproximadamente a las 60 h de retiradas las esponjas (Maxwell, 1986), y la IATF debe realizarse según la vía entre las 48 a 60 h de retirado el dispositivo.

La fertilidad con protocolos en base a P4 es variable lo cual ha sido asociado a un envejecimiento de los folículos ovulatorios en los protocolos largos (Ungerfeld y Rubianes, 1999; Viñoles y col., 2001). El uso reiterado de eCG puede provocar también depresión en la fertilidad, asociado a la formación de anticuerpos anti eCG en ovejas (Allison, 1982; Baril y col., 1996; Menchaca y Rubianes, 2004). Éstos anticuerpos alterarían el pico preovulatorio de LH, disminuyendo el porcentaje de hembras que ovulan (Drion y col., 2001). Otro tipo de inconveniente observado con estos protocolos son las pérdidas de las esponjas (Durán del Campo, 1980; Viñoles y col., 2007) y la aparición de vaginitis y adherencias vaginales que derivaría obligatoriamente en el uso de antibióticos en los dispositivos (Durán del Campo, 1980; González-Bulnes y col., 2005; Viñoles y col., 2006). Otras desventajas asociadas son el tiempo de espera necesario para el consumo de la carne y leche de los animales tratados (30 días) y los residuos contaminantes que generan a nivel ambiental (Menchaca y Rubianes, 2004; Olivera y Gil, 2005).

Protocolos en base al uso de Prostaglandinas

El uso de prostaglandina F2 α o sus análogos sintéticos (PG) está restringido a la estación reproductiva, ya que se basa en la capacidad de la hormona de promover la lisis del CL (McCracken y col., 1970). Las prostaglandinas naturales tienen bajas concentraciones plasmáticas debido a que un 99 % son metabolizadas en un sólo pasaje por el pulmón, por lo que no se acumulan en los tejidos y por ende no habría tiempo de espera en su uso (Davis y col., 1980; Moller-Holtkamp, 1980, citados por Fierro, 2010).

Es sabido que la administración de PG entre los días 5 y 14 del ciclo estral induce la luteólisis, seguido de manifestación de estro y ovulación (Acritopolou y Haresign, 1980). El intervalo entre la administración de la PG y la observación del estro inducido es bastante variable, lo que se relaciona con el día del ciclo en el que animal es inyectado (Houghton y col., 1995). Esto indica que la dispersión observada en la

presentación de los estros cuando se trabaja con animales sincronizados con PG podría ser debida en gran parte a que las hembras se encuentran en distintos momentos del ciclo estral.

La respuesta del CL ovino a la PG depende de la fase del ciclo en que es administrada (Rubianes y col., 1997b, revisado por Fierro y col. 2013), ya que los cambios dinámicos en el crecimiento del folículo ocurren durante la fase luteal generados por las hormonas P4, FSH y LH. Sin embargo sigue existiendo controversias acerca de las alteraciones de la función esteroidogénica del folículo pre-ovulatorio, la TO, la fertilidad y la prolificidad luego de la administración de la PG (Fierro y col., 2011). En la misma revisión se cita que el uso de la PG altera la tasa de preñez (Gordon, 1999; Fierro y col., 2011) y algunos autores como White y col. (1987) y Hawk y col. (1981) sostienen que el transporte espermático se ve alterado. Por otra lado la tasa de recuperación embrionaria es más baja en animales tratados con PG (Schiewe y col., 1990; Fierro y col., 2011), pero la calidad embrionaria de los mismos fue similar a la de animales en estro espontáneo (Fierro y col., 2011).

Tradicionalmente la sincronización de estros con PG estuvieron basados en tratamientos de una o dos dosis de PG separadas 9 a 12 días, presentando dos inconvenientes importantes: 1) una gran dispersión en la manifestación de estros (24 a 120 h), y 2) una aparente menor concepción de los mismos, comparados con protocolos en base a P4-eCG (Hackett y col., 1981; Loubser y van Niekerk, 1981). Las diferentes condiciones de producción comparadas (raza, latitud), el bajo número de animales empleados en alguno de estos ensayos, y la variabilidad de resultados alcanzados, conllevan a no poder sacar conclusiones claras al respecto, y a limitar hasta el momento su recomendación de uso como protocolos de IATF en ovinos (Menchaca y Rubianes, 2004; Fierro y col., 2013).

Según Acritopoulou y Haresign (1980), cuando la PG es administrada a ovejas cíclicas se induce la luteolisis en aproximadamente el 66 % de las mismas, la aparición del estro y ovulación difiere de acuerdo a las diferencias entre intervalos entre tratamientos con PG. La administración de una segunda dosis de PG induce el estro en la mayoría de las ovejas las cuales no se sabe en qué etapa del ciclo estaban al dar la primera inyección. Esta segunda dosis aplicada 9 días luego de la primera aumenta la sincronía de los estros, ya que el 95 % de ovejas presentan estro 72 a 96 horas después (Acritopoulou-Fourcroy y col., 1982). Es importante considerar entonces que la segunda inyección aumenta la respuesta estral cuando no hay referencia del momento del ciclo estral al dar la primera inyección (Fierro y col., 2013).

Los ensayos de Loubser y van Niekerk (1981), Hackett y col. (1981) y Acritopolou-Fourcroy y col. (1982), donde comenzaron a utilizarse las PG con los intervalos previamente mencionados para programas de IATF, tuvieron como inconveniente de que a pesar de que un gran número de ovejas eran detectadas en estro luego de la segunda inyección de PG, esto ocurría en un período de 4 días (Loubser y van Niekerk, 1981). Esto fue debido a que, si la segunda inyección de PG era aplicada durante la mitad de la fase luteal, la asincronía de las ondas foliculares determinaba la presencia del folículo en distintas etapas de crecimiento (creciendo, estático o regresando), por lo que surgieron dos posibles escenarios citados en la misma revisión:

a) una mayor vida del folículo ovulatorio

b) la ovulación de nuevos folículos que emergieron (Houghton y col., 1995; Viñoles y Rubianes, 1998; Barret y col., 2002). Estos dos escenarios limitaron la posibilidad de encontrar una hora óptima para la IA, lo que podría explicar los bajos resultados reproductivos de los protocolos largos en base a PG para IATF (Rubianes y col., 2003 y 2004; Menchaca y Rubianes, 2004).

Estudios de la dinámica folicular mediante la incorporación de la ultrasonografía en tiempo real han permitido explicar los motivos de la dispersión de estros. La misma tiene relación con la edad del CL y con el estado de desarrollo folicular al momento de aplicar la PG (Houghton y col., 1995; Viñoles y Rubianes, 1998). Cuanto más desarrollado esté el CL, más demorará la P4 en alcanzar niveles sub-luteales y la oveja en manifestar estro y ovulación (Houghton y col., 1995). Viñoles y Rubianes (1998), en su trabajo observaron 2 respuestas: a) si el folículo dominante estaba en fase estática o de crecimiento al momento de la inyección, continuó su desarrollo y ovuló; b) si ya había iniciado su fase de regresión, se desarrolla un nuevo folículo de la siguiente onda folicular que finalmente ovula. En este segundo caso la ovulación se ve retrasada, debido a que fue necesario la emergencia de una nueva onda, logrando luego un tamaño adecuado para culminar con la ovulación (Rubianes y col., 2003).

Por otra parte Rubianes y col. (2003), demostraron que es posible inducir la luteólisis a partir del día 3 pos-ovulación en la oveja. Estos resultados fueron confirmados posteriormente por Contreras-Solís y col. (2009). Este descubrimiento fue lo que motivó a probar la hipótesis de que acortando los intervalos entre dosis de PG hasta 7 días, se podría inducir mayor sincronización de estros y ovulación de la primera onda folicular (Rubianes y col., 2004; Menchaca y Rubianes, 2004), basándose en que la segunda dosis de PG fuera aplicada cuando el folículo dominante está en fase de crecimiento (fase luteal temprana), lo que acortaría el intervalo a la ovulación. Surge de esta manera el protocolo de sincronización de estros denominado Synchrovine® (Rubianes y col., 2004).

Protocolo en base a PG – Synchrovine®

El protocolo de sincronización de estros e IATF denominado Synchrovine®, se basa en la inyección de dos dosis de PG separadas 6 a 8 días (7 días en promedio), e IA entre las 42-48 h de la segunda PG, determinando una sincronización mayor al 80 % de los estros entre las 24 y 48 h luego de la segunda inyección de PG y una ovulación a las 60 ± 1 hora (Rubianes y col., 2004). A pesar de esta gran concentración de estros y ovulaciones los resultados de fertilidad obtenidos hasta el momento presentan una gran variabilidad entre ensayos (Olivera y col., 2006), y han sido significativamente inferiores a los alcanzados con P4-eCG (Olivera-Muzante y col., 2011a; Viñoles y col., 2011). En los últimos años se han realizado varios experimentos introduciendo diversas modificaciones al protocolo Synchrovine® con el fin de mejorar los resultados reproductivos obtenidos cuando es empleada la vía cervical con semen fresco (Tabla 1). A tales efectos se evaluó el efecto de la categoría animal (Olivera y col., 2004; 2006), el momento de IATF (42 vs. 48 vs. 54 horas pos segunda PG) (Menchaca y col., 2004; Olivera-Muzante y col., 2011a); la separación entre dosis de PG (7 vs. 8 días), la disminución de la dosis de PG (160 vs. 80 μ g de Delprostenate, Glandinex®, Universal Lab., Montevideo, Uruguay), la IA 12 h más tarde de detectado el estro inducido con

PG, o la inclusión de un análogo sintético de GnRH al momento de la IATF (Buserelina im, 8 µg, Receptal®, Universal Lab., Montevideo, Uruguay; Olivera-Muzante y col., 2011b), ó previo a éste (Olivera-Muzante y col., 2013). Sin embargo los resultados de este protocolo no han mejorado en forma significativa hasta el momento.

Tabla 1: Modificaciones realizadas al protocolo de IATF Synchronvine® (dos dosis de prostaglandina separadas siete días) y resultados de fertilidad (%) y prolificidad obtenidos por diferentes autores.

Protocolo	Fertilidad (%)	Prolificidad	Referencia
Synchronvine® IATF 42 h	37 ^a	-	Menchaca y col., 2004
Synchronvine® IATF 48 h	29 ^{ab}	-	
Synchronvine® IATF 54 h	23 ^{ab}	-	
Synchronvine® Borregas	37 ^a	1.03 ^a	Olivera-Muzante y col., 2006
Synchronvine® Ovejas	40 ^a	1.19 ^b	
Synchronvine® IATF 42 h	27 ^{ab}	1.09 ^a	Fossati y col., 2008
Synchronvine® IATF 48 h	31 ^b	1.03 ^a	
Synchronvine® IATF 54 h	26 ^{ab}	1.04 ^a	
MAP + eCG IATF 54 h	48 ^a	1,09 ^a	
Synchronvine® IATF 42 h	45 ^a	1.09 ^a	Olivera-Muzante y col., 2011a
Synchronvine® IATF 48 h	51 ^a	1.04 ^a	
Synchronvine® 8 IATF 42 h	33 ^b	1.02 ^a	
Synchronvine® 8 IATF 48 h	29 ^b	1.19 ^b	
Synchronvine®	50 ^{ab}	1.13 ^a	Olivera-Muzante y col., 2011b
Synchronvine® ED. IA 12 h	47 ^{ab}	1.18 ^a	
Synchronvine® + GnRH + IATF 42 h	38 ^a	1.28 ^{ab}	
Synchronvine® DA IATF 42 h	42 ^a	1.11 ^a	Olivera-Muzante y col., 2011b
Synchronvine® DB IATF 42 h	24 ^b	1.13 ^a	
Synchronvine®	42.6 ^a	1.09 ^a	Olivera-Muzante y col., 2013
Synchronvine® + GnRH 24 h	10.2 ^b	1.00 ^a	
Synchronvine® + GnRH 36 h	33.7 ^a	11.3 ^a	

Valores con letras diferentes en igual referencia difieren, P< 0,05.

Fertilidad: ovejas gestantes/ovejas sincronizadas; Prolificidad: fetos/oveja gestante; IATF: inseminación a tiempo fijo; ED: estro detectado; DA: dosis alta, dos dosis de 160 µg Delprostenate separadas siete días; DB: dosis baja, dos dosis de 80 µg Delprostenate separadas siete días.

Según Fierro (2010), las pérdidas reproductivas en ovejas sincronizadas con éste protocolo parecerían estar asociadas a un ambiente uterino dominado por bajas concentraciones de P4 durante el período de crecimiento del folículo pre-ovulatorio (CL de tan sólo 3 a 5 días), en comparación con estros espontáneos. Estos hallazgos se asociaron con una menor TO, concepción, prolificidad y fecundidad (Fierro y col., 2011). Esta hipótesis parece ser confirmada por trabajos básicos que utilizan una dosis de PG durante la fase luteal media a tardía del ciclo estral (penúltima ó última onda, en lugar de la primer onda folicular; Bartlewski y col., 1999; Gibbons y col., 1999; Letelier y col., 2011), ó por trabajos aplicados que incluyen un dispositivo de P4 por 8 días previo a la dosis de PG (Loubser y van Niekerk, 1981). En este sentido, la separación de las dosis entre PG podría mejorar los niveles de progesterona durante la formación del folículo preovulatorio (Baby y Bartlewski, 2011), y a su vez generar una menor dominancia en la selección folicular.

Considerando lo visto anteriormente, y no reportándose ensayos que comparen intervalos entre dosis de PG superiores a 8 días que permitan recomendar la IATF en ovinos como protocolo alternativo a los basados en P4-eCG, surge la interrogante acerca de cual sería el efecto de aumentar este intervalo sobre la respuesta estral y reproductiva. Según lo revisado esto provocaría que los folículos pre-ovulatorios se desarrollen bajo perfiles de P4 mas adecuados, mejorando así quizás los resultados de protocolos de IATF en base a esta hormona (Fierro y col., 2013). Sin embargo para definir mejor estos nuevos protocolos, es necesario en primer término conocer la dispersión de estros que esta mayor separación entre dosis de PG genera.

HIPÓTESIS

Una mayor separación entre las dosis de PG generará una respuesta reproductiva diferente según la separación establecida.

OBJETIVOS

El **objetivo general** del trabajo fue el estudio de diferentes protocolos de sincronización de estros y ovulaciones en ovinos basados en la administración de dos dosis de PG con diferentes intervalos de tiempo, con el fin de identificar cuales posibilitarían realizar IATF en ovinos.

Como **objetivos específicos** se plantea estudiar en ovejas tratadas con diferente separación entre dosis de PG (10, 12, 14 y 16 días respectivamente):

- a) la respuesta estral previa y posterior a la segunda dosis de PG,
- b) el porcentaje de ovejas que ovulan, la TO, y los resultados reproductivos (concepción, fertilidad, prolificidad y fecundidad) en IA a estro visto inducido por la segunda dosis de PG,
- c) realizar la comparación en estas variables con ovejas en estro espontáneo pre-sincronizado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del ensayo

El experimento fue realizado en la Escuela Agraria “La Carolina” (33°S – 57°O; Ruta 23 km 162,5; Ismael Cortinas, Flores, Uruguay), durante los meses de marzo y abril de 2012.

Manejo animal

Se utilizaron 164 ovejas Corriedale multíparas reproductivamente aptas, con peso vivo promedio de 51,5 KG \pm 6,2 (media \pm DE) y CC 3,2 \pm 0,4 (escala de 0-5; Russel y col., 1969), las cuales pastorearon todo el ensayo sobre campo natural (suelos de formación Cristalino, disponibilidad mayor a 600 KG/MS/Ha). Diez días antes del comienzo del ensayo las ovejas se identificaron individualmente por medio de caravanas numeradas, se dosificaron contra parásitos gastrointestinales (Closantel al 15%, 10 mg/KG sc; Sinsaguay®, Laboratorio Rosenbusch, Montevideo, Uruguay), y recibieron un baño de aspersión precaucional contra *Damalinia ovis* “piojo ovino” con Pirimifos metil (Elimix®, Laboratorio Nutritec, Montevideo, Uruguay). Se utilizaron 5 carneros Corriedale adultos, clínica y serológicamente libres de Brucela ovis, manejados en similares condiciones, a los cuales se les realizó una valoración seminal previa para ser utilizados. Las precipitaciones acumuladas del período (marzo-abril) totalizaron los 69 mm.

Protocolos utilizados

Se conformaron cinco grupos mediante bloqueo por CC y peso vivo (Figura 3).

-Grupos sincronizados con PG (PG10, PG12, PG14 y PG16): dos dosis de un análogo sintético de PG separadas 10, 12, 14, y 16 días respectivamente (160 μ g/dosis Delprostenate, Glandinex®, Universal Lab., Montevideo, Uruguay).

-Grupo control (EE): ovejas pre-sincronizadas con dos dosis de PG separadas 8 días (ídem principio activo) y utilización del estro espontáneo natural posterior al inducido.

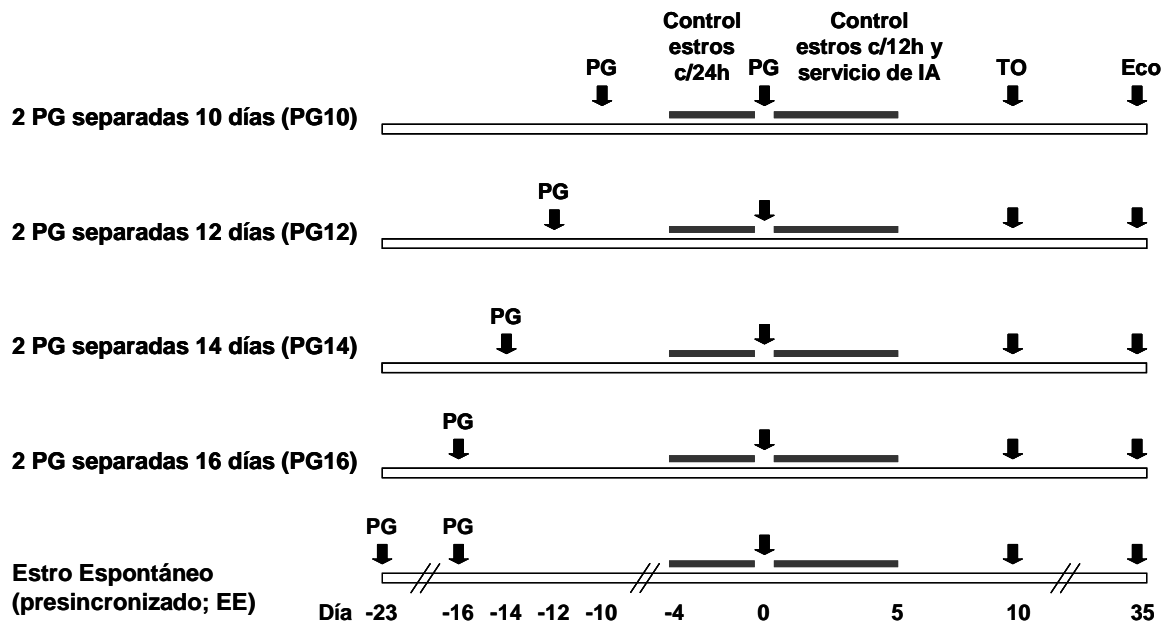


Figura 3: Esquema del diseño experimental.

PG10, 12, 14, 16 ó EE: ovejas sincronizadas con dos dosis de un análogo sintético de prostaglandina F2 α (160 μ g de Delprostenate/dosis) a intervalos de 10, 12, 14 y 16 días (Día 0: día de segunda PG), estro espontáneo pre-sincronizado con dos dosis de PG separadas 8 días. TO, Eco: evaluación de tasa ovulatoria o diagnóstico gestacional por ecografía trans-rectal.

Actividades y parámetros evaluados

Se evaluó en todos los grupos, mediante el uso de retarjos al 3% (pintados con tierra de color alrededor del prepucio), la respuesta estral (porcentaje de ovejas en estro del total de ovejas sincronizadas y dispersión de los estros). Esto se realizó cada 24 h desde las 96 h previas a la segunda PG (Día -4), la detección de estro se llevó a cabo en la tarde (PM: 18:00 – 8:00 h), se apartaban las ovejas que fueron marcadas y posteriormente se inseminaba sólo las ovejas del grupo EE esa misma mañana. A partir de la segunda PG (Día 0 = día de la segunda PG), se cambió el color de la tierra en los retarjos y se realizó doble detección de estro (AM/PM: desde 8:00-19:00 h y desde 19:00-8:00 h), cada 12 h, hasta las 120 h (Día 5). Las ovejas detectadas en estro inducido luego de la segunda PG ó estro espontáneo fueron inseminadas en horas de la mañana, inseminándose las ovejas que mostraron estro la tarde previa y aquellas que mostraron estro esa misma mañana (Figura 3).

Se realizó colecta de semen de 5 carneros Corriedale mediante vagina artificial, el cual se evaluó macroscópicamente, para su aceptación se tuvo en cuenta motilidad en masa (> a 3, escala de 1 a 5; Evans y Maxwell, 1990), volumen (\geq 0.75 ml), color (\geq a DD, escala D a DDD; Evans y Maxwell, 1990) y pureza (sin orina, sangre, contaminación externa, etc.). Luego se unificó el semen para minimizar el efecto carnero y se lo diluyó con leche descremada UHT y antibióticos (Enrofloxacina 5%; Baytril®, 250 mg/Lt), dilución 1+1, dosis inseminante de 100 millones de espermatozoides/oveja, depositados con pistola de IA cervical Walmur® por vía cervical (según técnica de Durán del Campo, 1980).

El porcentaje de ovejas que ovularon en cada grupo y la TO (CLs/oveja que ovuló) al Día 10, la concepción (ovejas gestantes/ovejas inseminadas*100), fertilidad (ovejas gestantes/ovejas sincronizadas), prolificidad (fetos/ovejas gestantes) y fecundidad (fetos/ovejas sincronizadas*100), del servicio realizado a estro detectado se evaluó mediante ecografía trans-rectal al Día 35, con transductor lineal de 7,5 MHz y ecógrafo ALOKA 500 (Overseas Monitor Corp. Ltd., Richmond, BC, Canadá), utilizando la metodología descrita por Viñoles y col. (2010).

Análisis estadístico

La respuesta estral, la dispersión de los estros, el porcentaje de ovejas que ovularon, la concepción y la fertilidad fueron comparadas mediante el test de Chi Cuadrado. La TO, prolificidad y fecundidad fue evaluada con el Test de Brown. En todos los casos el nivel de significancia fue de 0,05.

RESULTADOS

A) RESPUESTA ESTRAL Y DISPERSIÓN OBSERVADA EN LOS ESTROS CON LOS DISTINTOS PROTOCOLOS DE PROSTAGLANDINA

Los resultados de respuesta estral se presentan en la Figura 4.

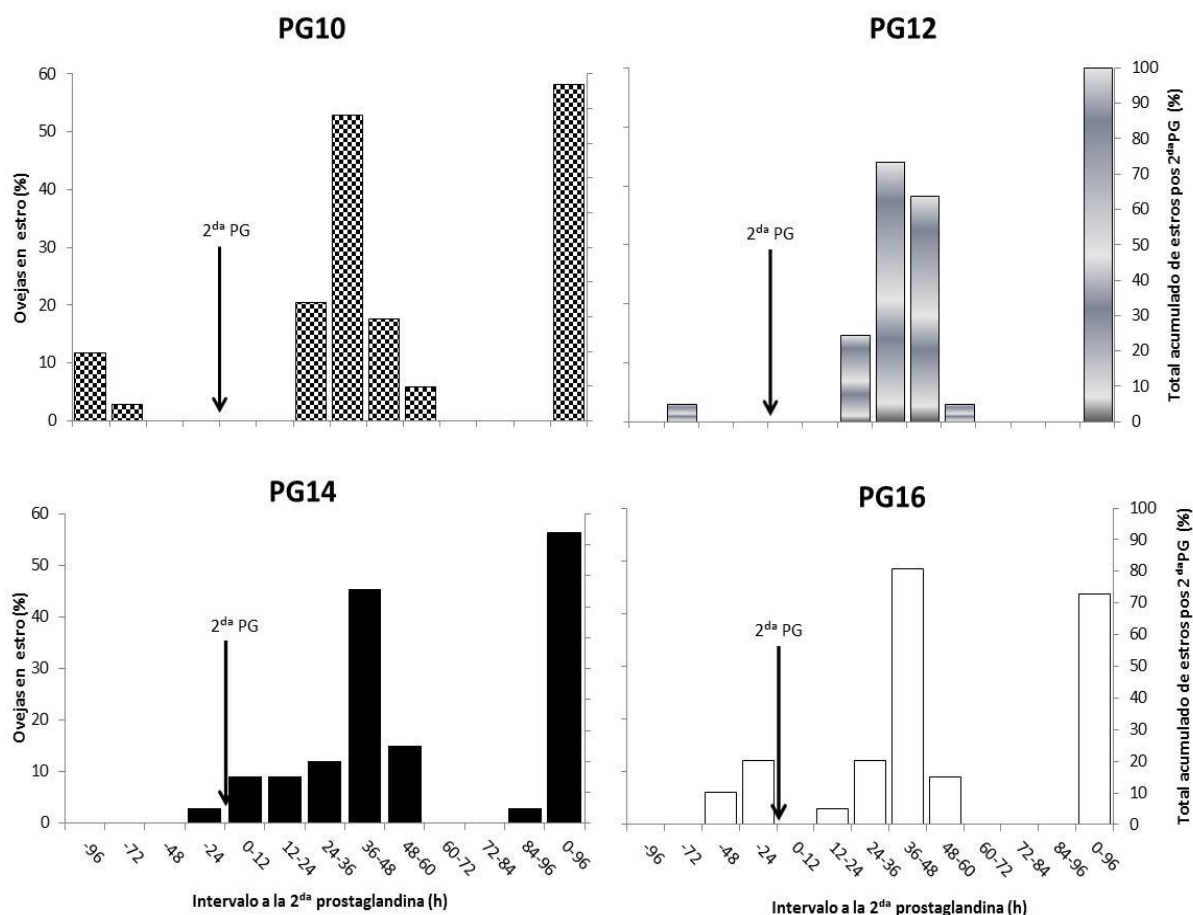


Figura 4: Dispersión de estros previo y posterior a una segunda dosis de prostaglandina y total acumulado pos segunda dosis de prostaglandina en diferentes protocolos de sincronización (separación de 10, 12, 14 y 16 días entre dosis).

PG10, 12, 14 ó 16: ovejas sincronizadas con dos dosis de un análogo sintético de prostaglandina (160 µg de Delprostenate/dosis) a intervalos de 10, 12, 14 ó 16 días respectivamente.

La dispersión de estros se extendió entre las -96 y las 96 h pos segunda PG en los grupos de estro inducido con PG. En todos los grupos las ovejas que presentaron estro entre las -96 y -72 h previas a la segunda PG respondieron luego a esta. Se observó que el grupo PG16 tuvo, respecto a los demás grupos, un mayor porcentaje acumulado de ovejas en estro 48 h previas a la segunda PG, y un menor porcentaje acumulado 96 h posteriores a este momento (0, 0, 6 y 24 %; 97, 100, 94, y 73% grupos PG10, PG12, PG14 y PG16 previo y posterior a la segunda PG respectivamente; ($P < 0,05$)).

No se observaron diferencias significativas en concentración de estros entre grupos entre las 24 y 48 h ó entre las 48 y 96 h pos segunda PG (74, 59, 58 y 61%; 71, 82, 61 y 58%, grupos PG10, PG12, PG14 y PG16, 24 a 48 y 48 a 96 h respectivamente; $P > 0,05$). Sin embargo los grupos PG10 (91 %) y PG12 (97 %) generaron una mayor concentración de estros entre las 24 y las 60 h pos segunda PG respecto a los grupos PG14 (73 %) y PG16 (70 %) ($P < 0,05$), sin diferencias entre ellos ($P > 0,05$). El grupo con estro espontáneo mostró una dispersión total de los estros de 9 días (días 13 a 21 pos segunda PG en ese grupo, correspondiente a Días -3 a 5 en los demás grupos), con una importante concentración (81 % del total) entre los días 17 a 19 pos segunda PG (Días 1 a 3 de los demás grupos).

B) VALORACIÓN REPRODUCTIVA

Los resultados se presentan en la Tabla 2

Tabla 2: Resultados reproductivos de diferentes protocolos de sincronización e IA a estro detectado en base a prostaglandinas (separación de 10, 12, 14 y 16 días entre dosis), y estro espontáneo pre-sincronizado.

GRUPO	Ovejas que ovularon (%)	TO	Concepción (%)	Fertilidad (%)	Prolificidad	Fecundidad (%)
PG10 (n: 33)	97 ^a	1,45 ^a	22,6 ^a	21,9 ^a	1.17 ^{ab*}	25,0 ^a
PG12 (n: 33)	97 ^a	1,44 ^a	21,2 ^a	21,2 ^a	1.57 ^{a*}	33,3 ^a
PG14 (n: 33)	94 ^a	1,39 ^a	54,8 ^{bc}	51,5 ^{bc*}	1.40 ^{ac}	69,7 ^{bc*}
PG16 (n: 33)	70 ^b	1,35 ^a	41,7 ^{ab}	30,3 ^{ab*}	1.30 ^{ab}	39,4 ^{ab*}
EE (n: 32)	100 ^a	1,33 ^a	51,5 ^{bc}	51,5 ^{bc*}	1.12 ^{cb}	57,6 ^{bc}

PG10, 12, 14 ó 16: ovejas sincronizadas con dos dosis de un análogo sintético de prostaglandina (160 µg de Delprostenate/dosis) a intervalos de 10, 12, 14 ó 16 días respectivamente e IA a estro visto. EE: ovejas en estro espontáneo presincronizado. Ovejas que ovularon: ovejas con CL/ovejas sincronizadas; TO: cuerpos lúteos/ovejas que ovularon; Concepción: ovejas gestantes/ovejas inseminadas; Fertilidad: ovejas gestantes/ovejas sincronizadas; Prolificidad: fetos/oveja gestante; Fecundidad: fetos/ovejas sincronizadas.

Valores con letras diferentes en igual columna difieren, $P < 0,05$.

Valores con igual letra y * en igual columna difieren, $0,05 > P < 0,08$.

Se observó un mayor porcentaje de ovejas que ovularon pos segunda PG en todos los grupos respecto al grupo PG 16 ($P < 0,05$). No hubo diferencias estadísticas en TO entre grupos comparados ($P > 0,05$).

No se observó un efecto “día de IA” dentro de cada grupo ($P > 0,05$), por tanto los resultados reproductivos fueron agrupados. Se observó una mejor tasa de concepción en los grupos PG14 y EE, respecto a los grupos PG10 y PG12 ($P < 0,05$), sin diferencias estadísticas entre los grupos PG14, PG16 y EE. Se observó una mayor fertilidad en los grupos PG14 y EE respecto a los grupos PG10 y PG12 ($P < 0,05$), y al grupo PG16 ($0,05 > P < 0,08$). Existió una mayor prolificidad en el grupo PG12 en comparación con el grupo EE ($P < 0,05$), y el grupo PG10 ($0,05 > P < 0,08$), sin diferencias con los demás grupos. Finalmente, se determinó una mayor fecundidad en los grupos PG14 y EE respecto a los grupos PG10 y PG12, y del grupo PG14 respecto al grupo PG16 ($0,05 > P < 0,08$), sin diferencias estadísticas con los demás grupos.

DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo confirman la hipótesis planteada. Una mayor separación entre las dosis de PG generó diferencias en respuesta y dispersión de los estros, porcentaje de ovejas que ovulan, prolificidad, concepción de los estros, y eficiencia reproductiva global, entre los grupos planteados, y en la comparación con estros espontáneos establecida.

Respecto a la concentración de los estros, se observó que una menor separación de las dosis de PG generó una mayor concentración porcentual de estros en cortos intervalos de tiempo. En el intervalo de observación entre las 24 y las 60 h pos segunda dosis de PG (período de 36 h), iniciaron su estro más del 90 % del total de las ovejas tratadas en los grupos PG10 y PG12, en comparación con tan solo un 70 % promedio en los grupos PG14 y PG16. El grupo PG14 presentó una respuesta estral acumulada importante (94 %), pero con una gran dispersión de los mismos en el tiempo (desde las 12 a las 96 h pos segunda PG). La diferente concentración de estros observada entre grupos podría explicarse por la edad del CL, y/o por el estado de desarrollo folicular cuando se aplica la segunda PG. Un intervalo entre dosis elevado (PG14 o PG16, por ejemplo) podría generar poblaciones de ovejas que al momento de recibir la segunda PG estén con diferente desarrollo o edad luteal (CLs maduros demoran más su regresión), o incluso ya en fase folicular, por ende, esto podría generar una diferente respuesta temporal para inducir la luteólisis, y/o manifestación de los estros y ovulaciones en el tiempo (Houghton y col., 1995). El estado de la población folicular de cada individuo afecta el intervalo al estro (Viñoles y Rubianes, 1998). Si al momento de inyectar la segunda dosis de PG el folículo dominante de la onda (segunda o tercera) está en fase de crecimiento, el estro y la ovulación ocurrirán antes. Sin embargo, si el folículo dominante está en fase estática o de regresión, un nuevo folículo deberá emerger y madurar, por lo que el estro y la ovulación ocurrirán más tarde. En resumen, los grupos PG10 y PG12 presentarían una respuesta estral mayor y más concentrada a los efectos de ser considerados para realizar servicio de IATF.

El diseño planteado en este experimento nos permitió establecer que un porcentaje de ovejas evidenció estro espontáneo previo a la segunda dosis de PG (Figura 4). Las mismas fueron agrupadas en aquellas que lo hicieron entre las 96 y las 48 h previas, y aquellas que lo hicieron entre las 48 h previas y el momento de la segunda PG (hora 0). Un porcentaje de ovejas del grupo PG14 y PG16 (6 y 24 % respectivamente) manifestó estro 48 h antes de la segunda PG, y luego no respondió a la misma, determinando una menor respuesta estral acumulada pos segunda PG. Independientemente del grupo considerado, todas las ovejas que manifestaron estro entre las 96 y las 48 h previas a la segunda PG respondieron luego a la misma. Esto estaría en desacuerdo con los trabajos de Acritopoulou y Haresign (1980) y Wiltbank y Niswender (1992) que afirman que el CL de la oveja es sensible recién a partir del Día 5 del ciclo estral, y confirmaría los hallazgos de Rubianes y col. (2003) y Contreras-Solis y col. (2009), quienes determinaron que después de los 2 días pos ovulación el cuerpo lúteo sería sensible a una dosis elevada de PG.

La aparición de un porcentaje elevado de ovejas con estro espontáneo previo a la segunda dosis de PG, y su diferente sensibilidad a la misma es un resultado a remarcar. Nuestro diseño experimental no nos permitió saber cuántas y cuáles ovejas respondieron a la primera dosis de PG, y por ende tampoco la duración del ciclo estral

inducido por esta primera dosis. Se asume por la raza utilizada, categoría, momento del año, y época normal de servicios en ese establecimiento, que todas las ovejas estaban ciclando al momento de iniciar el trabajo (mediados de marzo; Fernández Abella, 1993). Es probable que algunas de ellas hubieran estado en estro dos o menos días previo a la primer dosis de PG, incluso ese mismo día. No conociendo ese dato, y considerando para esta especie una duración promedio de ciclo estral de 17 días, con un rango de 14 a 19 días (Revisión Ungerfeld, 2002a), ello podría explicar la aparición de un porcentaje variable de ovejas en estro espontáneo previo a la segunda dosis de PG. Por otro lado, y aun respondiendo la gran mayoría de las ovejas a la primera dosis de PG (Acritopoulou y Haresign, 1980), una mayor separación de las dosis (14 ó 16 días por ejemplo) podría generar, por la duración mínima del ciclo estral definida, la aparición en estro espontáneo de alguna de estas ovejas previo a la segunda dosis de PG. En resumen, la respuesta alcanzada pos segunda PG podría ser dependiente de la sensibilidad a la primer dosis de PG, y del intervalo entre dosis utilizado. Un mayor intervalo entre dosis de PG podría generar una respuesta estral acumulada menor pos segunda PG, es decir menos ovejas en estro para ser inseminadas en estro detectado o en IATF. En estos intervalos, un modelo experimental de 3 PG que incluya una dosis 7 a 12 días previos a la “primer PG” aseguraría que todas las ovejas responderían a la segunda y tercer dosis, y por ende generaría una mayor respuesta estral acumulada.

En relación al porcentaje de ovejas que ovularon, se observó que un mayor porcentaje de ovejas en estro pos segunda PG (de los grupos PG10, PG12 y PG14), se acompañó también de un mayor número de ovejas que ovularon, en comparación con el grupo PG16. Ello evidencia que la gran mayoría de las ovejas con estros inducidos con esta separación entre dosis de PG ovularon, y que los CL generados se mantuvieron “ecograficamente visibles” al menos hasta el Día 10. Por ende, la respuesta en ovejas que ovularon de cada grupo sería directamente proporcional al número de ovejas observadas en estro. Esto coincide con los trabajos realizados con el protocolo Synchrovine® (de 7 días de separación entre dosis de PG) por Fierro y col. (2011), donde el número de ovejas en estro y de ovejas que ovularon no difirió. Por tanto, las eventuales diferencias en concepción a estro detectado o en IATF, entre los grupos de PG aquí comparados, no se deberían en principio a la falta de ovulación de las ovejas. Por otra parte, no se observaron diferencias estadísticas en TO entre los diferentes grupos de PG comparados, ni con el grupo EE. El grupo PG12 presento sí una prolificidad mayor que la del grupo EE. Trabajos previos reportan una disminución de la TO y prolificidad, en comparación con el estro espontáneo, administrando la segunda dosis de PG en la fase luteal temprana (protocolo Synchrovine®; Fierro y col., 2011). Sin embargo otros autores no reportan efectos detrimentales sobre la TO (Houghton y col., 1995), o incluso un incremento en la misma cuando la PG es administrada en la fase luteal media (Letelier y col., 2011). Una menor “dominancia folicular” en las ondas de la fase lutea media y tardía, respecto a la temprana, parecería ser la explicación a estos hallazgos (Viñoles y col., 1999; Seekallu y col., 2010). Los protocolos de sincronización con PG comparados en nuestro trabajo probablemente generaron ovulaciones provenientes de folículos de la segunda, de la última onda, o de ambas. Esto ayudaría a explicar la similar TO y prolificidad con el grupo EE.

Por último, y aún teniendo en consideración el bajo número de ovejas utilizado por grupo, fue posible establecer comparaciones en lo referente a tasas reproductivas alcanzadas con un servicio a estro detectado. En este sentido, era de sumo interés conocer cuáles eran las diferencias “numéricas” (y estadísticas si las hubiera) entre los

grupos de estro inducido con PG y el grupo EE. Como resultado, y en términos globales, una mayor separación entre las dosis de PG (grupos PG14 y PG16) evidenció una mejora en la concepción, fertilidad y fecundidad final al servicio a estro visto (NS en el caso del grupo PG16), respecto a los grupos de menor separación entre dosis (PG10 y PG12), y sin diferencias con el grupo EE. Los grupos de menor separación entre dosis de PG tuvieron una concepción, fertilidad y fecundidad significativamente menor que la del EE. Es de recordar que el grupo con estro espontáneo generado con presincronización tuvo 9 días de dispersión en sus estros, con lo cual para lograr resultados similares de eficiencia reproductiva hubo que aumentar mucho los días de detección. La eficiencia reproductiva final de cada protocolo (fecundidad: fetos/ovejas sincronizadas*100) es fuertemente dependiente del porcentaje de concepción de ese estro, de la prolificidad, y del número de ovejas sincronizadas que finalmente son servidas (respuesta estral pos segunda PG). Eso determinó que el protocolo PG16, con buenos porcentajes de concepción y prolificidad, pero menor número de ovejas en estro pos segunda PG, no se diferenciara de los protocolos de menor separación entre dosis de PG. La IA a estro detectado dos días previos a la segunda PG podría incrementar la eficiencia reproductiva final del grupo PG16. Se plantea entonces la interrogante de cual podría ser la causa de una mejor concepción, similar a la del grupo EE, de los estros generados por los grupos PG14 y PG16. Por un lado la mayor separación entre dosis de PG parece asemejarse más a la duración normal del ciclo estral de la oveja, y esto podría estar generando un perfil progesterónico similar al que acontece en ciclos estrales de duración normal, con la consecuente generación de ovulaciones y embriones de mejor calidad (Fierro y col., 2011; 2013). Por otra parte, si bien nuestro diseño experimental no permite comprobarlo, es probable que un número variable de ovejas que presentaron estro pos segunda PG en los grupos PG14 y PG16 no fueran inducidos por esta segunda dosis de PG, sino que fueran ovejas en estro espontáneo, con la consiguiente mayor fertilidad natural reportada en algunos trabajos (Fierro y col., 2011; Durán del Campo y Cash Stirling, 1982).

A modo de síntesis de este trabajo, con un mayor intervalo de tiempo entre las dosis de PG se podría observar un mayor porcentaje de ovejas en estro previo a la segunda PG, una menor respuesta estral acumulada pos segunda PG, una menor concentración de los estros, un menor porcentaje de ovejas que ovulan, una similar TO y prolificidad, pero una mejor eficiencia reproductiva global en el servicio vía cervical a estro detectado. Resta por conocer aún cuál sería la respuesta reproductiva al servicio de IATF de los protocolos de sincronización en base a PG aquí comparados. Esto implicará no solo considerar la información de concentración de estros pos segunda PG generada en este trabajo, sino también determinar la hora de ovulación promedio y su desvío en cada grupo de ovejas.

CONCLUSIONES

a) Los protocolos PG10 y PG12 presentaron una mejor respuesta estral pos segunda PG respecto a los protocolos PG14 y PG16. Por tanto se concluye que serían los protocolos de elección a evaluar en programas de IATF.

b) El uso de protocolos de PG con separaciones de 10, 12, 14 y 16 días no alteraría la TO en comparación con el estro espontáneo.

c) Los protocolos PG14, PG16 y EE tuvieron una respuesta reproductiva superior al servicio de IA a estro detectado vía cervical con semen fresco, respecto a los protocolos PG10 y PG12, sin diferencia entre ellos. Por tanto se concluye que serían los protocolos de elección en programas de IA vía cervical con semen fresco y estro detectado.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Acritopoulou S, Haresign W. (1980). Response of ewes to a single injection of an analogue of PGF₂ α given at different stages of oestrus cycle. *J Reprod Fertil* 58: 219-223.
- 2) Acritopoulou-Fourcroy S, Papas V, Peclaris G, Zervas N. (1982). Synchronization of oestrus in ewes with Provera sponges/PMSG, prostaglandin F₂ α or the prostaglandin analogue, ICI80996, and fertility following natural mating or artificial insemination. *Reprod Nut Dev* 22: 345-54.
- 3) Allison AJ. (1982). Techniques of modifying reproductive performance. En: Davis GH, Montgomery GW. *Sheep Production*. New Zealand. Wickham. McDonald. pp. 239-263.
- 4) Baby TE, Bartlewski PM. (2011). Progesterone as the driving regulatory force behind serum FSH concentrations and antral follicular development in cycling ewes. *Reprod Fertil Dev* 23: 303-310.
- 5) Baril G, Remy B, Leboeuf B, Beckers JF, Saumande J. (1996). Synchronization of estrus in goats: The relationship between eCG binding in plasma, time of occurrence of estrus and fertility following artificial insemination. *Theriogenology* 45(8): 1553-1559.
- 6) Barrett DMW, Bartlewski PM, Cook SJ, Rawlings NC. (2002). Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to PGF₂ α given at different stages of the luteal phase in ewes. *Theriogenology* 58: 1409-1424.
- 7) Bartlewski PM, Beard AP, Rawlings NC. (1999). An ultrasonographic study of luteal function in breeds of sheep with different ovulation rates. *Theriogenology* 52: 115-130.
- 8) Bo G, Caccia M. (2002). Dinámica Folicular Ovárica en el ganado bovino. En: Ungerfeld R. *Reproducción en los Animales Domésticos*, Montevideo, Melibea pp 57-67.
- 9) Contreras-Solis I, Vasquez B, Diaz T, Letelier C, Lopez-Sebastian A, Gonzalez-Bulnes A. (2009). Efficiency of estrous synchronization in tropical sheep by combining short-interval cloprostenol-based protocols and "male effect". *Theriogenology* 71: 1018-1025.
- 10) DICOSE (2012). Declaración jurada. Disponible en: http://www.mgap.gub.uy/DGSG/DICOSE/Informe2012/DJ2012_TotalNacional.pdf. Fecha de consulta: 17/7/2013.
- 11) Drion PV, De Roover R, Houtain JY, McNamara EM, Remy B, Sulon J, Beckers JF. (2001). Increase of plasma eCG binding rate after administration of repeated high dose of eCG to cows. *Reprod Nutr Dev* 41(3): 207-215.

- 12) Durán del Campo A, Cavestany D, Durán G. (1993). Manual práctico de reproducción e inseminación artificial en ovinos. Montevideo. Hemisferio Sur. 199 p.
- 13) Durán del Campo A, Cash Stirling RC, (1982). Sincronización de celos en ovinos mediante el uso de prostaglandina. Resúmenes del III Congreso Nacional de Veterinaria, Noviembre, Montevideo, Uruguay. pp 345-353.
- 14) Durán del Campo A. (1980). Anatomía, fisiología de la reproducción e inseminación artificial en ovinos. Montevideo. Hemisferio Sur. 264 p.
- 15) Evans ACO, Duffi P, Hynes N, Boland MP. (2000). Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. *Theriogenology* 53: 699-715.
- 16) Evans G, Maxwell C. (1990). Inseminación artificial en ovejas y cabras. En: Salamon, S. Inseminación artificial en ovejas y cabras. Zaragoza. Acribia. pp 158-161.
- 17) Fernández Abella, D.H. (1995). Control Biotecnológico de la Reproducción en la Oveja. En: Fernández Abella, D. Temas de reproducción ovina e inseminación artificial en bovinos y ovinos. Montevideo. UdelaR, Facultad de Agronomía - Estación Experimental de Salto. pp 63-92.
- 18) Fernández Abella D, Villegas N. (1995). Inseminación artificial en ovinos. En: Fernández Abella, D. Temas de reproducción ovina e inseminación artificial de bovinos y ovinos. Montevideo. UdelaR, Facultad de Agronomía - Estación Experimental Salto. pp 95-131.
- 19) Fernández Abella D. (1993). Principios de Fisiología Reproductiva Ovina. Montevideo, Hemisferio Sur. 247 p.
- 20) Fierro S, Gil J, Viñoles C, Olivera-Muzante J. (2013) The use of prostaglandins in controlling estrous cycle of the ewe. A review . *Theriogenology* 79: 399-408.
- 21) Fierro S, Olivera-Muzante J, Gil J, Viñoles C. (2011). Effects of prostaglandin administration on follicular dynamics, conception, prolificacy and fecundity in sheep. *Theriogenology* 76: 630-639.
- 22) Fierro S. (2010). Pérdidas reproductivas en ovejas sincronizadas con prostaglandina. Tesis de Maestría. Facultad de Veterinaria, UdelaR. 45 p.
- 23) Gibbons JR, Kot K, Thomas DL, Wiltbank MC, Ginther OJ. (1999). Follicular and FSH dynamics in ewes with a history of high and low ovulation rates. *Theriogenology* 52: 1005-1020.
- 24) Gil J. (2003). Inseminación artificial en ovinos. En: Ungerfeld R. Reproducción en los animales domésticos. Montevideo. Melibea. V 2 . pp 319-338.

- 25) Ginther OJ. (2000). Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Anim Reprod Sci* 60-61: 61-79.
- 26) Ginther OJ, Wiltbank MC, Fricke PM, Gibbons JR, Kot K. (1996). Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol Reprod* 55(6): 1187-1194.
- 27) Ginther OJ, Kot K, Wiltbank MC. (1995). Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. *Theriogenology* 43(3): 689-703.
- 28) Gonzalez-Bulnes A, Veiga - Lopez A, Garcia P, Garcia - Garcia RM, Ariznavarreta C, Sanchez MA, Tresguerres JAF, Cocero MJ, Flores JM. (2005). Effects of progestagens and prostaglandin analogues on ovarian function and embryo viability in sheep. *Theriogenology* 63: 2523-2534.
- 29) Gonzalez - Bulnes A, Souza CJH, Campbell BK, Baird DT. (2004). Systemic and intraovarian effects of dominant follicles on ovine follicular growth. *Anim Reprod Sci* 84: 107-119.
- 30) Gordon I. (1999). Fixed-time sheep artificial insemination. En: Gordon, I. *Controlled Reproduction in Sheeps and Goats*. Wallingford, CAB. pp 86-109.
- 31) Hackett AJ, Langford GA, Robertson HA. (1981). Fertility of ewes after synchronization of estrus with a prostaglandin F2 α and artificial insemination. *Theriogenology* 15(6): 599-603.
- 32) Houghton JAS, Liberati N, Schrick FN, Townsend EC, Dailey RA, Inskeep EK. (1995). Day of estrous cycle affects follicular dynamics after induced luteolysis in ewes. *J Anim Sci* 73: 2094-2101.
- 33) Letelier CA, Contreras-Solis I, García-Fernández RA, Sánchez MA, García-Palencia P, Sánchez B. (2011). Effects of oestrus induction with progestagens or prostaglandin analogues on ovarian and pituitary in sheep. *Anim Reprod Sci* 126: 61–69.
- 34) Lopez-Sebastian A, Gonzalez de Bulnes, A, Santiago Moreno J, Gomez- Brunet A, Townsend EC, Inskeep EK. (1997). Patterns of follicular development during the estrous cycle in monovular Merino del Pais ewes. *Anim Reprod Sci* 48: 279-291.
- 35) Loubser PG, van Niekerk CH. (1981). Oestrus synchronization in sheep with progesterone-impregnated (MAP) intravaginal sponges and a prostaglandin analogue. *Theriogenology* 15(6): 547-552.
- 36) Maxwell WMC. (1986). Artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen at a synchronised oestrus. 1. Effect of time of onset of oestrus, ovulation and insemination on fertility. *Anim Reprod Sci* 10(4): 301-308.

- 37) McCracken JA, Glew ME, Scaramuzzi RJ. (1970). Corpus luteum regression by prostaglandin F₂ α . *J Clin Endocrinol Metab* 30(4): 544-546.
- 38) Menchaca A, Rubianes E. (2004). New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reprod Fert Dev* 16(4): 403-413.
- 39) Menchaca A.; Miller V.; Gil J.; Pinczak A.; Laca M.; Rubianes E. (2004). Prostaglandin treatment to timed artificial insemination in ewes. *Reprod Dom Anim.* 39: 352-355
- 40) MGAP-DIEA, (2011). Censo General Agropecuario. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/Dieaanterior/Anuario2011/DIEA-Anuario-2011-web.pdf>
Fecha de consulta: 12/8/2012
- 41) Olivera-Muzante J.; Gil J.; Viñoles C.; Fierro S. (2013). Reproductive outcome with GnRH inclusion at 24 or 36 h following a prostaglandin F₂ α -based protocol for timed AI in ewes. *Anim Reprod Sci* 138: 175-179.
- 42) Olivera J, Fierro S, López V, Gil J. (2011a). Comparison of prostaglandin and progesterone based protocols for timed artificial insemination in sheep. *Theriogenology* 75: 1232-1238.
- 43) Olivera-Muzante J, Gil J, Fierro S, Menchaca A, Rubianes E. (2011b). Alternatives to improve a prostaglandin-based protocol for timed artificial insemination in sheep. *Theriogenology* 76: 1501-1507.
- 44) Olivera J, Gil J, Fierro S, Gamarra J, Texeira V. (2006). Sincronización de celos para la IA a tempo fijo vía cervical en majadas del Proyecto Merino Fino: comparación de protocolos. Serie de Actividades de Difusión 475. INIA Tacuarembó. Avances obtenidos en el Proyecto Merino fino del Uruguay. pp 10-15.
- 45) Olivera J, Gil J. (2005). Estudio de diferentes alternativas para la sincronización de celos en ovinos: descripción y valorización económica. XXXIII Jornadas de Buiatría, 9 al 11 de junio, Paysandú, Uruguay. pp 195-196.
- 46) Olivera J, Gil J, Menchaca A, Rubianes E. (2004). Parity effect on results of two insemination protocols after two PGF₂ α treatments 7 days apart. *Reprod Fertil Dev* 16(4): 508.
- 47) Rubianes E, Menchaca A, Gil J, Olivera J. (2004). Reproductive performance of a new Timed Artificial Insemination protocol (Synchrovine) in sheep. *Reprod Fertil Dev* 16(4): 508.
- 48) Rubianes E, Menchaca A, Carbajal B. (2003). Response of the 1 to 5-day aged ovine corpus luteum to Prostaglandin F₂ α . *Anim Reprod Sci* 78: 47-55.
- 49) Rubianes E, Ungerfeld R, De Castro T. (1999). Inducción y sincronización de celo en ovejas y cabras. III Simposio de Reproducción Animal. Carlos Paz-Argentina. pp 109-131.

- 50) Rubianes E, Ungerfeld R, Viñoles C, Rivero A, Adams GP. (1997a). Ovarian response to gonadotropin treatment initiated relative to wave emergence in ultrasonographically monitored ewes. *Theriogenology* 47: 1479-1488.
- 51) Rubianes E, Beard A, Dierschke DJ, Bartlewski P, Adams GP, Rawlings NC. (1997b). Endocrine and ultrasound evaluation of the response to PGF2 α and GnRH given at different stages of the luteal phase in cyclic ewes. *Theriogenology* 48: 1093-1104.
- 52) 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.
- 53) Russel AJF, Doney JM, Gunn RG. (1969). Subjective assessment of body fat in live sheep. *J Agric Sci (Cambridge)* 72: 451-454.
- 54) Salamon S, Lightfoot RJ. (1970). Fertility of ram spermatozoa frozen by the pellet method III. The effect of insemination. The effect of the insemination technique, oxytocin and relaxin on lambing. *J Reprod Fertil*; 22: 409-423.
- 55) Scaramuzzi RJ, Adams NR, Baird DT, Campbell BK, Downing JA, Findlay JK, Henderson KM, Martin GB, McNatty KP, McNeilly AS, Tsonis CG. (1993). A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reprod Fertil Dev* 5: 459-478.
- 56) Schiewe MC, Howard JG, Goodrowe KL, Stuart LD, Wildt DE. (1990). Human menopausal gonadotropin induces ovulation in sheep, but embryo recovery after prostaglandin F2 α synchronization is compromised by premature luteal regression. *Theriogenology* 34(3): 469-486.
- 57) Seekallu SV, Tossi BM, Duggavathi R, Barrett DMW, Davies KL, Waldner C, Rawlings NC. (2010). Ovarian antral follicular dynamics in sheep revisited: Comparison among estrous cycles with three or four follicular waves. *Theriogenology* 73: 670-680.
- 58) Souza CJH, Campbell BK, Baird DT. (1997). Follicular dynamics and ovarian steroid secretion in sheep during the follicular and early luteal phases of the estrous cycle. *Biol Reprod* 56: 483-488.
- 59) SUL (2013). Boletín de Exportaciones del Rubro Ovino. Uruguay: Exportaciones del Rubro Ovino. Período: octubre 2012 a setiembre 2013. Disponible en: http://www.sul.org.uy/mercados_boletin_exportaciones.asp. Fecha de consulta: 21/9/2013
- 60) Ungerfeld R. (2002a). Reproducción en Animales Domésticos, Montevideo, Melibea, V 1, 291 p.

- 61) Ungerfeld R. (2002b). Reproducción en Animales Domésticos, Montevideo, Melibea, V 2 , 293 p.
- 62) Ungerfeld R, Rubianes E. (1999). Effectiveness of short-term progestogen primings for the induction of fertile oestrus with eCG in ewes during late seasonal anoestrus. *Anim Sci* 68: 349-353.
- 63) Viñoles C, Paganoni B, Milton JTB, Driancourt MA, Martin GB. (2011). Pregnancy rate and prolificacy after artificial insemination in ewes following synchronization with prostaglandin, sponges or sponges with bactericide. *Anim Prod Sci* 51: 565–569.
- 64) Viñoles C, González de Bulnes A, Martin GB, Sales F, Sale S. (2010). Sheep and Goats. En: Colloton, J, Gnemi, G. Atlas of Ruminant and Camelid Reproductive Ultrasonography. Ames, Iowa. Luc DesCoteau. pp 181-210.
- 65) Viñoles C, Paganoni B, Milton M, Martin GB. (2007). El uso de esponjas y eCG en programas de inseminación a tiempo fijo promueve una mejor fertilidad que la prostaglandina. XXXV Jornadas Uruguayas de Buiatría. 7 al 9 de junio. Paysandú, Uruguay. pp 264-265.
- 66) Viñoles C, Quadrelli R, Marinho P, Bareille S, Driancourt MA. (2006). El agregado de antibióticos disminuye la cantidad de mucus y el olor de las esponjas al finalizar el tratamiento. XXXIV Jornadas Uruguayas de Buiatría. 8 al 10 de junio. Paysandú, Uruguay. pp 211-212.
- 67) Viñoles C, Forsberg M, Banchemo G, Rubianes E. (2002). Ovarian follicular dynamics and endocrine profiles in Polwarth ewes with high and low body condition. *Anim Sci* 74: 539-545.
- 68) Viñoles C, Forsberg M, Banchemo G, Rubianes E. (2001). Effect of long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. *Theriogenology* 55(4): 993-1004.
- 69) Viñoles C, Meikle A, Forsberg 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.
- 70) Viñoles C, Rubianes E. (1998). Origin of the preovulatory follicle after induced luteolysis during the early luteal phase in ewes. *Can J Anim Sci* 78: 429-431.
- 71) Wiltbank MC, Niswender GD. (1992). Functional aspects of differentiation and degeneration of the steroidogenic cells of the corpus luteum in domestic ruminants. *Anim Reprod Sci* 28: 103-110.