



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Postgrados

**PÉRDIDAS REPRODUCTIVAS EN OVEJAS SINCRONIZADAS
CON PROSTAGLANDINA**

SERGIO ANDRÉS FIERRO FERNÁNDEZ

TESIS DE MAESTRIA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL

**URUGUAY
2010**



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Postgrados

**PÉRDIDAS REPRODUCTIVAS EN OVEJAS SINCRONIZADAS
CON PROSTAGLANDINA**

SERGIO ANDRÉS FIERRO FERNÁNDEZ

Dra. (PhD) Carolina Viñoles

Nombre
Director de Tesis

Drs. (PhD) Jorge Gil y Julio Olivera

Nombre
Co-directores

2010

**INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE
DEFENSA DE TESIS**

**Alejo Menchaca; DVM, PhD
Ejercicio Liberal de la Profesión**

**Ricardo Alberio; DMV, PhD
Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas
INTA Balcarce - Argentina**

**Daniel Fernández Abella; Ing. Ag., PhD
Departamento de Producción Animal y Pasturas
Universidad de la República - Uruguay**

**EN ESTA HOJA VA LA COPIA DEL
ACTA DE DEFENSA DE TESIS**

AGRADECIMIENTOS

- A mi directora de tesis la Dra. Carolina Viñoles por haber aceptado éste desafío, y por toda la formación académica aportada durante éste largo y duro camino.
- A mis co-directores los Drs. Julio Olivera (“pájaro”) y Jorge Gil (“jujo”). Ambos han creído en mí desde mis estudios de grado, y apostado a mi formación de postgrado. Quiero realizar un reconocimiento especial a Julio, quien invirtió muchas horas desde el inicio de éste proyecto, el apoyo en el sangrado diario, en las ecografías, en las correcciones, y el continuo empuje para que yo le diera fin a éste proceso. Bueno Olivera, acá está; ¿y ahora qué hacemos?...
- A la Dirección de la Escuela Agraria “La Carolina”: por permitir la utilización de los animales e infraestructura.
- Un agradecimiento muy especial al Ing. Agr. Salvador García Pintos (“Salvito”), con quien supe compartir buenas horas de charlas ovinas y futboleras (coincidiendo mucho en las primeras, y muy poco en las segundas); y al Instructor Sr. Juan Carlos Bugarín, quien sin su apoyo no hubiera sido posible la coordinación de todo el trabajo realizado.
- A los Estudiantes de primer y segundo año (2009) de la Escuela Agraria “La Carolina”: sin cuyo apoyo no habría sido posible la realización del trabajo de campo de esta tesis.
- Al Dr. Nicolás Errandonea por la colaboración en los trabajos de campo; y a la Ing. Helena Guerra por las evaluaciones de las pasturas y su continuo apoyo.
- Al Dr. Mario Martincorena y a la Dra. Virginia López, por su invaluable colaboración en el trabajo de campo y de laboratorio.
- A la Ing. Agr. Mariana Carriquiri por el apoyo incondicional en la realización de la evaluación estadística.
- A la Dra. Ana Meikle por su cooperación en la realización de medición de progesterona, y la atención a mis constantes consultas.
- Al Dr. Gabriel Durán por el apoyo en la inseminación intrauterina y en la recolección de embriones.
- A INIA La Estanzuela por el préstamo del transductor lineal con el que se realizó las ecografías ováricas.
- A la CSIC, quien me otorgó en el año 2009 una beca para culminación de mis estudios de postgrado.
- A las funcionarias de Hemeroteca y Biblioteca de Facultad de Veterinaria por su apoyo en la realización de la revisión bibliográfica.

INDICE

Contenido	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	1
2.1 Sincronización de celos en ovinos: protocolos de IATF	5
2.1.1 Protocolos en base al uso de progestágenos y gonadotropinas:	5
2.1.2 Protocolos de IATF en base al uso de prostaglandinas	6
2.1.2.1 Protocolo Synchrovine®	7
2.1.2.2 Modificaciones realizadas al protocolo Synchrovine®	8
2.2 Modificaciones del ciclo estral generadas por la utilización de prostaglandina	11
2.3 Desarrollo embrionario temprano, reconocimiento materno y mantenimiento de la gestación.	12
2.4 Pérdidas reproductivas	13
2.4.1 Parasitosis	14
2.4.2 Nutrición	14
2.4.3 Efectos ambientales	15
2.4.4 Pérdidas reproductivas asociadas a sincronización de celos	16
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS	18
4. ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN	19
5. MATERIALES Y METODOS	19
5.1 Animales	19
5.2 Manejo	19
5.3 Diseño experimental	20
5.4 Muestro sanguíneo y mediciones hormonales	21
5.5 Colección seminal e inseminación artificial	21
5.6 Tono uterino	22
5.7 Recolección y clasificación de estructuras embrionarias	22
5.8 Evaluación ecográfica	23
5.9 Análisis estadístico	24
6. RESULTADOS	25
7. DISCUSIÓN	30
8. CONCLUSIONES	33
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Contenido	Página
I	Resultados reproductivos obtenidos por diferentes autores utilizando el protocolo Synchrovine® (dos dosis de PGF2 α separadas siete días), inseminando con semen fresco vía cervical.	10
II	Resultados reproductivos obtenidos por diferentes autores utilizando el protocolo Synchrovine® (dos dosis de PGF2 α separadas siete días), inseminando con semen refrigerado (5°C por 24 horas), con diferentes horas y vías de inseminación.	11
III	Crecimiento del folículo ovulatorio determinado por ecografía transrectal, en ovejas sincronizadas con DL-cloprostenol (dos dosis separadas siete días, “protocolo Synchrovine®” -grupo PG- n= 15), y ovejas en celo espontáneo (grupo control, n= 15).	27
IV	Calidad embrionaria subjetiva obtenida en ovejas sincronizadas con el protocolo Synchrovine® (dos dosis de DL-cloprostenol separadas siete días, grupo PG; n= 15) y ovejas en celo espontáneo (grupo control; n= 15).	28
V	Concepción, prolificidad y fecundidad, obtenida en ovejas sincronizadas con dos dosis de DL-cloprostenol separadas siete días (protocolo Synchrovine®; grupo PG, n= 135) y ovejas en celo espontáneo (grupo control, n= 73); a los 30 y 60 días de la inseminación artificial (Día 0).	29
VI	Pérdidas reproductivas en frecuencias y en porcentaje (entre paréntesis), en ovejas sincronizadas con DL- cloprostenol (dos dosis administradas con una separación de siete días; protocolo Synchrovine®, grupo PG, n= 57) y ovejas en celo espontáneo (grupo control, n= 57).	29

LISTA DE FIGURAS

Figura	Contenido	Página
1	Esquema del crecimiento folicular en ondas en la oveja	4
2	Representación esquemática de las posibles causas y momentos de pérdidas reproductivas en ovejas sincronizadas con el protocolo Synchrovine®.	17
3	Esquema del diseño experimental.	20
4	Concentración de progesterona plasmática entre los Días -6 y 6, crecimiento del folículo ovulatorio y concentración plasmática de 17 β – estradiol 48 horas previo a la inseminación artificial.	26
5	Concentración de progesterona plasmática los Días 0, 5, 12 y 17, en ovejas sincronizadas con dos dosis de DL-cloprostenol separadas siete días (protocolo Synchrovine®).	27

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
CL	Cuerpo lúteo
E₂	17 β – estradiol
eCG	Gonadotrofina coriónica equina
FPO	Folículo preovulatorio
FSH	Hormona folículo estimulante
GnRH	Hormona liberadora de gonadotrofinas
HPG	Conteo de huevos por gramo de materia fecal
IA	Inseminación artificial
IATF	Inseminación artificial a tiempo fijo
im	Intramuscular
INFτ	Interferón tau
iv	Intravenoso
LH	Hormona luteinizante
PGF2α	Prostaglandina F2 alfa y sus análogos sintéticos
P₄	Progesterona
TO	Tasa ovulatoria
RE	Receptor de estrógeno
RIA	Radioinmunoanálisis
RP	Receptor de progesterona
RO	Receptor de oxitocina
UI	Unidades internacionales

RESUMEN

Con el objetivo de estudiar las pérdidas reproductivas desde la ovulación hasta el Día 60 de gestación en ovejas sincronizadas con PGF2 α (Protocolo Synchrovine®), se realizaron dos experimentos durante la estación reproductiva (Abril, 2009). Doscientas treinta y ocho ovejas Corriedale multíparas en estado corporal moderado, fueron asignadas al azar a dos grupos. Grupo PG: dos inyecciones im de DL–Cloprostenol (125 μ g/dosis), administradas con un intervalo de siete días (Día -9 y -2, Inseminación Artificial (IA)= Día 0). Grupo Control: estro espontáneo pre sincronizado con dos inyecciones im de DL–Cloprostenol (125 μ g/dosis), administradas 27 y 19 días antes de la IA. Se detectó el estro con capones androgenizados. Se realizó IA intrauterina a tiempo fijo (48 h luego de la segunda inyección de PGF2 α) y a estro detectado, grupo PG y Control respectivamente), con una dosis de semen fresco heteroespérmico diluido (100 x10⁶ espermatozoides; volumen: 0.2 ml). Al momento de la IA se registró el tono uterino. El experimento I (n= 15/grupo) evaluó el desarrollo del folículo preovulatorio (FPO), las concentraciones plasmáticas de progesterona (P₄) desde el Día -6 al 6 y de 17 β –estradiol (E₂) 48 h antes de la IA, la tasa ovulatoria (TO) y la calidad embrionaria (Día 7). En el experimento II (n= 135 y n= 73, grupos PG y Control, respectivamente), se evaluaron la TO (CL/total de ovejas que ovularon), las concentraciones de P₄ (Días 0, 5, 12 y 17); la concepción (ovejas gestantes/inseminadas*100), la prolificidad (embriones/oveja gestante) y la fecundidad (embriones/ovejas inseminadas) los Días 30 y 60 mediante ultrasonografía. El diámetro del FPO de las ovejas del grupo PG fue mayor (P<0.05) y tendió a crecer más rápido (P=0.08) respecto al Control, pero las concentraciones de E₂ fueron similares. Las concentraciones de P₄ entre los Días -6 al 1 fueron más bajas en el grupo PG (P<0.05) comparado con el grupo Control, no observándose diferencias entre los Días 2 y 6 pos-IA (P>0.05). Las ovejas del grupo PG presentaron menor tono uterino, TO, concepción, prolificidad y fecundidad respecto al grupo Control (P<0.05). La tasa de colecta embrionaria tendió a ser menor en el grupo PG (P=0.08), pero la fertilización, calidad embrionaria y las concentraciones de P₄ los Días 12 y 17 fueron similares entre grupos (P>0.05). No se observaron diferencias en la concepción dentro de cada grupo en los momentos evaluados, ni en las pérdidas embrionarias acumuladas entre y dentro de cada grupo. Las gestaciones dobles del grupo PG tuvieron menor sobrevida respecto al Control (P<0.05). Concluimos que las pérdidas reproductivas en ovejas sincronizadas con el protocolo Synchrovine®, estuvieron asociadas a un ambiente uterino dominado por menores concentraciones de P₄, determinando una mayor tasa de crecimiento y diámetro del FPO, lo cual se asoció a menor TO, concepción, prolificidad y fecundidad. La sincronización con PGF2 α no aumentó las pérdidas reproductivas desde la IA hasta el Día 60.

SUMMARY

Two experiments were carried to identify the causes of reproductive losses from ovulation to Day 60 of gestation in ewes synchronized with prostaglandin (Synchrovine® Protocol). During the breeding season (April 2009), 238 Corriedale ewes in moderate body condition were randomly allocated to two groups. PG group: synchronized with two injections of DL-Cloprostenol (125µg per dose) given seven days apart (Day -9 and -7, Artificial Insemination (AI) = Day 0). Control group: ewes in spontaneous estrus, pre – synchronized with two injections of DL-Cloprostenol (125µg per dose) given 27 and 19 days before AI. Intrauterine AI was performed at fixed time in the PG group (48 h after the second prostaglandin), and at detected estrus in the Control group; using 100 millions of fresh extended heteroespermic sperm. Subjective uterine tone was measured at the moment of AI. Experiment I (n= 15/group) evaluated: the development of the preovulatory follicle (POF), plasma progesterone concentrations (P₄) between Day -6 to 6 and 17 β – estradiol (E₂) during the periovulatory period; ovulation rate (CL/total cyclic ewes - OR), and embryo quality (Day 7). Experiment II (n= 135 and 73, PG and Control group respectively) evaluated: P₄ concentrations on Day 0, 5, 12 and 17, OR (Day 7), conception rate (pregnant ewes/treated ewes*100), prolificacy (embryos/pregnant ewe) and fecundity (embryos/treated ewe) on Day 30 and 60 by ultrasonography. Ewes from the PG group had a larger POF (P<0.05) that tended to grow faster (P=0.08) compared to Control ewes, but E₂ concentrations were similar among groups. Ewes from the PG group had decreased P₄ concentrations between Day -6 to 1 (P<0.05), but no differences were found between Day 2 to 6 post-AI (P>0.05). PG ewe's showed less uterine tone, OR, conception, prolificacy and fecundity on Day 30 and 60 than Control ewe's (P<0.05). Embryo collection tended to be lower (P=0.08) in the PG group; but fertilization, embryo quality, and P₄ concentrations on Day 12 and 17 were similar. Conception, prolificacy and fecundity remained unchanged from Day 30 to 60 in both groups, and no differences were found in reproductive losses between and within groups. More twin pregnancies were lost in the PG than in the Control group (P= 0.08). We conclude that reproductive losses in ewes synchronized with the Synchrovine® protocol were associated to a low progesterone environment that induced a faster rate of growth and a larger diameter of the POF. This was associated to a lower OR, conception, prolificacy and fecundity. Synchronization with prostaglandin did not increase reproductive losses from AI to Day 60.

1. INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial (IA) tradicional de 45 días de duración (sin sincronización de estro), es una biotecnología ampliamente utilizada en nuestro país, que permite la difusión de material genético de alto valor en forma masiva en las majadas generales. Sin embargo, la disminución de la fertilidad y estatus sanitario de ovejas sometidas al prolongado manejo en bretes durante una IA tradicional, provoca pérdidas económicas difíciles de estimar (Olivera & Gil, 2005). Por este motivo, es frecuente la consulta de técnicos y productores acerca de cómo reducir en forma efectiva la duración de los servicios. La sincronización de estros en ovinos es una herramienta que tiene muchas ventajas (Menchaca & Rubianes, 2004). Sin embargo, es una estrategia aún poco implementada en los trabajos de IA vía cervical realizados en nuestro país. La sincronización de estros facilita la utilización de la IA al concentrar el trabajo en unos pocos días y permitir la utilización masiva de carneros de alto valor genético.

La IA a tiempo fijo (IATF) potencia las ventajas de la sincronización, permitiendo inseminar alto número de hembras por día sin necesidad de detección de estros, por lo que evita la concentración diaria de animales en los bretes. De esta manera, optimiza el uso de reproductores de alto valor genético y mejora la planificación del manejo reproductivo, sanitario y nutricional de la majada. La planificación de los servicios posibilita una utilización eficiente de los recursos disponibles en un predio: alimentación focalizada pre-servicio y pre-parto de las ovejas, parición concentrada y controlada, obtención de corderos de edad y peso homogéneo, componentes fundamentales para aumentar la eficiencia reproductiva y el retorno económico de la majada (Martín et al. 2004). Por último, y de difícil cuantificación es la mejora alcanzada en términos de fertilidad, sanidad y ahorro de mano de obra, en una majada sometida a un significativo menor tiempo de manejo en los bretes (Olivera & Gil, 2005).

Sin embargo, la IATF requiere del uso de programas de sincronización de estros y de la ovulación que se asocien con una alta tasa de preñez. Aunque en los últimos años se han logrado importantes avances acerca del impacto de diferentes tratamientos hormonales sobre el desarrollo folicular, la búsqueda de un protocolo que induzca alta sincronización de la ovulación, buenos resultados reproductivos, que provoque mínima contaminación ambiental, y de bajos costos aún continúa.

2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

La oveja es un rumiante poliestrico estacional de día corto, con un patrón de actividad reproductiva que se repite cada 14 a 19 días (Durán del Campo, 1980). La ultrasonografía ovárica permitió establecer que el desarrollo folicular ocurre en un patrón variable de 2 a 4 ondas durante el ciclo estral en la estación reproductiva (Ginther et al. 1995; Adams, 1999; Evans et al. 2000), durante la transición del anestro (Ravindra & Rawlings, 1997), y durante el anestro estacional (Souza et al. 1996; Barlewski et al. 1998) (Figura 1).

Cada onda folicular es precedida por un aumento en la concentración de FSH (hormona folículo estimulante), el cual promueve el reclutamiento de un grupo de folículos pequeños (Ginther et al. 1995; Souza et al. 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 et al. 1991). 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 et al. 1999), 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 et al. 1996; Ginther 2000). Ese folículo dominante continúa su crecimiento a una tasa de 1 mm/día, alcanzando su máximo tres días luego de la emergencia (Viñoles et al. 2001). Mientras crece, este folículo dominante sintetiza estradiol (E_2), (produce el 90% de los estrógenos circulantes; Mann et al. 1992), 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).

En presencia de altos niveles plasmáticos de progesterona (P_4) que inhiben la frecuencia de pulsos de LH, el folículo dominante cesará su producción de E_2 significando el fin de su dominancia funcional. La FSH aumenta nuevamente, estimulando la emergencia de una nueva onda folicular (Ginther et al. 1995), fenómeno denominado “recambio folicular”. Los niveles de P_4 por su efecto sobre la frecuencia de pulsos de LH, modulan el recambio folicular. Ginther et al. (1995), observaron que la dominancia folicular es menor durante la fase luteal; mientras que es máxima durante la fase folicular (López-Sebastian et al. 1997; Rubianes et al. 1997a; Evans et al. 2000; Gonzalez-Bulnes et al. 2001; 2004). Los niveles crecientes de P_4 durante la fase luteal temprana suprimen el crecimiento del folículo dominante de la onda 1 en ovejas (Rubianes et al. 1996) y cabras (Menchaca & Rubianes, 2002); y aceleran la emergencia de la siguiente onda folicular. En contraposición, niveles subluteales de P_4 prolongan la sobrevivencia del folículo dominante y extienden su dominancia (Viñoles et al. 1999). Estas observaciones concuerdan con la mayor sobrevivencia y prolongada fase de regresión del folículo dominante de la primer onda respecto a las otras ondas de desarrollo folicular del ciclo estral en ovejas (Seekallu et al. 2010) y en cabras (Vázquez et al. 2010). Resultados similares se habían obtenido previamente por otros investigadores (Johnson et al. 1996; Rubianes et al. 1996), quienes observaron folículos más grandes cuando las concentraciones de P_4 fueron menores respecto a cuando fueron mayores. Sin embargo, otros autores no concuerdan con éstas observaciones, reportando diámetros similares del folículo dominante en la fase luteal temprana respecto a la tardía (Ravindra et al. 1994; Ginther et al. 1995; Rubianes et al. 1997b). Luego de producida la luteolisis, disminuye la P_4 , se libera la inhibición de esta hormona sobre la frecuencia pulsátil de LH, lo que estimula al folículo dominante a producir más E_2 , que induce el pico preovulatorio de LH, dando lugar a la ovulación (Figura 1).

Además del efecto sistémico de dominancia generada por el folículo dominante sobre el desarrollo folicular (Campbell et al. 1999; Evans et al. 2000; Evans et al. 2002), existen reportes de la existencia de un efecto de dominancia intra ovárico. 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 (Gonzalez-Bulnes et al. 2004). 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 et al. 1993 propone dos posibles mecanismos para la ocurrencia de éste fenómeno: 1- incremento en la disponibilidad de folículos que responden a las gonadotropinas para ser reclutados y continuar su crecimiento; y 2- mayor sensibilidad de los mencionados folículos a la acción de la FSH. En situaciones de ovulación múltiples, la ovulación de folículos de la penúltima onda folicular puede ocurrir junto a folículos de la onda ovulatoria (Bartlewski et al. 1999a), lo que a llevado a cuestionar el fenómeno de dominancia en la oveja.

La condición corporal afecta el número de ondas que se desarrollan durante el ciclo. Ovejas gordas (4.1 puntos de estado corporal; escala 0 a 5, Russel et al. 1969) desarrollan un patrón constante de 3 ondas, mientras que ovejas flacas (1.9 puntos de estado corporal) desarrollan 2 o 3 ondas (Viñoles et al. 2002). Dado que las ovejas gordas tienen una tasa ovulatoria (TO) más alta que las flacas, se plantea la asociación positiva entre la condición corporal, el número de ondas foliculares y la TO.

El día de la emergencia de cada onda folicular es diferente, dependiendo del número de ondas que desarrolla cada animal durante el ciclo estral. Por lo tanto, la determinación del día de emergencia de la onda ovulatoria es variable, y ocurre entre el Día 9 y el 14 del ciclo estral. Esto imposibilita el conocimiento de la fase de crecimiento folicular al momento de aplicar tratamientos nutricionales o de sincronización de estros (Viñoles 2003; Menchaca & Rubianes, 2004). No obstante, la emergencia de la primera onda del ciclo es constante, y ocurre cerca de la ovulación del ciclo estral previo. La etapa de desarrollo del folículo ovulatorio tiene gran impacto en la respuesta a los tratamientos de sincronización de estros, determinando los intervalos tratamiento-manifestación de estro-ovulación y la calidad del ovocito, factores que determinaran los resultados reproductivos.

Las gonadotropinas regulan la esteroidogénesis a diferentes niveles. Mientras la LH estimula la síntesis de andrógenos a partir del colesterol en las células de la teca; la FSH regula la actividad de la enzima aromatasa, y la conversión de andrógenos a E_2 en las células de la granulosa. Las células de la granulosa tienen baja o nula capacidad de sintetizar andrógenos; y una alta actividad aromatasa respecto a las células de la teca (por revisión ver Fortune & Quirk, 1988 y Meikle 2001). Diferentes autores han descrito la presencia de las enzimas esteroidogénicas 3β - hidroxysteroidoide dehidrogenasa (3β -HSD), citocromo P450 17α -hidroxilasa (CYP17) y citocromo P450 aromatasa (CYP19), en los folículos antrales (Conley et al. 1995; Huet et al. 1997; Logan et al. 2002). La expresión de estas enzimas se incrementan en las células de la teca y de la granulosa a medida que los folículos crecen en la onda folicular y disminuyen en el folículo preovulatorio (FPO). La excepción es la 3β -HSD en las células de la granulosa, que incrementa su expresión a medida que los folículos crecen, pero se mantiene constante en el FPO. Existe una correlación positiva entre las cantidades de CYP19 y las concentraciones séricas de E_2 en las células de la granulosa (Duggavathi et al. 2006). El pico de producción de E_2 del folículo dominante de la onda ovulatoria es superior al resto de las ondas

(Toosi et al. 2010), lo que remarca el rol de la P₄ en bloquear la frecuencia de pulsos de LH. La menor producción de E₂ del folículo mayor de la primera onda estaría determinado por la disminución de la frecuencia-aumento de la amplitud de los pulsos de LH, asociado al aumento en la producción de P₄ por el cuerpo lúteo (CL) en desarrollo en la fase luteal temprana (Bartlewski et al. 1999a; 2000; Evans et al. 2002).

La expresión de los receptores hormonales a nivel uterino difieren según la fase del ciclo estral (Miller et al. 1977, citados por Meikle, 2001). En la fase folicular, los E₂ estimulan la expresión de los receptores de estrógenos (RE), progesterona (RP) y de oxitocina (RO) (Wathes & Hamon, 1993; Spencer & Bazer, 1995). La P₄, auto regula la expresión de sus receptores en el epitelio luminal y glandular endometrial, inicialmente suprimiendo y luego induciendo el sistema de liberación de prostaglandina endometrial (Spencer et al. 2004a). El incremento de la P₄ en la fase luteal, estimula sus propios receptores y bloquea la expresión de los RE y los RO; no detectándose éstos entre el día 5 y 11 del ciclo estral (McCracken et al. 1984; Clark & Mani, 1994: citados por Sosa 2007). La exposición prolongada del útero a niveles altos de P₄ regula negativamente sus propios receptores luego del día 11 y 12 del ciclo; dando lugar a un rápido incremento en la expresión de los RE y RO los Días 13 y 14 respectivamente (Hixon & Flint, 1987; Spencer et al. 1995a, b). Esto determina la liberación de oxitocina, que induce la liberación de prostaglandina por el endometrio entre los Días 14 y 16, produciéndose la luteolisis (Wathes & Lamming, 1995). Durante la preñez temprana, los receptores de P₄ son detectables en el tejido glandular y epitelial el día 11, pero no son detectables entre los Días 13 a 19; para expresarse después del Día 25 de gestación en las células del estroma y miometrio (Spencer et al. 2004b).

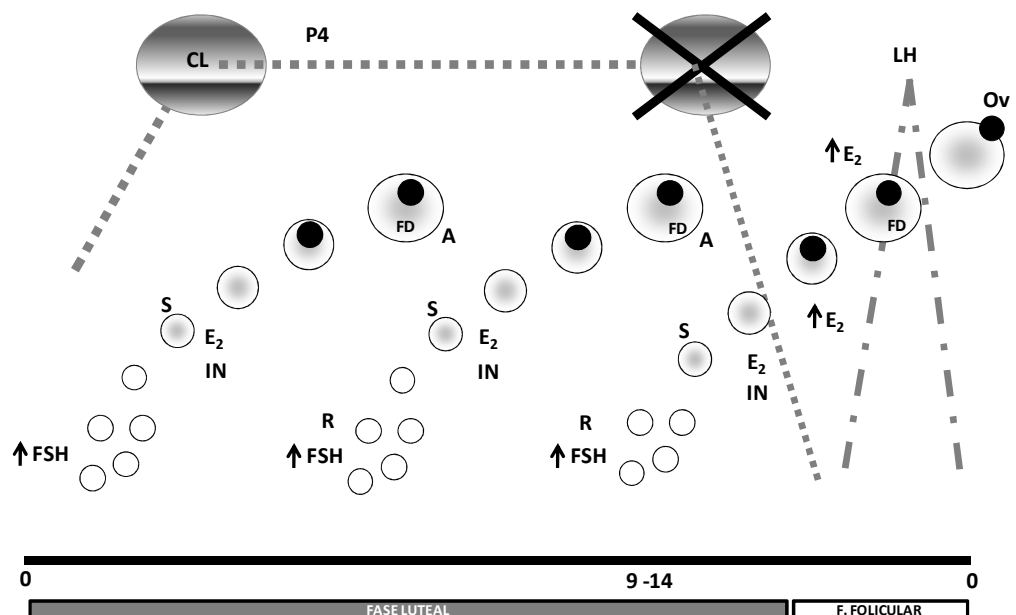


Figura 1: Esquema del crecimiento folicular en ondas en la oveja.

CL: cuerpo lúteo; P₄: progesterona; FSH: hormona folículo estimulate; 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, ante la disminución de la P₄, el folículo sigue creciendo, produciendo 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. F. Folicular: fase folicular.

2.1 Sincronización de estros en ovinos: protocolos de IATF

Los protocolos de sincronización de estros que pueden ser utilizados en programas de IATF en ovinos, se basan en el uso de progestágenos asociados con gonadotropinas y en el uso de análogos sintéticos de prostaglandinas.

2.1.1 Protocolos en base al uso de progestágenos y gonadotropinas:

El uso de progestágenos naturales o sintéticos es una alternativa flexible, ya que pueden ser usados tanto en anestro como en la estación reproductiva (Menchaca & Rubianes, 2004). Este método tiene por objetivo simular una fase luteal de duración normal, motivo por el cual los tratamientos duran 12 a 14 días (Gordon 1999). Los resultados de fertilidad mejoran cuando la duración de los tratamientos se reduce a seis días respecto al método tradicional de 12 días, tanto en anestro estacional (75 vs. 68.8%; Ungerfeld & Rubianes, 1999); como en la estación reproductiva (87 vs. 63%; Viñoles et al. 2001). La reducción en el período del tratamiento se justifica en base a que los dispositivos intravaginales mantienen los niveles de P₄ elevados por cinco ó seis días, disminuyendo luego a niveles sub luteales (Gaston-Parry et al. 1988 y Greyling et al. 1994, citados por Menchaca & Rubianes, 2004). Además, las ondas de crecimiento folicular emergen cada 5 a 7 días, siendo injustificado entonces prolongar los tratamientos (Menchaca & Rubianes, 2004).

La forma de aplicación más frecuente de los progestágenos es mediante el uso de dispositivos intravaginales (principalmente esponjas intravaginales impregnadas con medroxiprogesterona), asociados con tratamientos gonadotrópicos al momento de retirar las esponjas. El objetivo de la administración de gonadotropinas es asegurar la sincronía de la ovulación, lo cual permite la realización de protocolos de IATF. El más utilizado de estos tratamientos es la gonadotropina coriónica equina (eCG o PMSG), aplicada en dosis de entre 200 y 500 UI (dependiendo de la raza y tamaño corporal), ocurriendo la ovulación a las 60 horas de retiradas las esponjas (Maxwell 1986). La IATF debe realizarse 48 a 60 horas de retirado el progestágeno, dependiendo de la vía de IA utilizada (cervical o intrauterina) y del método de preservación seminal utilizado (Cognie et al. 1970; Colas et al. 1973; 1974).

A pesar de que los tratamientos tradicionales de 12 a 14 días de duración son los más utilizados en la actualidad, la fertilidad obtenida es variable, lo cual ha sido asociado con el envejecimiento de los folículos ovulatorios (Revah & Butler, 1996; Ungerfeld & Rubianes, 1999; Viñoles et al. 2001). Sin embargo, la ovulación de folículos envejecidos no siempre se relaciona con una menor fertilidad. Johnson et al. (1996) obtuvieron una concepción superior en ovejas con baja concentración de P₄ sérica respecto a un grupo de alta concentración. Evans et al. (2001), obtuvieron

embriones de calidad similar y porcentajes de parición similares, comparando ovejas que ovularon folículos jóvenes vs. folículos envejecidos.

Adicionalmente, el uso reiterado de eCG puede provocar depresión de la fertilidad (Allison 1982; Baril et al. 1996; Drion et al. 2002; Menchaca & Rubianes, 2004), asociado a la formación de anticuerpos anti eCG en ovejas y cabras (Roy et al. 1999; Maurel et al. 2003). La capacidad inmunogénica de la eCG se atribuye a su origen heterólogo, al alto peso molecular y/o a su nivel de glicosilación (Drion et al. 2001). Los anticuerpos anti eCG alterarían el pico preovulatorio de LH disminuyendo el porcentaje de hembras que ovulan (Drion et al. 2001). Situaciones similares de depresión de la fertilidad han sido observadas cuando la eCG es utilizada en forma consecutiva en las mismas ovejas durante 3 años, recuperándose los niveles de fertilidad al utilizarla en forma alternada (Durán G.; comunicación personal). Sin embargo, la respuesta en términos de fertilidad, prolificidad y concentración de anticuerpos generados, es diferente entre majadas, entre ovejas de una misma majada, y entre diferentes épocas del año (Allison 1982; Maurel et al. 2003).

Los tratamientos con progestágenos también presentan problemas prácticos, como las pérdidas de esponjas (Durán del Campo 1980; Viñoles et al. 2007) y la necesidad del uso de antibióticos para evitar vaginitis y adherencias vaginales (Durán del Campo 1980; Gonzalez-Bulnes et al. 2005; Viñoles et al. 2006). A todas estas desventajas, se suma el hecho de que los consumidores están preocupados por el uso de hormonas y antibióticos en los animales de consumo, y los desechos contaminantes a nivel ambiental, demandando productos “limpios, verdes y éticos” (Martin et al. 2004). El período de espera para el consumo de la carne del animal y de la leche (para consumo o industrialización), es de 30 días luego de la administración de la medroxiprogesterona (Esponjas Vaginales Syntex®, laboratorio Syntex), y/o de la eCG (Novormon®5000, laboratorio Syntex). En ese sentido, la utilización de prostaglandina o sus análogos sintéticos, sería una alternativa limpia y verde para la sincronización del estro y la ovulación (Contreras-Solis et al. 2009).

2.1.2 Protocolos de IATF en base al uso de prostaglandinas

El uso de prostaglandina F2 α o sus análogos sintéticos (PGF2 α) está restringido a la estación reproductiva, ya que se basa en la capacidad de la hormona de promover la lisis del CL (McCracken et al. 1970). Las prostaglandinas naturales tienen bajas concentraciones plasmáticas debido a que un 99% son metabolizadas en un solo pasaje por el pulmón, por lo que no se acumulan en los tejidos (Moller-Holtkamp, 1980; Davis et al. 1980).

El mecanismo por el cual la PGF2 α genera la lúteolisis es complejo y está en discusión. Wiltbank et al. (1990) sugieren que la PGF2 α causa una disminución en el flujo sanguíneo hacia el CL, con la consiguiente hipoxia y regresión del tejido luteal, debida a una degeneración de los capilares luteales más que a una vasoconstricción. Otra teoría se basa en su acción directa sobre las células luteales, generando una disminución en la producción de progesterona y muerte celular (Wiltbank & Niswender, 1992). Niswender et al. (1994) señalan que la PGF2 α posee un efecto anti esteroideogénico mediante la activación del sistema proteinkinasa C, mientras que

su acción citotóxica parece ser mediada por un proceso de apoptosis celular, el cual genera un incremento en los niveles intracelulares de calcio libre. La PGF2 α también actúa para facilitar la ovulación. Se ha sugerido que la PGF2 α activa enzimas proteolíticas, principalmente colagenasas que contribuyen a la ruptura del folículo (Lemaire & Marsh, 1975; Espey 1980). Otros autores han asociado los efectos de la PGF2 α en la ovulación a un fenómeno similar a una reacción inflamatoria leve (ver Davies et al. 2006).

Los tratamientos tradicionales con PGF2 α (de una o dos dosis separadas nueve a 12 días) presentan dos inconvenientes importantes: 1) una gran dispersión en la manifestación de estros (24 a 120 horas), y 2) una consistente baja fertilidad de los mismos (Hackett et al. 1981; Loubser & van Niekerk, 1981). Esta dispersión de 3 a 4 días en la manifestación de estros, limitó durante mucho tiempo su uso en protocolos de IATF.

La incorporación de la ultrasonografía en tiempo real a los estudios de dinámica folicular permitió dilucidar los motivos de la dispersión de celos. La misma tiene relación con la edad del CL y con el estado de desarrollo folicular al momento de aplicar la PGF2 α (Kastelic & Ginther, 1991; Houghton et al. 1995; Viñoles & 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 et al. 1995). El estado de la población folicular de cada individuo afecta el intervalo al estro (Kastelic & Ginther, 1991; Viñoles & Rubianes, 1998). Si al momento de inyectar la PGF2 α el folículo dominante de la onda está en fase de crecimiento, el estro y la ovulación ocurrirán antes. Sin embargo, si el folículo dominante está en su fase de regresión, un nuevo folículo debe emerger y madurar, por lo que el estro y la ovulación ocurrirán más tarde.

Según Acritopoulou & Haresign (1980) y Wiltbank & Niswender (1992), el período de sensibilidad del CL en la oveja a la PGF2 α estaría entre los Días 5 y 14 del ciclo estral. No obstante, Rubianes et al. (2003) demostraron que es posible inducir la luteolisis a partir del Día 3 pos-ovulación en la oveja; resultados que fueron confirmados posteriormente por Contreras-Solis et al. (2009). Sin embargo, Pope & Cárdenas (2004) solo lograron generar luteolisis a partir del Día 3.5 pos celo. Ha sido demostrado que las concentraciones y/o la afinidad de los receptores de PGF2 α presentes en las grandes células luteales no varían durante el ciclo estral (Wiltbank, 1994). No obstante, los CL jóvenes presentan una mayor capacidad de catabolizar la PGF2 α respecto a CL maduros (Silva et al. 2000); lo cual podría explicar la refractariedad de CL jóvenes a la PGF2 α (Rubianes et al. 2003).

2.1.2.1 Protocolo Synchronvine®

En base a los resultados obtenidos por Rubianes et al. (2003), fue posible desarrollar un protocolo de sincronización de estros con la administración de dos dosis de PGF2 α separadas siete días. De ésta manera sin conocer el momento del ciclo estral durante el cual se administra la primera dosis, al momento de administrar la segunda dosis los CLs tendrán tres a cinco días y todas las ovejas se encontrarán en la primer onda de desarrollo folicular. El uso de éste protocolo determinó la sincronización del 78% de los estros entre las 24 y 48 horas, y las ovulaciones entre

las 48 y 72 horas de administrada la segunda dosis; lo que permitió su uso para IATF (Menchaca et al. 2004). Utilizando el mencionado protocolo con IATF (Synchrovine® 2003), se obtuvieron resultados de concepción similares a los alcanzados cuando se realiza IA en el estro natural pre sincronizado con una dosis de PGF2 α (Forichi 2003; Rubianes et al. 2004; Forichi et al. 2004).

No obstante, los resultados reproductivos obtenidos a nivel comercial con éste protocolo han sido variables y generalmente bajos (Cuadro I). Hasta el momento, los mejores resultados de fertilidad obtenidos superan levemente el 50% (Menchaca et al. 2004; Olivera et al. 2007; Menchaca 2010). Sin embargo los resultados de prolificidad respecto al celo natural son contradictorios, con resultados inferiores (1.19 vs 1.39, Forichi et al. 2004) o similares al estro natural (1.08 vs 1.19; Fierro et al. 2007). En base a los resultados reproductivos obtenidos con el protocolo Sinchrovine®, en los últimos siete años se han realizado diferentes modificaciones al protocolo, buscando obtener un incremento en la fertilidad. En principio se planteó evaluar si la detección de celo (Forichi et al. 2004), la dosis de PGF2 α y la paridad (Olivera et al. 2004a, b) afectaban la respuesta al protocolo, sin obtener impactos relevantes en ninguna de las variables evaluadas. Posteriormente se plantearon modificaciones en el protocolo: incluir GnRH para mejorar la sincronización de la ovulación (Gil et al. 2004; Correa 2006), ampliar el intervalo entre las dosis de PGF2 α (Olivera et al. 2007), ó determinar el momento más apropiado para la IA con distintos métodos de preservación seminal (Menchaca et al. 2004; Fierro et al. 2007; Fossati et al. 2008; Bottaro 2009); y utilizando diferentes vías de deposición seminal (Olivera et al. 2009; Menchaca 2010). A continuación, se resumen los resultados más relevantes obtenidos con las diferentes modificaciones.

2.1.2.2 Modificaciones realizadas al protocolo Synchrovine®

Utilización de GnRH

El agregado de un análogo sintético de GnRH (Buserelina im, 8 μ g, Receptal®) al momento de la IATF luego de sincronizar con el protocolo Synchrovine®, no mejoró los parámetros reproductivos evaluados (concepción, prolificidad y fecundidad). No obstante, esa adición de GnRH generó un incremento en la prolificidad (Gil et al. 2004). Los autores concluyen que el momento de inclusión de la dosis de GnRH (al momento de IATF) podría no ser el adecuado.

En el mismo sentido, Deligiannis et al. (2005) obtuvieron resultados de fertilidad de 50 %, utilizando un protocolo basado en la administración de una dosis de análogo de GnRH, seguido por una dosis de PGF2 α a los 5 días y una segunda dosis de GnRH a las 36 horas, e IATF vía intrauterina a las 12 a 14 horas de la segunda administración de GnRH.

Recientes trabajos han asociado la utilización del protocolo Synchrovine® y el efecto macho (Contreras-Solis et al. 2009), logrando un aumento de los niveles basales de LH; lo cual sumado al incremento en la frecuencia de pulsos de LH generada por el efecto macho reportados previamente (Hawken et al. 2007), podrían determinar un incremento en la fertilidad y prolificidad obtenida por el protocolo.

Por lo tanto, se requieren más estudios para dilucidar si la sincronía en la ovulación es realmente un problema en el protocolo, o se ha administrado la GnRH en el momento inapropiado.

Disminución de la dosis de PGF2 α y variación del intervalo entre dosis

La disminución de la dosis de PGF2 α utilizada (80 vs. 160 μ g, Delprostenate, Glandinex®), determinó una disminución significativa de la fertilidad obtenida (Olivera et al. 2004a) (Cuadro I).

Olivera et al. (2007a), reportan que los resultados de fecundidad del protocolo Sychrovine® son inferiores cuando el intervalo entre las dosis de PGF2 α se extiende a ocho vs. siete días (Cuadro I). Estos resultados sugieren que la respuesta ovulatoria fue más dispersa, debido a la presencia de ovejas que ovulan folículos generados en la primer y segunda onda de desarrollo folicular (Rubianes et al. 2003).

Vías de inseminación

La utilización de la IA intrauterina ha logrado mejorar los resultados de fertilidad obtenidos vía cervical (52.6 % vs. 31.1 %; IA intrauterina vs. cervical respectivamente; $P < 0.05$) (Menchaca 2010). Viñoles et al. (2007), obtuvieron similares resultados de fertilidad (47%) con semen fresco vía intrauterina. Sin embargo, la IA intrauterina mediante laparoscopia no ha logrado incrementos sustanciales en la fertilidad obtenida que permitan su uso masificado. No obstante, se la ha señalado como un factor de fuerte impacto en los resultados reproductivos obtenidos cuando se ha asociado el Sychrovine® con semen congelado y refrigerado (Olivera et al. 2009; Cuadro II).

Momento de IA y método de preservación seminal

Menchaca et al. (2004), compararon diferentes momentos de IA con semen fresco y concluyen que el momento más adecuado para la IA sería a las 42 h pos segunda inyección de PGF2 α (Cuadro I). Fossati et al. (2008) no encontraron diferencias en fertilidad y fecundidad inseminando a las 42, 48 y 54 h con semen fresco (Cuadro I). Utilizando semen refrigerado, Bottaro (2009) observan mejores resultados de fertilidad y fecundidad cuando se insemina a las 48 y 54 h pos segunda inyección de PGF2 α por vía cervical (Cuadro II). Los resultados de fertilidad utilizando semen congelado vía intrauterina a las 50 h pos segunda PGF2 α son muy bajos (fertilidad=13% y fecundidad=0.13; Gil et al. 2006).

Estos trabajos dejan de manifiesto que el momento óptimo para realizar la IA depende del método de preservación seminal, e indican la necesidad de continuar desarrollando alternativas para la utilización de semen congelado.

Categoría animal

La categoría de la hembra inseminada ha sido objeto de estudio (Olivera et al. 2004b; 2006), no encontrándose diferencias en fertilidad y fecundidad en borregas y ovejas sincronizadas con el protocolo Synchronvine®, inseminadas vía cervical con semen fresco.

Cuadro I. Resultados reproductivos obtenidos por diferentes autores utilizando el protocolo Synchronvine® (dos dosis de PGF2 α separadas siete días), inseminando con semen fresco vía cervical.

Autor	n	Concepción	Prolificidad	Fecundidad	Hora IA
Forichi et al. 2004					
Presyn	104	59	1.39 ^a	0.68	10-12
Synchronvine®	102	47	1.18 ^b	0.51	10-12
Menchaca et al. 2004					
Synchronvine®	152	36 ^a	-	-	42
Synchronvine®	120	25 ^{ab}	-	-	48
Synchronvine®	164	22 ^b	-	-	54
Gil et al. 2004					
Synchronvine®	111	49	1.13 ^a	0.56	42
Synchronvine® + GnRH	104	37	1.28 ^b	0.48	42
Olivera et al. 2004a					
Synchronvine®HD	64	40.6 ^a	-	0.44	42
Synchronvine®LD	63	23.8 ^b	-	0.27	42
Olivera et al. 2004b					
Synchronvine®N	18	39	1.00	0.38	42
Synchronvine®M	93	52	1.14	0.59	42
Olivera et al. 2006					
Synchronvine®N	79	37	1.03 ^a	0.38	44
Synchronvine®M	90	40	1.19 ^b	0.48	44
Olivera et al. 2007					
Synchronvine®	145	45 ^{ab}	1.09 ^a	0.49 ^a	42
Synchronvine®	145	51 ^a	1.03 ^a	0.52 ^a	48
Synchronvine®8	98	36 ^{bc}	1.03 ^a	0.37 ^b	42
Synchronvine®8	146	29 ^c	1.19 ^b	0.34 ^b	48
Fossati et al. 2008					
Synchronvine®	82	27	1.09	0.29	42
Synchronvine®	96	31	1.03	0.32	48
Synchronvine®	90	26	1.04	0.27	54

n: número de animales por grupo; Concepción (ovejas gestantes/ovejas inseminadas*100); Prolificidad (fetos/ovejas gestantes); Fecundidad (fetos/total de ovejas); Hora IA: momento de la inseminación en horas posterior a la administración de la segunda dosis de prostaglandina; Presyn: pre sincronización con una dosis de PGF2 α e IA en el estro espontáneo posterior al inducido; Synchronvine®HD: dos dosis de 160 μ g Delprostenate separadas 7 días; Synchronvine®LD: dos dosis de 80 μ g Delprostenate separadas 7 días; Synchronvine®8: dos dosis de PGF2 α separadas 8 días. Los superíndices de significación comparan filas dentro de cada trabajo citado ($P < 0.05$), no comparan resultados entre trabajos de diferentes autores.

Cuadro II. Resultados reproductivos obtenidos por diferentes autores utilizando el protocolo Synchrovine® (dos dosis de PGF2 α separadas siete días), inseminando con semen fresco o refrigerado (5°C por 24 horas), en diferentes momentos (horas) y utilizando diferentes vías de inseminación.

Autor	N	Concep	Prolif	Fec	IA	Hora	Semen
Fierro et al. 2007							
Synchrovine®	90	40 ^a	1.19	0.48 ^a	C	42	Fresco
Synchrovine®	138	10 ^b	1.00	0.10 ^b	C	46	Ref
Bottaro, 2009							
Synchrovine®	89	6 ^a	1.00	0.06 ^a	C	42	Ref
Synchrovine®	89	24 ^b	1.00	0.24 ^b	C	48	Ref
Synchrovine®	91	22 ^b	1.05	0.23 ^b	C	54	Ref
Synchrovine®	96	31 ^b	1.03	0.32 ^b	C	48	Fresco
Olivera et al. 2009							
Synchrovine®	216	13 ^a	1.04	0.13 ^a	C	54	Ref
Synchrovine®	222	47 ^b	1.07	0.50 ^b	IU	54	Ref

n: número de animales por grupo; *Concep*: Concepción (ovejas gestantes/ovejas inseminadas*100); *Prolif*: prolificidad (fetos/ovejas gestantes); *Fec*: fecundidad (fetos/total de ovejas); *IA*: inseminación cervical, C= cervical, IU= intrauterina; *Hora*: momento de la IA en horas posterior a la administración de la segunda dosis de prostaglandina; *Semen*: estado de preservación seminal: fresco (colectado inmediatamente antes del servicio), Ref (refrigerado a 5°C por 24 horas). Los superíndices de significación comparan filas dentro de cada trabajo citado ($P < 0.05$), no comparan resultados entre trabajos de diferentes autores.

Considerando que las modificaciones realizadas al protocolo Synchrovine® no han resultado en mejoras sustanciales en la fertilidad obtenida luego de su aplicación, nos planteamos la necesidad de generar información básica que permita identificar el origen de los bajos índices reproductivos. A continuación, se hace referencia a los trabajos que describen alteraciones del ciclo estral inducidas por la administración de PGF2 α .

2.2 Modificaciones del ciclo estral generadas por la utilización de prostaglandina:

La luteolisis inducida por la administración de PGF2 α exógena, determina una brusca reducción en los niveles plasmáticos de P₄ comparada con la luteolisis natural (Stacey et al. 1976), completándose la misma entre las 72 h vs. 8 a 16 h, natural vs. inducida respectivamente (Wiley et al. 1997). La rápida caída de la P₄ secretada por el CL podría ser la causa de que en ovejas con ciclos estrales cortos (≤ 16.5 días), luego de la administración de la PGF2 α el comportamiento estral se adelante, y el ciclo posterior al inducido se alargue 1.2 días (Cárdenas et al. 2004).

Barrett et al. (2002), sugieren que la luteolisis generada por la PGF2 α exógena podría alterar el reclutamiento de los folículos para la posterior ovulación. Liu et al. (2006) reportan que la luteolisis generada por la administración de PGF2 α podría alterar el ritmo endógeno de la FSH. El rápido aumento de los E₂ pos luteolisis, daría lugar a una rápida disminución de la FSH, disrupción que afectaría el

origen de los folículos ovulatorios, pudiendo estar asociado a una ruptura folicular adelantada y a la formación de CLs de vida corta (Liu et al. 2006).

Davies et al. (2006) luego de la administración de una dosis de $\text{PGF2}\alpha$, observaron la ovulación de los folículos existentes sin que las ovejas demostraran comportamiento estral ó pico de LH. En todos los casos falló la formación de un CL de vida media y de capacidad de síntesis de P_4 normal; atribuyéndolo a un efecto directo a nivel ovárico de la $\text{PGF2}\alpha$ más que a la caída brusca de la P_4 . La falla en la luteogénesis podría estar atribuida a un inadecuado desarrollo del FPO (Bartlewski et al. 2003); esos folículos fallan en estimular el incremento en LH preovulatorio, el cual es necesario para la ovulación y la luteogénesis normal (Niswender et al. 1986). Los insuficientes niveles de LH, podrían ser determinados por la falta de feed back positivo LH- E_2 producidos por el folículo dominante. Los niveles de E_2 producidos por el folículo dominante inducido a ovular por una segunda dosis de $\text{PGF2}\alpha$ en cabras (con un intervalo de 10 días entre las dosis), son menores comparadas con los producidos por un folículo que ovula debido a una sincronización con progestágenos (Fernandez-Moro et al. 2008).

El efecto de la administración de $\text{PGF2}\alpha$ sobre el tamaño folicular es contradictorio. Houghton et al. (1995), observaron que los folículos que ovulan luego de la administración de una $\text{PGF2}\alpha$ son de menor tamaño que los que ovulan espontáneamente; y los que ovulan de manera inducida temprano en el ciclo, son más grandes que los que ovulan de una etapa más tardía. En forma opuesta, Nephew et al. (1991) describen que el diámetro folicular y la relación $\text{P}_4:\text{E}_2$ en el líquido folicular, no se vieron afectados por la disminución drástica de la P_4 plasmática. Sin embargo, los folículos generados presentan menor número de células granulosa y resultan en una menor concentración de P_4 entre los Días 3 y 6 pos celo (Nephew et al. 1991; Wiley et al. 1997). Estos resultados concuerdan con los descritos por White et al. (1987), quienes observan que folículos alterados generan CL de menor vida media, que secretarán menor cantidad de P_4 respecto a CL generados por folículos de calidad normal. Recientes hallazgos en cabras (Vázquez et al. 2010), confirman esa hipótesis; CLs inducidos por la administración de $\text{PGF2}\alpha$ secretan menor cantidad de P_4 entre los Días 5 y 15 del ciclo, comparados con CLs de cabras cuya formación ocurrió luego de un estro espontáneo. Estas menores concentraciones de P_4 podrían afectar la capacidad de sobrevivencia embrionaria y ser en parte responsables de la baja fertilidad obtenida luego de la sincronización con $\text{PGF2}\alpha$.

2.3 Desarrollo embrionario temprano, reconocimiento materno y mantenimiento de la gestación.

Posterior a la fertilización, se producen las primeras divisiones celulares del embrión en el oviducto, llegando al útero aproximadamente el Día 4 post-estro, bajo la denominación de mórula compacta. A continuación se forma el blastocisto (Día 6) que eclosiona de la zona pelúcida en los Días 8 a 9. El Día 11 el embrión adopta una forma tubular para luego elongarse, denominándose embrión filamentosos (Días 12 a 16), crecimiento que permite iniciar el proceso de implantación, ocurriendo la unión final al endometrio a partir del Día 16 (Winterberguer Torres & Sevellec, 1987). Hasta la implantación, el embrión se desarrolla libremente en el oviducto y en el útero, dependiendo de sus secreciones para sobrevivir (nutrición histotrófica)

(Spencer et al. 2004a). El fluido oviductal influye sobre la función de los gametos y el desarrollo embrionario. Uno de los principales componentes de esa secreción oviductal son las glicoproteínas específicas de oviducto (también denominadas oviductinas), que promueven la capacitación espermática, unión del espermatozoide y el óvulo, y el desarrollo embrionario; y la osteopontina que favorece la fertilización y el desarrollo embrionario (Killian 2004). La capacidad secretoria del oviducto y útero es regulada por la sensibilidad de los tejidos a las hormonas esteroideas.

El reconocimiento materno de la gestación es un proceso fisiológico por el cual el embrión envía señales a la madre que determinan la prolongación de la vida del CL, y por ende la síntesis y liberación de P₄. La P₄ actúa a nivel uterino estimulando funciones que permitirán el desarrollo embrionario, implantación, placentación y mantenimiento de la gestación (Spencer et al. 2004a). El reconocimiento materno de la gestación requiere que el embrión se elongue hasta su forma filamentosa para producir interferón tau (INF τ), que es la señal embrionaria que previene el mecanismo luteolítico (Spencer & Bazer, 1996). Las células del trofoectodermo embrionario son las encargadas de sintetizar y secretar el INF τ entre los Días 10 a 25, siendo su liberación máxima en los Días 14 a 16 (Roberts et al. 1999: citados por Spencer et al. 2004a). El INF τ actúa a nivel del tejido luminal y glandular endometrial, estando su efecto antiluteolítico basado en la supresión directa de los RE e indirecta de los RO, y manteniendo la secreción de P₄ por el CL (Fleming et al. 2001).

Por lo anteriormente expuesto queda de manifiesto que cualquier alteración en los patrones de secreción de estradiol y progesterona, producidos por un folículo y un CL de calidad insuficiente, podrían afectar la sensibilidad del útero a la acción de los esteroides, que son clave en el desarrollo embrionario y la inducción del reconocimiento materno de la preñez.

2.4 Pérdidas Reproductivas

La mortalidad embrionaria es definida como la pérdida del producto obtenido entre la concepción y el fin del período embrionario (Día 45), y es una causa de pérdidas económicas en sistemas de producción ovina (Fernández Abella, 1993; Dixon et al. 2007).

Las principales pérdidas embrionarias ocurren antes del Día 20 post servicio (mortalidad embrionaria precoz) (10 – 25%), disminuyendo éstas al ingresar en la etapa fetal (menor al 7%) (Wilkins & Croker, 1990). Factores genéticos, fisiológicos, endócrinos, ambientales (Diskin & Morris, 2008) y nutricionales (Abecia et al. 2006; Sosa et al. 2004; 2008) han sido identificados como origen de éstas pérdidas embrionarias.

Kleemann & Walker (2005), destacan la necesidad de determinar para cada región en particular los orígenes de las pérdidas reproductivas. Estudios a nivel internacional, demuestran que las causas de pérdidas reproductivas son similares en Australia y Nueva Zelanda; estando representadas por: 1) baja tasa ovulatoria (asociado a deficiencias nutricionales), 2) ovejas ofrecidas al servicio pero que no se preñan (principalmente fuera de estación reproductiva), 3) las fallas parciales de

ovulaciones múltiples (ovejas que producen menos corderos respecto a la tasa ovulatoria que presentan), y 4) mortalidad de corderos (Kelly & Croker, 1990; Knight 1990).

Poca información ha sido generada en nuestro país sobre las pérdidas reproductivas en condiciones naturales. Los recientes estudios realizados demuestran un efecto marcado del estado corporal, disponibilidad de forraje, dotación utilizada y carga parasitaria (Fernández Abella et al. 2006a,b; 2007; Fernández Abella & Formoso, 2007).

2.4.1 Parasitosis:

Fernández Abella et al. (2006a,b) reportan una estrecha relación entre la carga parasitaria y los niveles de pérdidas reproductivas. La TO se vio disminuida entre 15 y 21 % (1.21, 1.06, 1.00; Fernández Abella et al. 2006a); explicado por una disminución en el número de folículos que se desarrollan desde el reclutamiento al estado de preovulatorio (Fernández Abella et al. 2006b). Las pérdidas embrionarias incrementaron según la carga parasitaria: 5.6, 12.5 y 20.0 % (cargas parasitarias Baja- HPG= 1306, media- HPG= 1413- y alta- HPG= 1519 respectivamente, correspondiendo los valores de HPG a promedios iniciales, $P < 0.01$; Fernández Abella et al. 2006a). Reportes posteriores (Fernández Abella et al. 2008b), confirman éstos resultados y permiten identificar que ante cargas parasitarias superiores a los 900 HPG individual, la tasa y el nivel ovulatorio (número de CLs totales/total de ovejas), y la fertilidad se ven disminuidos significativamente.

2.4.2 Nutrición

El nivel nutricional y la concentración de P_4 plasmática están inversamente relacionados. Bajos niveles nutricionales han sido relacionados a altos niveles de P_4 circulantes, pero la concentración de P_4 en el endometrio es menor, lo que explicaría las mayores pérdidas embrionarias en ovejas sub-nutridas (Abecia et al. 2006). La menor concentración de P_4 en el útero se asocia con una menor expresión del RP en el órgano blanco (Sosa et al. 2004). La sub-nutrición también disminuye la sensibilidad del oviducto a los esteroides ováricos (Sosa et al. 2008). Estas alteraciones en la sensibilidad del oviducto y útero afectan el desarrollo embrionario. Los embriones de ovejas sub nutridas secretan menores cantidades de IFNt in vitro, y el tejido endometrial secreta mayores cantidades de $PGF2\alpha$ (Abecia et al. 1999), lo que compromete el mecanismo de reconocimiento materno de la preñez y la sobrevivencia embrionaria (Lozano et al. 2003).

El incremento de la dotación animal (7.4 vs. 14.8 ovejas/hectárea) aumenta las pérdidas embrionarias (5.3 vs. 12.7 %; $P < 0.05$, baja y alta dotación respectivamente) (Fernández Abella & Formoso, 2007). En forma opuesta, una mejora en la disponibilidad y calidad del forraje incrementan los parámetros reproductivos obtenidos (Fernández Abella et al. 2007; Fernández Abella & Formoso, 2007).

Estados corporales superiores a 2.5 (Fernández Abella & Formoso, 2007) y a 2.75 (Menchaca et al. 2003) (escala de 0 a 5; Russel et al. 1969) han sido asociados a

incrementos en concepción y fecundidad respecto a estados inferiores. Según Fernández Abella & Formoso (2007), estados corporales de 2.25 determinaron una TO inferior e incrementos hasta del 10 % en pérdidas embrionarias respecto a ovejas en estado 2.5 a 2.75; observando además que ha mayor estado corporal la TO aumentó al igual que las pérdidas embrionarias.

Los resultados de diferentes autores dejan de manifiesto que el manejo nutricional de la majada es un aspecto relevante para evitar pérdidas reproductivas.

2.4.3 Efectos ambientales

Diversos trabajos identifican el efecto de altas temperaturas y su asociación con pérdidas embrionarias en bovinos (Rensis & Scaramuzzi, 2003) y ovinos (Dutt et al. 1959; Dutt, 1963; Naqvi et al. 2004). La exposición a 32 °C en el Día 12 del ciclo previo al servicio, disminuye la tasa de fertilización y aumenta a 85 % las pérdidas embrionarias, comparada con ovejas a temperatura normal (Dutt et al. 1959). Los embriones ovinos son más susceptibles al estrés calórico en sus fases tempranas de desarrollo (Dutt 1963), observándose mayores pérdidas cuando se produce entre los Días 0 y 5, comparado con el Día 8 (61.5 a 100 % vs. 40 %; Días 0 a 5 vs. 8 respectivamente; Alliston & Ulberg, 1961; Dutt 1963). Esto ha sido explicado por un incremento en la velocidad de tránsito a través del oviducto, determinando una asincronía entre el embrión y el desarrollo endometrial, resultando en un aumento de la mortalidad embrionaria por la llegada al útero de embriones inmaduros (Alliston & Ulberg, 1961), ó con anomalías morfológicas (Dutt 1954). Las pérdidas se incrementan en servicio por IA respecto a la monta natural (Thwaites 1969; Durán del Campo 1980). El desarrollo de la placenta, y el peso del feto durante la gestación y al nacimiento, también han sido afectados por el estrés calórico (Shelton 1964; Bell et al. 1989; Early et al. 1991; McCrabb et al. 1993; Ali & Hayder, 2008).

La acción de las precipitaciones sobre los parámetros reproductivos ha sido reportada a nivel internacional (Griffiths et al. 1970; Doney et al. 1973; Gunn & Doney, 1973) y en nuestro país (Fernández Abella et al. 2008a). Doney et al. (1973) y Gunn & Doney (1973) observaron incrementos en la mortalidad embrionaria temprana cuando se expone a los animales a fuertes precipitaciones, principalmente 3 días luego del servicio (Doney & Gunn, 1972, citados por Duran del Campo 1980). El estrés generado por lluvia artificial generó disminución del nivel ovulatorio de la majada respecto al grupo control (0.71 vs. 0.86 respectivamente; lluvia vs. control), sin afectar los demás parámetros reproductivos ni las pérdidas embrionarias (Fernández Abella et al. 2008a). Sin embargo, cuando se utilizaron capas protectoras, se observaron diferencias significativas en el porcentaje de ovejas que demostraron estro (100 vs. 50%), la duración de estro (19:44 vs. 16:48 h), el nivel ovulatorio (96 vs. 44 %) y la TO (1.20 vs. 1.0) (grupo con capa vs. sin capa). En contraposición a los reportes internacionales, estudios realizados en nuestro país no registraron incrementos en pérdidas embrionarias por el efecto del estrés pluviométrico. La combinación de las precipitaciones con bajas temperaturas, incrementaría el estrés aumentando las pérdidas (Griffiths et al. 1970).

El mecanismo de acción del estrés sobre la reproducción aún no está totalmente dilucidado. No obstante, se ha descrito el efecto sobre el eje hipotálamo –

hipófisis - gónadas, afectando la liberación de GnRH y por lo tanto la liberación de las gonadotropinas (FSH y LH) y el pico preovulatorio de LH y la ovulación (Tilbrook et al. 2000; Dobson et al. 2003).

2.4.4 Pérdidas reproductivas asociadas a sincronización de celos

En ovejas sincronizadas con progestágenos y eCG, las principales causas de pérdidas reproductivas observadas son las alteraciones en el transporte y sobrevivencia espermática (Quinlivan & Robinson, 1969; Smith & Allison, 1971; Hawk & Conley, 1972); y las fallas en la fertilización y la mortalidad embrionaria (Lunstra & Christenson, 1981).

En cuanto a las pérdidas reproductivas generadas por la sincronización con PGF2 α , existen varios estudios internacionales. Hawk (1973) reporta que la sincronización con PGF2 α genera una disminución en la cantidad de contracciones uterinas dirigidas hacia el oviducto, por lo tanto menor número de espermatozoides llegan al sitio de fertilización a las 24 h pos servicio.

Se ha sugerido también la alteración de las características del mucus vaginal (Hawk et al. 1981), las que disminuyen el transporte de los espermatozoides desde el cérvix. Esto provoca una reducción en la cantidad de células espermáticas que llegan al oviducto luego de IA, lo que se asocia con los bajos porcentajes de fertilización (55%) reportados por Trounson et al. (1976) trabajando sobre ovejas superovuladas; y por Boland et al. (1978a) cuando las ovejas fueron sincronizadas con PGF2 α vs. ovejas sincronizadas con progestágenos (7% vs. 69%); y por ende menor fertilidad (Lightfoot et al. 1976, citados por Boland et al. 1978a; Boland et al. 1978b). La utilización de la IA intrauterina para evitar esa barrera anatómica ha permitido mejorar los resultados de fertilidad (Olivera et al. 2009); siendo una técnica que permitiría incrementar la fertilidad obtenida.

La sincronización con PGF2 α promueve el desarrollo de folículos ovulatorios con baja capacidad de producir esteroides, determinando la formación de un CL que secreta menores cantidades de P $_4$ (White et al. 1987), y por ende una menor sobrevivencia embrionaria (Ashworth et al. 1989; Parr 1992). Existe evidencia de que pequeñas disminuciones en la concentración de P $_4$ cerca del Día 14 luego del servicio, están asociadas con mayor mortalidad embrionaria (ver Scaramuzzi & Martin, 1984).

Gonzalez-Bulnes et al. (2005) describen que la concentración media de E $_2$ en plasma al igual que la P $_4$ en la fase luteal temprana (posterior a la segunda dosis de PGF2 α), es superior en ovejas sincronizadas con PGF2 α respecto a ovejas sincronizadas con progestágenos (P<0.05). Los E $_2$ y la P $_4$ regulan la expresión de sus propios receptores (Clark & Mani, 1994, citados por Sosa, 2007; Ing et al. 1996; Ing & Ott, 1999). En ese sentido, la sincronización con progestágenos generó una disminución en la expresión de los RE y los RP en oviducto y útero comparado con la sincronización con PGF2 α (García-Palencia et al. 2007). La tasa de fertilización, embriones recuperados y la tasa de viabilidad embrionaria, presentan tendencias favorables al Cloprostenol respecto a los progestágenos (Gonzalez-Bulnes et al. 2005), pudiendo estar relacionada a la mayor expresión de receptores en ovejas

sincronizadas con PGF2 α (García-Palencia et al. 2007). En forma opuesta, recientes ensayos en nuestro país describen una disminución de la tasa de concepción cuando las ovejas fueron sincronizadas con PGF2 α , comparadas con los clásicos protocolos de progestágenos y eCG (Fossati et al. 2008). Las pérdidas reproductivas absolutas entre el no retorno al estro al Día 23 y la fertilidad a la ecografía, fueron superiores en las ovejas sincronizadas con el protocolo Synchrovine® (Fossati et al. 2008).

El efecto de la administración de PGF2 α sobre la TO y prolificidad, es contradictorio. Houghton et al. (1995), Rubianes et al. (2004) y Fierro et al. (2007) concuerdan en que no existen efectos deletéreos sobre éstos parámetros. Sin embargo, Forichi (2003) y Forichi et al. (2004), evidenciaron una menor prolificidad en ovejas sincronizadas con el protocolo Synchrovine® respecto a ovejas en celo natural. Los mencionados resultados, y la mejora observada con la inclusión de GnRH al momento de la IA, estarían evidenciando un posible efecto negativo de la PGF2 α sobre la prolificidad, y por ende sobre la fecundidad final (Correa 2006).

Los resultados obtenidos hasta el momento indican que existen pérdidas reproductivas de diferentes orígenes, que ocurren en diferentes momentos cuando sincronizamos con PGF2 α , las cuales deben ser identificadas para iniciar el proceso de mejora de los resultados reproductivos obtenidos por el protocolo para IATF Synchrovine® (Figura 2).

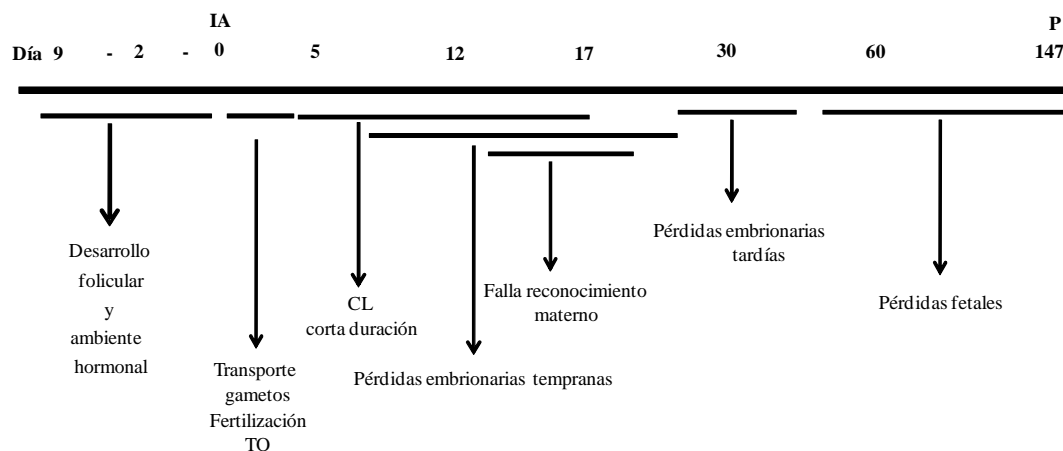


Figura 2: Representación esquemática de las posibles causas y momentos de pérdidas reproductivas en ovejas sincronizadas con el protocolo Synchrovine®. IA: inseminación artificial; P: parto; Transporte spz: Transporte espermático; TO: tasa ovulatoria; CL:cuerpo lúteo; Día: día del ciclo (Día 0= día de la IA).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

La utilización de análogos sintéticos de prostaglandina sería una alternativa más económica, práctica y que potencialmente genera menos contaminación, respecto al uso de los protocolos en base a progestágenos y gonadotropinas; sin el inconveniente de generar anticuerpos contra la eCG, y sin los problemas prácticos de las esponjas intravaginales.

Sin embargo, los bajos resultados reproductivos obtenidos a nivel de experimentación y de campo, conllevan a la necesidad de identificar las causas y momentos en que se producen las pérdidas reproductivas generadas por los protocolos en base a prostaglandina para la IATF.

Existen experiencias a nivel nacional e internacional donde comparan ambos protocolos de sincronización para la IATF (prostaglandina vs. progestágenos-eCG), pero no existen referencias que comparen los resultados reproductivos obtenidos luego la sincronización con PGF2 α respecto al estro espontáneo.

Los trabajos realizados, no aportan información concluyente acerca de los motivos por los cuales ovejas sincronizadas con PGF2 α , que demuestran comportamiento estral y ovulan en forma sincronizada, obtienen bajos porcentajes de preñez a pesar de utilizar IA intrauterina.

El **objetivo general** de ésta tesis fue obtener información sobre las pérdidas reproductivas en ovejas generadas por la sincronización de estros con PGF2 α .

Los **objetivos específicos** de ésta tesis fueron:

- Determinar las características de crecimiento del FPO inducido a ovular por la sincronización con PGF2 α , y compararlo con el FPO de ovejas que ovulan espontáneamente.
- Cuantificar la concentración de E₂ en el período preovulatorio; y los niveles de P₄ desde el Día -6 al 6, y los Días 12 y 17 de gestación (Día 0= IA), en ovejas sincronizadas con PGF2 α y en ovejas en estro espontáneo.
- Cuantificar las pérdidas reproductivas desde el inicio del protocolo de sincronización hasta el Día 60 de gestación, y compararlas con las pérdidas reproductivas observadas en ovejas en estro espontáneo.

Se plantea la hipótesis de que la sincronización de estros con el Protocolo Synchrovine® (dos dosis de PGF2 α separadas siete días e IATF), no generaría disminución de la TO, pero disminuiría la capacidad esteroidogénica del FPO y la producción de P₄ por el nuevo CL; lo que determinaría una menor calidad embrionaria y mayores pérdidas reproductivas respecto a ovejas en estro espontáneo.

4. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN

Para testar la hipótesis presentada, se realizaron dos experimentos simultáneos: uno controlado (experimento I) y otro extensivo (experimento II); los cuales fueron conformados por dos grupos de ovejas cada uno: un grupo de ovejas sincronizadas con PGF2 α y otro grupo de ovejas en estro espontáneo.

El experimento I (controlado), se diseñó con el objetivo de estudiar el desarrollo y capacidad esteroidogénica del FPO inducido a ovular por el tratamiento de sincronización, cuantificar las pérdidas en TO, calidad embrionaria, y niveles plasmáticos de P₄ durante y hasta el Día 6 luego de la sincronización (Día 0= día de la IA).

En el experimento II (extensivo), el objetivo fue determinar la producción de P₄ por el nuevo CL generado por el protocolo de sincronización (hasta el Día 17); y cuantificar pérdidas reproductivas hasta el Día 60 de gestación.

Ambos experimentos fueron llevados a cabo en forma simultánea y posteriormente se realizaron las mediciones hormonales.

5. MATERIALES Y METODOS

Los experimentos fueron llevados a cabo en la Escuela Agraria La Carolina, ubicada sobre ruta 23 Km. 162.500, Ismael Cortinas, Flores, Uruguay (33 S-57 W), durante la estación reproductiva (abril - mayo, 2009). Todos los procedimientos experimentales fueron avalados previamente por el Comité de Bioética Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República.

5.1 Animales

Se utilizaron 238 ovejas multíparas de la raza Corriedale (mayores a 2.5 años de edad), clínicamente aptas para la reproducción, con un moderado estado corporal (3.1 ± 0.06 , escala 0 a 5; Russel et al. 1969) y peso vivo de 45.7 ± 0.9 Kg para el experimento I; y 3.2 ± 0.02 y 47 ± 0.3 Kg para el experimento II respectivamente.

5.2 Manejo

En ambos experimentos (I y II) los animales permanecieron pastoreando campo natural con una disponibilidad de 1444 Kg MS/ hectárea, 8% de proteína cruda y 8.5 MJ de energía metabolizable/ Kg MS. En el experimento I, las ovejas fueron encerradas durante la noche con agua a disposición, para realizar ayuno previo al sangrado diario.

5.3 Diseño Experimental

Se realizó un diseño experimental completamente al azar. Las ovejas fueron asignadas aleatoriamente a un grupo Control y a un grupo tratado con prostaglandina: 30 ovejas en el experimento I (n= 15/grupo); y 208 en el experimento II (n= 73 en el grupo Control y 135 en el grupo tratado con PGF2 α ; Figura 3).

Grupo 1 “Control”: las ovejas fueron pre sincronizadas mediante doble inyección im de DL – Cloprostenol (125 μ g/dosis, Sincron®, Laboratorio Uruguay, Montevideo, Uruguay), administradas con un intervalo de ocho días entre ambas dosis, aplicándose la primer dosis 27 días previo a la IA (Día 0, Figura 3). Se detectó el estro espontáneo a partir del Día 17 de la segunda dosis de PGF2 α .

Grupo 2 “sincronizado” (PG): sincronización mediante doble inyección im de DL – Cloprostenol (125 μ g/dosis, Sincron®, Laboratorio Uruguay, Montevideo, Uruguay), administradas con una separación de siete días entre ambas dosis (Protocolo Synchrovine®; Día -9 y Día -2, Figura 3). Se detectó el estro sincronizado.

Las inyecciones de PGF2 α fueron aplicadas con jeringa de insulina (para una administración más exacta de la dosis) y agujas estériles descartables.

La detección de estros se realizó cada 12 hs mediante la utilización de capones androgenizados de la raza Corriedale (Ciclopentilpropionato de testosterona 100 mg/dosis, tres dosis administradas im con un intervalo entre ellas de siete días; Testosterona Ultra Fuerte®, Laboratorio Dispert, Montevideo, Uruguay) (6 capones/100 ovejas). Las ovejas detectadas en estro fueron identificadas y permanecieron separadas del resto de la majada para evitar estrés por manejo.

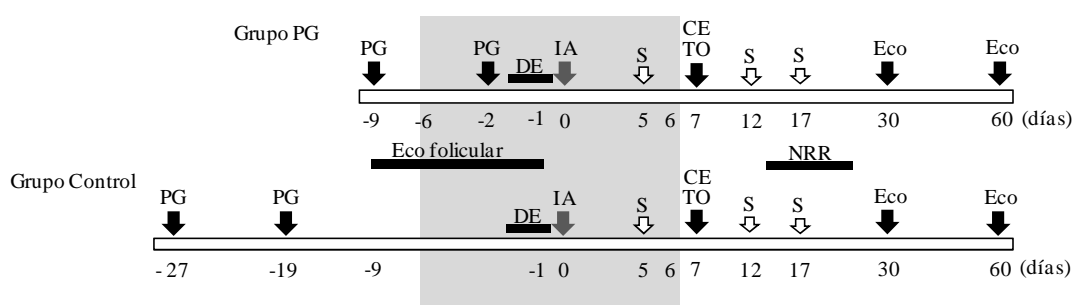


Figura 3. Esquema del diseño experimental.

Grupo Control: ovejas pre sincronizadas mediante doble inyección im de DL – Cloprostenol (125 μ g / dosis-PG-), administradas con una separación de ocho días, comenzando 27 días previo a la inseminación artificial (Día 0); **Grupo PG:** ovejas sincronizadas mediante doble inyección im de DL – Cloprostenol (125 μ g / dosis), administradas con una separación de siete días (Protocolo Synchrovine®; Día -9 y Día -2); **Eco folicular:** desarrollo folicular determinado por ecografía transrectal; **DE:** detección de estros; **IA:** inseminación artificial vía intrauterina; **CE:** colecta y evaluación embrionaria; **TO:** ecografía realizada el Día 7 para evaluación de tasa ovulatoria; **NRR:** control de no retorno al celo (Días 15 a 21); **Eco 30 y 60:** fertilidad y prolificidad evaluadas por ecografía los Días 30 y 60 respectivamente; **Área**

sombreada: muestreo sanguíneo (S) Días -6 a 6 (experimento I) y Días 0, 5, 12 y 17 (experimento II).

5.4 Muestreo sanguíneo y mediciones hormonales

El muestreo sanguíneo fue realizado mediante punción de la vena yugular, utilizando agujas descartables y tubos de vidrio con heparina, refrigerados a 4°C hasta la centrifugación. En el experimento I, las muestras de sangre fueron extraídas en condiciones de asepsia una vez por día (en la mañana) desde el Día -6 al Día 6; con una repetición de sangrado a las 12 hs luego del inicio del estro. En el experimento II, las muestras fueron colectadas los Días 0 (25 ovejas / grupo), 5, 12 y 17 (57 ovejas / grupo; designadas de manera tal de que las ovejas del grupo PG hubieran demostrado comportamiento estral al día de la IA, e inseminadas el mismo día que las del grupo Control).

Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 2500 rpm durante 15 minutos, el plasma fue aspirado con pipeta y almacenado a -20 °C hasta la determinación hormonal. Los niveles hormonales fueron analizados en el Laboratorio de Radioinmuno análisis (RIA) de la Facultad de Veterinaria (UdelaR), donde se cuantificaron los niveles plasmáticos de P₄ y E₂ utilizando la técnica descrita por Meikle et al. (1997). Las concentraciones de P₄ fueron determinadas por un RIA en fase sólida utilizando kits de DPC (Diagnostic Product Co., Los Angeles, CA, USA). Las muestras fueron analizadas en dos ensayos. La concentración mínima detectable (sensibilidad) fue de 0.3 nmol/L. Los coeficientes de variación intra ensayo en el ensayo I (muestras del experimento I), para controles bajos (2.5 nmol/L), medios (6.4 nmol/L) y altos (23.8 nmol/L) fueron 13.4%, 5.4% y 6.2%, respectivamente. Para el ensayo II (muestras del experimento II), los coeficientes de variación intra ensayo para controles bajos (2.5 nmol/L), medios (6.7 nmol/L) y altos (24.2 nmol/L) fueron 13.4%, 4.7% y 6.2%, respectivamente. Los coeficientes de variación inter ensayo para los mismos controles fueron 12.6%, 4.9%, 5.8%, respectivamente. Las concentraciones de E₂ fueron determinadas por un RIA en fase líquida utilizando kits de DPC (Diagnostic Product Co., Los Angeles, CA, USA), en muestras obtenidas 48 hs previo hasta la IA en el experimento I. Todas las muestras fueron analizadas en duplicado en el mismo ensayo. La concentración mínima detectable del ensayo fue de 3.6 pmol/L. El coeficiente de variación intra ensayo para el control bajo (6.0 pmol/L) y alto (21 pmol/L) fue de 22.3% y 3.7% respectivamente.

5.5 Colección seminal e inseminación artificial

Se utilizaron tres carneros adultos de la raza Corriedale (mayores a 1.5 años), clínicamente aptos para la reproducción (examen clínico y serológico - detección de *Brucella ovis* mediante inmuno difusión en gel de agar -). La colección y evaluación seminal fue realizada utilizando la metodología descrita por Evans & Maxwell (1987). Se colectaron dos eyaculados consecutivos por carnero, que tras hacer un pool, se procesaron como un solo eyaculado (pool por carnero). Luego de la colecta, los eyaculados de cada carnero permanecieron en baño de agua entre 30 y 33°C (“baño María”), se evaluó la concentración espermática con un fotómetro

(Spermacue®, Minitüb, Landshut, Germany), y se realizó un pool de semen donde cada carnero aportó similar cantidad de espermatozoides.

La dilución seminal fue realizada con un diluyente en base a leche descremada UHT, con 5% de yema de huevo y con la adición de antibióticos (100.000 UI penicilina G procaínica + 100 mg dihidroestreptomocina en 100 ml de diluyente). La dilución fue de 1:5 (un volumen de semen en 5 de diluyente), con una dosis inseminante final de 0.20 ml/oveja conteniendo 100×10^6 de espermatozoides totales/oveja.

Las dosis fueron mantenidas en tubos de plástico con tapa de rosca a temperatura ambiente, protegidas de la luz solar y cambios de temperatura hasta el momento de la utilización (3 hs de tiempo total desde la dilución al final de la IA). Se monitoreó la motilidad espermática del semen diluido previo a su utilización, durante y finalizada la IA.

La IA fue realizada por vía intrauterina por dos inseminadores, utilizando endoscopio rígido (IFT®, Canadá, 0° con fuente de luz led incorporada; y Karl Storz® 30° con fuente de luz externa), siguiendo la técnica descrita por Evans & Maxwell (1987). Las ovejas fueron inseminadas aleatoriamente entre inseminadores y grupos. La IA se realizó a estro detectado en las ovejas del grupo control (detección de estros por la noche e IA por la mañana), y a tiempo fijo en todas las ovejas del grupo PG (a las 48 hs de la administración de la segunda dosis de PGF 2α). Para la evaluación de los indicadores y pérdidas reproductivas, solo se usaron las ovejas del grupo Control que demostraron comportamiento estral el mismo día que se realizó la IATF en el grupo PG, siendo ésta la explicación de un menor número de ovejas en el grupo Control en el experimento II.

5.6 Tono uterino

Al momento de la IA, se evaluó el tono del útero utilizando una escala previamente definida. La escala subjetiva utilizada fue: 1- flácido (baja contractilidad que dificultaba la punción del útero con el aspic®); 2- normal (contractilidad normal, la punción del útero se realizaba con escasa dificultad); 3: turgente (alta contractilidad, los cuernos uterinos eran fácilmente puncionados con el aspic®).

5.7 Recolección y clasificación de estructuras embrionarias

Las ovejas del experimento I fueron sometidas a anestesia general el Día 7, mediante asociación de maleato de acepromacina (4.05 mg/oveja Prequillan®, Laboratorio Fatro, Bolonia, Italia) - xilacina im (4.0 mg/oveja, Seton®, Laboratorio Calier, Barcelona, España) y maleato de acepromacina (2.7 mg/oveja) - ketamina iv (2.0 mg/oveja, Vetanarcol®, Laboratorio König, Buenos Aires, Argentina); para la recuperación de las estructuras embrionarias generadas.

Se realizó un procedimiento mixto endoscópico – quirúrgico, utilizando una técnica anterógrada para el lavado “flushing” uterino (Tervit & Havik, 1976). El medio de lavado (PBS-BSA 0.4% a 38°C; Emcare® ICPbio NZ, Laboratorio

Syntex), fue inyectado a la luz uterina a través de un Adbocat® (ubicado cercano a la unión útero tubal) y recolectado en una placa de petri a través de una sonda Foley® (fijada mediante la insuflación de su balón de aire hacia craneal de la bifurcación de los cuernos uterinos). El procedimiento fue realizado en cada cuerno uterino, utilizando 20 a 25 ml de medio de lavado/cuerno.

Las estructuras embrionarias fueron identificadas con lupa estereoscópica (Arcano 600® x 20-40, Buenos Aires, Argentina) y mantenidos en forma conjunta por oveja donante en pocillos de placas NUNC® (Bioniche® USA) con DMPBS-BSA 0.4% (Laboratorio Nutricell, Brasil) a temperatura ambiente hasta su evaluación.

El estadio de desarrollo y la calidad subjetiva de todas las estructuras embrionarias obtenidas, fue determinada por un solo observador utilizando la metodología descrita por Winterberguer & Sevellec (1987) y Stringfellow & Seidel (1998). La escala utilizada para clasificar la calidad de los embriones fue: 1- excelente, 2- bueno, 3- pobre, 4- degenerado ó retrasado.

5.8 Evaluación ecográfica

En el experimento I, se evaluó diariamente el crecimiento de los folículos existentes en ambos ovarios, mediante ultrasonografía transrectal con un transductor lineal de 7.5 MHz diseñado para evaluación prostática humana, con un ecógrafo ALOKA 500 (Overseas Monitor Corp. Ltd., Richmond, BC, Canadá), utilizando la metodología descrita por Rubianes et al. (1997a). Se registraron el número, diámetro y posición relativa de los folículos ≥ 2 mm y CLs de ambos ovarios. Las ecografías fueron realizadas en ambos grupos diariamente entre el Día -9 (día de administración de la primera PGF2 α) y el día del inicio del estro sincronizado (Día -1) por la segunda dosis de PGF2 α . Se utilizaron las siguientes definiciones para el estudio del crecimiento folicular: el día de la emergencia del FPO fue el día en el cual el folículo fue identificado retrospectivamente con 2-3 mm de diámetro; el diámetro a la emergencia fue el diámetro (mm) del folículo ese día; el día de máximo diámetro fue el día luego de la emergencia en el cual el FPO alcanzó su máximo diámetro. La tasa de crecimiento fue calculada como la diferencia en diámetro desde la emergencia hasta el máximo diámetro, dividido el número de días que duró la fase de crecimiento y fue expresado en mm/d. La vida media del FPO fue calculada como el número de días desde la emergencia hasta la última evaluación ecográfica (el día previo a la IA). Las ovejas se colocaron en un cepo diseñado para la sujeción en estación, se vació el recto manualmente y se colocó entre 20 a 30 ml de carboximetil celulosa para evitar daños a la mucosa rectal, y permitir un mejor contacto entre la mucosa y el transductor. Las mediciones realizadas se registraron en planillas previamente diagramadas.

En el experimento II, se evaluó la TO (número de CL/total de ovejas que ovularon, n= 57/grupo; las mismas ovejas a las que se extrajeron muestras de sangre); concepción (ovejas gestantes/inseminadas*100), prolificidad (embriones/oveja gestante) y fecundidad (embriones/ovejas sincronizadas), los Días 7 y 30 respectivamente; mediante ultrasonografía transrectal con transductor lineal de 7.5 MHz (Aloka®, Tokyo, Japan). La concepción y prolificidad al Día 60 fue

evaluada mediante ultrasonografía transabdominal, utilizando un transductor convexo de 3.5 MHz (Aloka®, Tokyo, Japan).

5.9 Análisis estadístico

VARIABLES CONTINUAS CON MEDIDAS REPETIDAS EN EL TIEMPO (DESARROLLO FPO, CONCENTRACIÓN DE P₄ Y E₂): se analizaron mediante ANOVA, procedimiento mixed del programa SAS (2001). Los efectos fijos fueron: el grupo, día y su interacción. La oveja dentro de cada grupo fue considerada como efecto aleatorio. Se modeló la covarianza para considerar la correlación entre medidas sucesivas del mismo animal, con la opción auto regresiva de orden 1 (AR (1)). Los datos de P₄ y E₂ fueron transformados a log y log-1 respectivamente. En las figuras se presentan datos no transformados.

$$\text{Modelo: } Y_{ijk} = \mu + G_i + D_j + (G \times D)_{ij} + O_k + \beta_{ms} + \epsilon_{ijk}$$

Donde:

μ : media global

G_i : Efecto del i-ésimo grupo

D_j : Efecto del j-ésimo día

$(G \times D)_{ij}$: Efecto de la interacción entre el i-ésimo grupo y el j-ésimo día (Efecto de interacción)

O_k : Efecto del k-ésimo oveja dentro de cada grupo

β_{ms} : covarianza medidas sucesivas del mismo animal

ϵ_{ijk} : error experimental

La tasa ovulatoria (1, 2 ó 3), concepción (0 ó 1), prolificidad (1, 2 ó 3) y fecundidad (0 a 3), fueron analizadas mediante el procedimiento Genmod de SAS (2001) luego de transformar los datos a log, asumiendo una distribución binomial (concepción) ó multinomial (tasa ovulatoria, prolificidad y fecundidad). Los efectos fijos fueron el grupo (PG y control), el Día (7, 30 y 60) y sus interacciones. Se consideró al inseminador como efecto aleatorio.

$$\text{Modelo: } Y_{ijk} = \mu + G_i + D_j + (G \times D)_{ij} + I_k + \epsilon_{ijk}$$

Donde:

μ : media global

G_i : Efecto del i-ésimo grupo

D_j : Efecto del j-ésimo día

$(G \times D)_{ij}$: Efecto de la interacción entre el i-ésimo grupo y el j-ésimo día (Efecto de interacción)

I_k : Efecto del k-ésimo inseminador

ϵ_{ijk} : error experimental

Para el estudio de las pérdidas embrionarias las ovejas fueron clasificadas en 10 categorías según sus parámetros reproductivos: 1) ovejas con TO= 1, prolificidad al Día 30 de gestación (P30)= 0 y prolificidad al Día 60 de gestación (P60)= 0; 2) TO= 1, P30= 1, P60= 0; 3) TO= 1, P30= 1, P60= 1; 4) TO= 2, P30= 0, P60= 0; 5) TO= 2, P30= 1, P60= 0; 6) TO= 2, P30= 1, P60=1; 7) TO= 2, P30= 2, P60= 0; 8) TO= 2, P30= 2, P60= 1; 9) TO= 2, P30= 2, P60= 2; 10) TO= 3, P30= 3, P60= 3. Las Pérdidas reproductivas fueron calculadas como: las ovejas que no tuvieron pérdidas (Retención Total -RT-) = igual TO que embriones en los Días 30 y 60; pérdidas embrionarias parciales (PP= mayor TO que embriones en el Día 30 (PP30) y 60 (PP60)); y pérdidas totales de embriones (PT=TO de 1 ó 2 y ausencia de los embriones en los Días 30 (PT30) ó 60 (PT60)). Se consideraron como efectos fijos a la categoría, grupo y sus interacciones. Todos los valores son presentados como medias \pm error estándar de la media.

$$\text{Modelo: } Y_{ij} = \mu + G_i + C_j + (G \times C)_{ij} + \epsilon_{ij}$$

Donde:

μ : media global

G_i : Efecto del i-ésimo grupo

C_j : Efecto del j-ésimo categoría

$(G \times C)_{ij}$: Efecto de la interacción entre el i-ésimo grupo y el j-ésimo categoría (Efecto de interacción)

ϵ_{ij} : error experimental

Las diferencias fueron consideradas como significativas cuando $P < 0.05$.

6. RESULTADOS

Concentraciones hormonales y desarrollo folicular

La concentración plasmática de P_4 fue inferior en el grupo PG entre el Día -6 y el Día 1 (Figura 4; $P < 0.05$); no observándose diferencias durante la fase luteal temprana (Día 2 a Día 6) (experimento I, Figura 4; $P > 0.05$). La evolución de los niveles de P_4 entre los Días -4 y -2 del grupo PG fue opuesto al del grupo Control. Mientras que en el grupo Control los niveles de P_4 fueron disminuyendo hacia el Día 0, el grupo PG presentó un incremento en sus niveles de P_4 hasta el Día -2 (Figura 4). Las concentraciones plasmáticas de P_4 no fueron estadísticamente diferentes entre los grupos los Días 0, 5, 12 y 17 (Figura 5; $P > 0.05$) (experimento II).

Las ovejas del grupo PG presentaron un mayor diámetro folicular en la última ecografía ($P < 0.05$); mayor diámetro máximo del FPO ($P = 0.053$), y una tendencia a una mayor tasa de crecimiento ($P = 0.08$) respecto al grupo Control (Cuadro III). Las diferencias en diámetro del FPO, no estuvieron asociadas a una mayor capacidad esteroidogénica (Figura 4; $P > 0.05$).

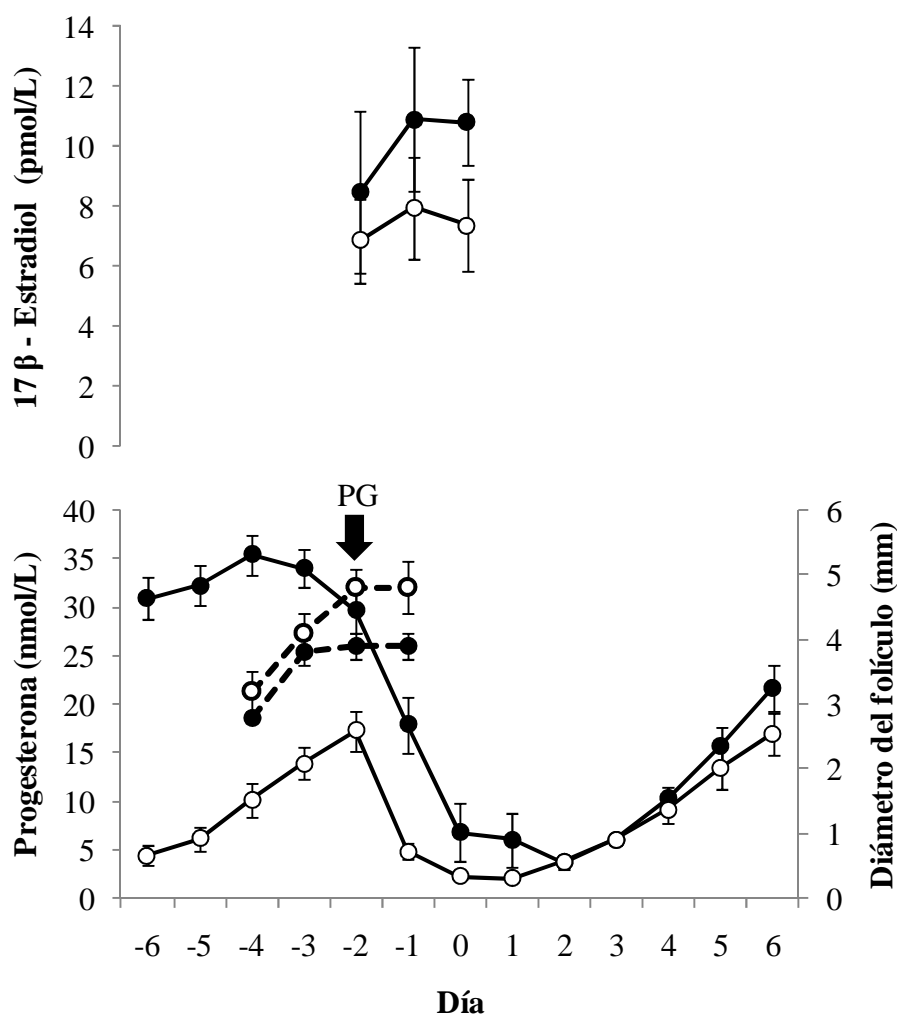


Figura 4. Concentración de progesterona plasmática (—, figura inferior) entre los Días -6 y 6; crecimiento del folículo preovulatorio (---); y concentración plasmática de 17 β - estradiol (—, figura superior) 48 hs previo a la inseminación artificial (Día 0), en ovejas sincronizadas con dos dosis de DL-cloprostenol administradas con una separación de siete días (protocolo Synchrovine®; ○ -grupo PG- n= 15) ó en estro espontáneo (● -grupo Control- n= 15). Los valores presentados corresponden a medias ± error estándar.

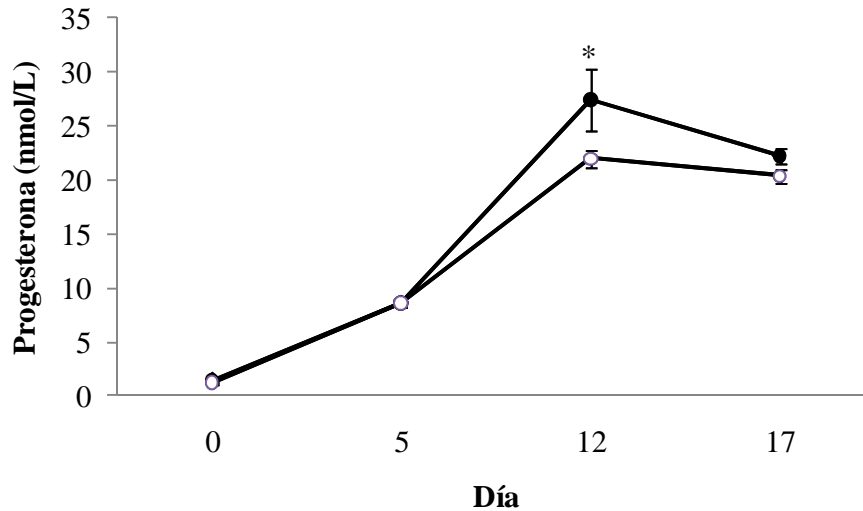


Figura 5. Concentración de progesterona plasmática en los Días 0 (n= 25 / grupo), 5, 12 y 17 (n= 57 / grupo), en ovejas sincronizadas con dos dosis de DL-cloprostenol separadas siete días (protocolo Synchrovine®; ○ -grupo PG-) ó en estro espontáneo (● -grupo Control-). Día 0 = inseminación artificial. Los valores presentados corresponden a medias \pm error estándar. * P= 0.24

Cuadro III: Características que definen el crecimiento del folículo preovulatorio determinado por ecografía transrectal, en ovejas sincronizadas con DL-cloprostenol (dos dosis separadas siete días, “protocolo Synchrovine®” -grupo PG- n= 15), y ovejas en estro espontáneo (grupo Control, n= 15).

Folículo preovulatorio	PG	Control	P
Día de emergencia	-3.0 \pm 0.4	-3.0 \pm 0.3	0.96
Diámetro a la emergencia (mm)	2.8 \pm 0.1	2.7 \pm 0.1	0.26
Día de máximo diámetro	1.8 \pm 0.3	1.8 \pm 0.3	0.98
Máximo diámetro del folículo preovulatorio (mm)	5.2 \pm 0.5 ^a	4.0 \pm 0.2 ^b	0.053
Diámetro en la última ecografía (mm)	4.8 \pm 0.4 ^a	3.9 \pm 0.2 ^b	0.04
Tasa de crecimiento (mm/día)	1.2 \pm 0.3	0.7 \pm 0.1	0.08
Vida media (días)	3.0 \pm 0.4	2.6 \pm 0.3	0.42

El día de la emergencia fue analizado retrospectivamente desde el día de la inseminación artificial (Día 0). Las demás variables que caracterizan al folículo preovulatorio fueron analizadas respecto a la emergencia como punto de partida. Los datos son presentados como medias \pm error estándar.

Tasa Ovulatoria, tasa de colecta, fertilización y calidad embrionaria.

Se observó una disminución de la TO en las ovejas del grupo PG (1.37 \pm 0.58) respecto al Control (1.61 \pm 0.59; P<0.059) en el experimento II; pero la

diferencia no alcanzó significancia estadística en el experimento I (1.53 ± 0.7 vs. 1.79 ± 0.4 , grupos PG y Control respectivamente, $P > 0.05$).

La tasa de colecta embrionaria (estructuras colectadas/CL observados *100) fue menor ($P = 0.08$) para el grupo PG (39%, 9/23) respecto al grupo Control (64% 16/25). Ambos grupos presentaron una elevada tasa de fertilización (embriones/total de estructuras embrionarias recuperadas, 93.3%; $P > 0.05$).

El 80% de las estructuras colectadas correspondieron a embriones de 4,5 a 6,5 días de edad (mórula compacta y blastocito), mientras el restante 20% se encontraba en estadios retrasados al momento del lavado (Día 7 del ciclo estral).

En cuanto a la calidad de las estructuras embrionarias colectadas, se observa que el 52% de ellas fueron calificadas como excelentes a buenas (grado 1 y 2) y el 48% restante con defectos morfológicos, degeneradas o muy retrasadas (grado 3 y 4). El porcentaje de embriones de calidad transferible (calidad 1 y 2 acumulados) fue mayor pero no estadísticamente diferente en el grupo Control respecto al grupo PG (63 vs. 27 %, $P = 0.15$) (Cuadro IV).

Cuadro IV: Calidad embrionaria subjetiva obtenida en ovejas sincronizadas con el protocolo Synchrovine® (dos dosis de DL-cloprostenol separadas siete días e IATF, grupo PG) y ovejas en estro espontáneo (grupo Control).

	Calidad embrionaria				Total embriones
	1	2	3	4	
Control (n= 15)	7	3	4	2	16
PG (n= 15)	1	2	5	1	9

Calidad embrionaria subjetiva: 1: excelente; 2: bueno; 3: pobre; 4: degenerado ó atrasado. Los datos son presentados son frecuencias.

Concepción, prolificidad y fecundidad

Como se observa en la Cuadro V, la concepción, prolificidad y fecundidad obtenida en los Días 30 y 60 fueron inferiores en ovejas del grupo PG respecto al grupo Control ($P < 0.05$).

La tasa de concepción de las ovejas del grupo PG que demostraron (80/130; 61.5%) vs. las que no demostraron comportamiento estral (7/15; 46.6%; $P = 0.4$) fue similar. El porcentaje de ovejas del grupo PG que demostró comportamiento estral al momento de la IA fue de 86.6%.

Cuadro V: Concepción (ovejas gestantes/ovejas inseminadas*100), prolificidad (embriones/oveja gestante) y fecundidad (embriones/total de ovejas por grupo), obtenida en ovejas sincronizadas con dos dosis de DL-cloprostenol separadas siete días e IATF (protocolo Synchrovine®; grupo PG) y ovejas en estro espontáneo (grupo Control); a los 30 y 60 días de la inseminación artificial (Día 0).

	Ecografía Día 30		Ecografía Día 60	
	Control	PG	Control	PG
Concepción	88 ^a (64/73)	63 ^b (85/135)	85 ^a (62/73)	62 ^b (84/135)
Prolificidad	1.58 ^a (101/64)	1.27 ^b (108/85)	1.50 ^a (93/62)	1.25 ^b (105/84)
Fecundidad	1.38 ^a (101/73)	0.8 ^b (108/135)	1.27 ^a (93/73)	0.78 ^b (105/135)

^a vs. ^b: $P < 0.05$. Los datos de concepción son presentados como porcentaje; prolificidad y fecundidad son presentados como medias.

Las pérdidas reproductivas totales (TO vs. prolificidad al Día 60 de gestación) fueron similares entre ambos grupos durante el período de estudio. No obstante, existió una tendencia a mayores pérdidas embrionarias totales al Día 30 en el grupo PG ($P=0.08$; Cuadro VI). No se encontraron diferencias significativas cuando comparamos las pérdidas reproductivas dentro de cada grupo en los diferentes momentos de evaluación (entre los Días 7 a 30 y 7 a 60, $P > 0.05$) (Cuadro VI). Sin embargo, se identificó una pérdida total superior de gestaciones dobles al Día 30 en el grupo PG (8/23 vs. 4/41, PG vs. Control respectivamente; $P < 0.05$).

Las pérdidas reproductivas ocurridas entre los Días 17 a 30 de gestación, evaluadas como ovejas con P4 alta al Día 17 pero no gestantes al Día 30, fueron similares para el grupo PG (2.7 % (1/37)) y el grupo Control (4.1 % (2/49); $P > 0.05$). En el mismo sentido, la magnitud de la disminución en la tasa de concepción entre los Días 30 y 60 fue similar entre grupos (1.6% vs. 3.4%, PG vs. Control respectivamente; Cuadro V).

Cuadro VI: Pérdidas reproductivas en frecuencias y en porcentaje (entre paréntesis), en ovejas sincronizadas con DL- cloprostenol (dos dosis administradas con una separación de siete días e IATF; protocolo Synchrovine®, grupo PG) y ovejas en estro espontáneo (grupo Control).

	PP30	PP 30 - PT60	PP 60	PT30	PT60	PT
Control (n= 57)	11 (19)	1 (2)	4 (7)	8 (14) ^x	0 (0)	24 (42)
PG (n= 57)	7 (12)	0 (0)	1 (2)	18 (32) ^y	1 (2)	27 (47)

^x vs. ^y; $P = 0.08$. PP (pérdidas reproductivas parciales) = mayor TO que embriones a los Días 30 (PP30) y 60 (PP60), ó disminución en el número de embriones/fetos entre Día 30 a Día 60 (PP 30 - PT60); PT (pérdidas reproductivas totales) = TO de 1, 2 ó 3 y ausencia de embriones / fetos en Día 30 (PT30) ó 60(PT60).

Tono Uterino

Las ovejas del grupo PG (2.1 ± 0.04) tuvieron un tono uterino significativamente más bajo respecto a las ovejas del grupo Control (2.3 ± 0.04 ; $P < 0.05$).

7. DISCUSIÓN

La hipótesis de que la sincronización de estros con el Protocolo Synchronvine® no generaría disminución de la TO, pero sí disminuiría la capacidad esteroidogénica del FPO, y la producción de P_4 por el nuevo CL; generando una menor calidad embrionaria y determinando mayores pérdidas reproductivas respecto a ovejas en estro espontáneo, no fue aceptada. La sincronización de estros con $PGF2\alpha$ indujo una reducción en los niveles plasmáticos de P_4 durante el desarrollo del FPO, afectando su tasa de crecimiento y diámetro final, determinando una reducción en la TO. Además, las ovejas del grupo PG presentaron menor concepción, prolificidad y fecundidad, siendo las pérdidas reproductivas similares respecto a ovejas en estro espontáneo.

En el presente estudio, las ovejas del grupo PG presentaron una disminución en la TO comparada con ovejas en estro espontáneo (grupo Control). Nuestros hallazgos no coinciden con los reportados por Houghton et al. (1995), quienes observaron que la TO no se alteraba con la utilización de un protocolo de una dosis de $PGF2\alpha$ (dos inyecciones administradas con una separación de tres hs). Se ha descrito que la luteolisis inducida por la $PGF2\alpha$ podría afectar el ritmo endógeno de la FSH, alterando las características de los folículos desde su origen (Barrett et al. 2002; Liu et al. 2006). Barrett et al. (2002), describen que 30% de las ovulaciones inducidas por un protocolo de doble dosis de $PGF2\alpha$ no fueron seguidas por la formación de un nuevo CL, cuando la primera dosis fue administrada en la fase luteal temprana. Rubianes et al. (2003) determinaron que un protocolo de doble dosis de $PGF2\alpha$ efectivamente induce la ovulación, la cual fue determinada mediante la desaparición del folículo ovulatorio. Sin embargo, estos autores no evaluaron la TO a través del número de CLs desarrollados posterior a la ovulación. En el presente trabajo la TO fue determinada mediante la evaluación del número de CLs presentes siete días luego de la IA, y los FPOs fueron evaluados retrospectivamente desde la última ecografía hacia el día de la emergencia. Nuestro diseño no permite descartar la posibilidad de un patrón de FSH alterado que haya afectado el reclutamiento folicular, la sensibilidad del folículo a la LH ó la existencia de un pico alterado de LH que haya afectado la ovulación y formación del nuevo CL. Sin embargo, podemos relacionar la menor TO con el perfil de crecimiento del FPO.

El FPO de las ovejas del grupo PG creció más rápido y alcanzó un mayor diámetro final. Estos resultados están en contraposición con reportes previos donde describen un tamaño similar (Nephew et al. 1991), o menor (Houghton et al. 1995) de los folículos ovulatorios de ovejas sincronizadas con $PGF2\alpha$. Es conocido que un folículo de mayor tamaño produce mayores cantidades de E_2 , generando una mayor inhibición de los niveles de FSH, lo cual reduce la capacidad de otros folículos de llegar al estado de preovulatorio, (Baird 1983; Souza et al. 1997; 1998); ejerciendo

un mayor efecto de dominancia sobre los otros folículos de la misma onda de desarrollo, y determinando una reducción en la cuota ovulatoria (Baird 1983). Además, la fase final de crecimiento de los folículos depende de la frecuencia de pulsos de LH, la cual es regulada por los niveles de P_4 . A pesar de que los niveles de LH no fueron evaluados en éste trabajo, los bajos niveles de P_4 observados podrían explicar indirectamente el mayor desarrollo del FPO en las ovejas sincronizadas con $PGF2\alpha$.

Se ha descrito que folículos que se desarrollan en ambientes con concentraciones sub-luteales de P_4 son más grandes, su vida media es mayor y producen más E_2 (Sirois & Fortune, 1990; Stock & Fortune 1993; Viñoles et al. 1999; 2001). Sin embargo, el mayor diámetro del FPO de las ovejas del grupo PG no estuvo asociado a mayores concentraciones plasmáticas de E_2 . Posiblemente la frecuencia de sangrado no fue la adecuada para determinar las concentraciones de E_2 con exactitud. Por otro lado, las ovejas del grupo PG mostraron menor tono uterino al momento de la IA respecto a ovejas del grupo Control, resultado que podría ser explicado por los hallazgos de White et al. (1987), quienes observaron que folículos inducidos a ovular luego de una $PGF2\alpha$ producen menos E_2 . Para dilucidar esta aparente contradicción son necesarios trabajos a futuro, aumentando la frecuencia de sangrados para medir las concentraciones circulantes de E_2 , y estudios a nivel folicular para evaluar su capacidad esteroidogénica y sensibilidad a las gonadotrofinas.

Las ovejas sincronizadas con $PGF2\alpha$ (grupo PG) presentaron menores niveles de P_4 durante la fase de crecimiento del FPO, y los perfiles de P_4 fueron opuestos a los del grupo Control. Es sabido que la primer onda de desarrollo folicular emerge en un ambiente donde las concentraciones de P_4 están incrementándose (Ginther et al. 1995; Bartlewski et al. 1999a, b; Evans et al. 2000). El ambiente hormonal fue opuesto para las ovejas del grupo Control, ya que se encontraban en fase luteal tardía; etapa en la que se inicia un proceso de disminución de la P_4 circulante (Ginther et al. 1995; Evans et al. 2000). La P_4 regula la frecuencia de pulsos de LH, que es clave en las etapas finales de crecimiento y maduración folicular (Acritopoulou et al. 1977; Parfet et al. 1989; Bartlewski et al. 2000). Sugerimos que los bajos niveles de P_4 inducidos por la sincronización con $PGF2\alpha$ favorecieron el desarrollo de un solo folículo, opuesto a la situación en las ovejas del grupo Control.

El presente experimento confirma que la luteolisis inducida determinó la formación de un CL con vida media y capacidad de producir P_4 normales; resultados previamente reportados por Acritopoulou et al. (1977), pero opuestos a lo observado por White et al. (1987) y Liu et al. (2006). Sin embargo, Bartlewski et al. (1999b, c, d) señalan que CLs normales y alterados pueden coexistir en diferentes ovarios ó dentro del mismo ovario en la oveja. En el presente experimento, los niveles plasmáticos de P_4 durante la fase luteal temprana fueron similares entre grupos. Por lo tanto, si coexistieran CL normales y alterados, esto no afecta la concentración promedio de P_4 por oveja, y por lo tanto no sería el origen de pérdidas reproductivas cuando las ovejas son sincronizadas con $PGF2\alpha$.

La concepción obtenida por las ovejas sincronizadas con $PGF2\alpha$ fue inferior respecto a ovejas en estro espontáneo. Bajas concentraciones de P_4 durante la fase luteal del ciclo estral previo al servicio (Folman et al. 1973), y en el período peri –

ovulatorio (Día 0 y 1; Ashworth et al. 1989), han sido asociadas a disminución de la fertilidad, lo cual concuerda con los perfiles hormonales observados en éste estudio. Se podría especular que la baja fertilidad de ovejas sincronizadas con PGF2 α , podría deberse a que muchas fueron inseminadas a tiempo fijo, antes de que manifestaran comportamiento estral. Sin embargo, en concordancia con reportes previos (Olivera et al. 2004b; Rubianes et al. 2004), las ovejas inseminadas a tiempo fijo que manifestaron o no estro, tuvieron una tasa de concepción similar.

La menor prolificidad en los Días 30 y 60 de gestación obtenida en éste experimento por el grupo PG respecto al grupo Control, coincide con reportes previos (Forichi et al. 2004); y se explica por la baja TO y la mayor pérdida de mellizos observados en el grupo PG. Considerando que los niveles plasmáticos de P₄ en el periodo peri - ovulatorio, están positivamente asociados a la sobrevivencia embrionaria (Ashworth et al. 1989), es posible que los bajos niveles en el grupo PG expliquen las mayores pérdidas de mellizos. En vacas, los folículos que se desarrollan en un ambiente de bajos niveles de P₄ ovulan un oocito que tiene la capacidad de ser fertilizado, pero el desarrollo embrionario es alterado, resultando en una menor fertilidad al Día 35 luego de la IA (Gustafsson & Ploen, 1986). Sin embargo, los resultados de prolificidad están en contraposición con los obtenidos por Fierro et al. (2007), quienes obtuvieron una prolificidad similar al grupo Control. Los mencionados resultados podrían estar determinados por el biotipo utilizado en esos experimentos. Mientras en el presente trabajo y en los realizados por Forichi et al. (2004), se utilizaron ovejas raza Corriedale y ovejas Corriedale cruza con biotipos carniceros, respectivamente; Fierro et al. (2007) utilizaron ovejas raza Merino Australiano. Quizás la depresión en TO sea evidente cuando la PGF2 α se utiliza en razas y/o biotipos con TO potencialmente mayor.

En el presente estudio, la calidad de los embriones obtenidos 7 días pos-ovulación no fue afectada por el tratamiento con PGF2 α , resultados que concuerdan con los obtenidos por Trounson et al. (1976). Sin embargo, los mencionados autores evaluaron embriones obtenidos por tratamientos que asociaban PGF2 α y eCG, respecto a ovejas tratadas solo con PGF2 α , sin un grupo de ovejas en estro espontáneo. Cabe destacar que en este experimento se colectó un bajo número de embriones, lo que disminuye la probabilidad de encontrar diferencias significativas. Además, las ovejas del grupo PG perdieron más gestaciones dobles al Día 30, comparadas con las ovejas del grupo Control. Esto nos permite especular que la capacidad de desarrollo de esos embriones podría haberse alterado luego del Día 7, independientemente de la existencia de niveles apropiados de P₄ en los Días 12 y 17, que haya provocado fallas en el reconocimiento materno de la gestación (deNicolo et al. 2009).

La menor tasa de colecta embrionaria en ovejas sincronizadas con PG ha sido reportada previamente por Schiewe et al. (1990), quienes la asocian con la generación de CLs que regresan tempranamente. La menor tasa de recuperación podría también estar relacionada con el menor tono uterino observado en las ovejas sincronizadas con PGF2 α . Si la contractilidad del oviducto está igualmente disminuida, podría determinar fallas en el transporte de los oocitos, y/o semen y/o embriones hacia el útero (Barrière et al. 2002). Una explicación alternativa, es que en las ovejas del grupo Control se recuperaron más embriones porque la TO fue superior (Ramon et al. 1991). Si asumimos que los embriones recuperados y las

estructuras no recuperadas mantuvieron la misma tasa de fertilización, entonces ésta fue similar entre grupos, resultados que no concuerdan con reportes previos (Boland et al. 1978a, b). Dado que el diseño experimental no es el adecuado para extraer una conclusión al respecto, se requieren más estudios, realizando lavados del oviducto en diferentes momentos desde la ovulación al Día 7, para evaluar las causas de la menor tasa de concepción en ovejas sincronizadas con PGF2 α .

8. CONCLUSIONES

Las pérdidas reproductivas en ovejas sincronizadas con dos dosis de PGF2 α administradas en un intervalo de siete días e inseminadas a tiempo fijo (protocolo Synchrovine®), estuvieron asociadas a un ambiente uterino dominado por bajas concentraciones de P₄ durante el período de crecimiento del folículo preovulatorio, determinando una mayor tasa de crecimiento y mayor diámetro de ese folículo. Estos hallazgos se asociaron con una menor TO, concepción, prolificidad y fecundidad. La sincronización con PGF2 α no aumentó las pérdidas reproductivas desde la IA hasta el Día 60.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Abecia JA, Forcada F, Lozano JM. (1999). A preliminary report on the effect of dietary energy on prostaglandin F-2 alpha production in vitro, interferon-tau synthesis by the conceptus, endometrial progesterone concentration on days 9 and 15 of pregnancy and associated rates of embryo wastage in ewes. *Theriogenology* 52: 1203-1213.
2. Abecia JA, Sosa C, Forcada F, Meikle A. (2006). The effect of undernutrition on the establishment of pregnancy in the ewe. Review. *Reprod Nutr Dev* 46: 367-378.
3. Acritopoulou S, Haresign W, Foster JP, Lamming GE. (1977). Plasma progesterone and LH concentrations in ewes after injection of an analogue of prostaglandin F-2 α . *J Reprod Fertil* 49: 337-340.
4. 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.
5. Adams GP. (1999). Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *J Reprod Fertil* 54: 17-32.
6. Ali A, Hayder M. (2008). Seasonal variation of reproductive performance, foetal development and progesterone concentrations of sheep in the subtropics. *Reprod Dom Anim* 43(6): 730-734.
7. Allison AJ. (1982). Techniques of modifying reproductive performance. En: *Sheep Production: Vol 1. Breeding and Reproduction*. Ed. Wickham GA and McDonald MF. Primera edición. Ray Richards Publisher and the New Zealand Institute of the Agricultural Science. Cap. 10, pp. 239-263.
8. Alliston CW, Ulberg LC. (1961). Early Pregnancy loss in sheep at ambient temperatures of 70° and 90° F as determined by embryo transfer. *J Anim Sci* 20: 608-613.
9. Ashworth CJ, Sales DI, Wilmut I. (1989). Evidence of an association between the survival of embryos and the periovulatory plasma progesterone

- concentration in the ewe. *J Reprod Fertil* 87(1): 23-32.
10. Baird DT. (1983). Factors regulating the growth of the pré ovulatory follicle in the sheep and human. *J Reprod Fertil* 69: 343-352.
 11. Baril G, Remy B, Leboeuf B, Beckers JF, Saumande J. (1996). Synchronization of oestrus in goats: the relationship between eCG binding in plasma, time occurrence of oestrus and fertility following artificial insemination. *Theriogenology* 45: 1553-1559.
 12. 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.
 13. Barrière P, Thibault E, Jean M. (2002). Role de la trompe dans la fécondation. *Rev Prat* 52(16): 1757-1761.
 14. Bartlewski PM, Beard AP, Cook SJ, Rawlings NC. (1998). Ovarian follicular dynamics during anoestrus in ewes. *J Reprod Fertil* 113: 275-285.
 15. Bartlewski PM, Beard AP, Cook SJ, Chandolia RK, Honaramooz A, Rawlings NC. (1999a). Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. *J Reprod Fertil* 115: 111-124.
 16. Bartlewski PM, Beard AP, Rawlings NC. (1999b). An ultrasonographic study of luteal function in breeds of sheep with different ovulation rates. *Theriogenology* 52: 115-130.
 17. Bartlewski PM, Beard AP, Rawlings NC. (1999c). Ovarian function in ewes during the transition from breeding season to anoestrus. *Anim Reprod Sci* 57: 51-66.
 18. Bartlewski PM, Beard AP, Rawlings NC. (1999d). Ovarian function in ewes at the onset of the breeding season. *Anim Reprod Sci* 57: 67-88.
 19. Bartlewski PM, Beard AP, Rawlings NC. (2000). An ultrasound –aided study of temporal relationship between the patterns of LH/FSH secretion, development of ovulatory-sized antral follicle and formation of corpora lutea in ewes. *Theriogenology* 54: 229-245.
 20. Bartlewski PM, Duggavathi R, Aravindakshan J, Barrett DMW, Cook SJ, Rawlings NC. (2003). Effects of a 6-day treatment with medroxyprogesterone acetate after prostaglandin F₂ α induced luteolysis at midcycle on antral follicular development and ovulation rate in no prolific Western White-Faced ewes. *Biol Reprod* 68: 1403-1412.
 21. Bell AW, McBride BW, Slepetic R, Early RJ, Currie WB. (1989). Chronic heat stress and prenatal development in sheep. I. Conceptus growth and maternal plasma hormones and metabolites. *J Anim Sci* 67: 3289-3299.
 22. Boland MP, Gordon IR, Kelleher DL. (1978a). The effect of treatment by prostaglandin analogue (ICI-80996) or progestagens (SC-9880) on ovulation and fertilization in cyclic ewes. *J Agric Sci Cambridge* 91: 727-730.
 23. Boland MP, Lemainque F, Gordon IR. (1978b). Comparison of lambing outcome in ewes after synchronization of oestrus by progestagens or prostaglandin treatment. *J Agric Sci Cambridge* 91: 765-766.
 24. Bottaro M. (2009). IATF en ovinos con semen refrigerado por 24 hs: comparación biológica y económica de protocolos de sincronización estral. Tesis de Grado. Facultad de Veterinaria, Paysandú, Uruguay.
 25. Campbell BK, Dobson H, Baird DT, Scaramuzzi RJ. (1999). Examination of the relative role of FSH and LH in the mechanism of ovulatory follicle selection in sheep. *J Reprod Fertil* 117: 355-367.

26. Cárdenas H, Wiley TM, Pope WP. (2004). Prostaglandin F_{2α}-induced estrus in ewes exhibiting estrous cycles of different duration. *Theriogenology* 62: 123-129.
27. Cognié Y, Mariana JC, Thimonier J. (1970). Etude du moment d'ovulation chez la brebis normale ou traitée par un progestagène associé ou non à une injection de PMSG. *Ann Biol Anim Bioch Biophys* 10: 15-24.
28. Colas G, Thimonier J, Courot M, Ortatav R. (1973). Fertilité, prolificité et fécondité pendant la saison sexuelle des brebis inseminées artificiellement après traitement à l'acétate de fluorogestone. *Ann Zootech* 22: 441-451.
29. Colas G, Brice G, Guérin Y. (1974). Acquisitions récentes en matière d'insemination artificielle ovine. *Bull Tech Inf Minist Agric* 294: 795-800.
30. Conley AJ, Kaminski MA, Dubowsky SA, Jablonka-Shariff A, Redmer DA, Reynolds LP. (1995). Immunohistochemical localization of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and P450 17 alpha-hydroxylase during follicular and luteal development in pigs, sheeps and cows. *Biol Reprod* 52: 1081-1094.
31. 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.
32. Correa MN. (2006). Inseminación a tiempo fijo de ovejas sincronizadas con dos dosis de PGF_{2α} separadas 7 días con o sin GnRH. Tesis de Grado. Facultad de Veterinaria, Paysandú, Uruguay.
33. Davies KL, Barlewski PM, Epp T, Duggavathi R, Barrett DMW, Bagu ET, Cook SJ, Rawlings NC. (2006). Does injection of prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) cause ovulation in anestrous Western White Face ewes?. *Theriogenology* 66: 251-259.
34. Davis AJ, Fleet IR, Harrison FA, Walker FMM. (1980). Pulmonary metabolism of prostaglandin F_{2a} in the conscious non-pregnant ewe and sow. *J Physiol* 301: 86.
35. Deligiannis C, Valasi I, Rekkas CA, Goulas P, Theodosiadou E, Lainas T, Amiridis GS. (2005). Synchronization of Ovulation and Fixed Time Intrauterine Insemination in Ewes. *Reprod Dom Anim* 40: 6-10.
36. deNicolo G, Parkinson TJ, Kenyon PR, Morel PCH, Morris ST. (2009). Plasma progesterone concentrations during early pregnancy in spring- and autumn-bred ewes. *Anim Reprod Sci* 111: 279-288.
37. Diskin MG, Morris DG. (2008). Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reprod Dom Anim* 43(2): 260-267.
38. Dixon AB, Knights M, Winkler JL, Marsh DJ, Pate JL, Wilson ME, Dailey RA, Seidel G, Inskeep EK. (2007). Patterns of late embryonic and fetal mortality and association with several factors in sheep. *J Anim Sci* 85: 1274-1284.
39. Dobson H, Ghuman S, Prabhakar S, Smith R. (2003). A conceptual model of the influence of stress on female reproduction. *Reproduction* 125: 151-163.
40. Doney JM, Gunn RG, Griffiths JG. (1973). The effect of pre-mating stress on the onset of oestrus and ovulation rate in Scottish Blackface ewes. *J Reprod Fertil* 35: 381-384.
41. 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: 207-215.

42. Drion PV, Furtoss V, Baril G, Manfredi E, Bouvier F. (2002). Four years of induction/synchronization of estrus in dairy goats: effect of the evolution of the eCG binding rate in relation with the parameters of reproduction. *Reprod Nutr Dev* 31: 401-412.
43. Duggavathi R, Janardhan K, Singh J, Singh B, Barrett DMW, Davies KL, Bagu ET, Rawlings NC. (2006). Patterns of expression of steroidogenic enzymes during the first wave of the ovine estrous cycle as compared to the preovulatory follicle. *Anim Reprod Sci* 91: 345-352.
44. Durán del Campo A. (1980). *Anatomía, Fisiología de la Reproducción e Inseminación Artificial en Ovinos*. Ed. Hemisferio Sur. Uruguay.
45. Dutt RH. (1954). Fertility rate and embryonic death loss in ewes early in the breeding season. *J Anim Sci* 13: 464-473.
46. Dutt RH. (1963). Critical Period for Embryo Mortality in ewes exposed to high ambient temperature. *J Anim Sci* 22: 713-719.
47. Dutt RH, Earl F, Ellington EF, William W, Carlton. (1959). Fertilization rate and early embryo survival in sheared and unsheared ewes following exposure to elevated air temperature. *J Anim Sci* 18: 1308-1318.
48. Early RJ, McBride BW, Vatnick I, Bell AW. (1991). Chronic heat stress and prenatal development in sheep: II. Placental cellularity and metabolism. *J Anim Sci* 69: 3610-3616.
49. Espey LL. (1980). Ovulation as an inflammatory reaction-a hypothesis. *Biol Reprod* 22: 73-106.
50. Evans G, Maxwell WMC. (1987). Collection of semen; Handling and examination of semen. En: Salamon's *Artificial Insemination of Sheep and Goats*. Ed. Butterworths, pp.85-104.
51. Evans ACO, Duffi P, Hynes N, Boland MP. (2000). Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. *Theriogenology* 53: 699-715.
52. Evans ACO, Flynn JD, Quinn KM, Duffi P, Quinn P, Madgwick S, Crosby TF, Boland MP, Beard AP. (2001). Ovulation of aged follicles does not affect embryo quality of fertility after a 14-day progestagen estrus synchronization protocol in ewes. *Theriogenology* 56: 923-936.
53. Evans ACO, Flynn JD, Duffi P, Knight PG, Boland MP. (2002). Effects of ovarian follicle ablation on FSH, oestradiol and inhibin A concentrations and growth of other follicles in sheep. *Reproduction* 123: 59-66.
54. Fernández Abella D. (1993). *Principios de Fisiología Reproductiva Ovina*. Ed. Hemisferio Sur. Uruguay.
55. Fernández Abella D, Castells D, Piaggio L, Deleón N. (2006a). Estudio de la mortalidad embrionaria y fetal en ovinos I. Efecto de distintas cargas parasitarias y su interacción con la alimentación sobre las pérdidas embrionarias y la fecundidad. *Producción Ovina* 18: 25-31.
56. Fernández Abella D, Hernández Z, Villegas N. (2006b). Effect of gastrointestinal nematodes on ovulation rate of merino Booroola heterozygote ewes ($Fec^B Fec^+$). *Anim Res* 55: 545-550.
57. Fernández Abella D, Formoso D. (2007). Estudio de la mortalidad embrionaria y fetal en ovinos II. Efecto de la condición corporal y de la dotación sobre las pérdidas embrionarias y fetales. *Producción Ovina* 19: 5-13.
58. Fernández Abella D, Formoso D, Goicoechea I, Locatelli A, Scarlato S, Ibañez W, Irabuena O. (2007). Estudio de la mortalidad embrionaria y fetal en ovinos III. Efecto de la asignación de forraje y de un estrés pluviométrico.

- artificial sobre la tasa ovulatoria y pérdidas reproductivas en ovejas Corriedale. *Producción Ovina* 19: 15-23.
59. Fernández Abella D, Folena G, Formoso D, Irabuena, O. (2008a). Estudio de la mortalidad embrionaria y fetal en ovinos. IV. Efecto del estrés pluviométrico artificial y natural sobre la actividad ovárica y las pérdidas reproductivas. *Producción Ovina* 20: 21- 29.
 60. Fernández Abella D, Formoso D, Aguerre JJ, Hernández Z, Buzoni G, Galli C, Varela JP, Fernández S. (2008b). Efecto del tipo y la oferta de forraje y carga parasitaria previo al servicio sobre la tasa ovulatoria y fecundidad de ovejas Corriedale. *Producción Ovina* 20: 31-40.
 61. Fernandez-Moro D, Veiga-Lopez A, Ariznavarreta C, Tresguerres JAF, Encinas T, Gonzalez-Bulnes A. (2008). Preovulatory Follicle Development in Goats Following Oestrous Synchronization with Progestagens or Prostaglandins. *Reprod Dom Anim* 43: 9-14.
 62. Fierro S, Olivera J, Gil J. (2007). Inseminación artificial a tiempo fijo con semen fresco y refrigerado en ovinos con el protocolo Synchrovine®. XXXV Jornadas Uruguayas de Buiatría. 7 al 9 de junio. Paysandú, Uruguay. P- 334-335.
 63. Fleming JA, Choi Y, Johnson GA, Spencer TE, Bazer FW. (2001). Cloning of the ovine estrogen receptor-alpha promoter and functional regulation by ovine interferon-tau. *Endocrinology* 142: 2879-2887.
 64. Folman Y, Rosenber M, Herz Z, Davidson M. (1973). Relationship between plasma progesterone concentration and conception in postpartum dairy cows maintained on 2 levels of nutrition. *J Reprod Fertil* 34: 267-278.
 65. Forichi S. (2003). Comparación entre dos protocolos de sincronización de celos en base a PGF2 alfa en ovejas Corriedale. Tesis de Grado. Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay.
 66. Forichi S, Olivera J, Correa M, Gil J, Menchaca A, Rubianes E. (2004). Reproductive response to two different oestrus synchronisation protocols using PGF2 α in sheep. *Reprod Fert and Dev* 16(4): 506.
 67. Fortune JE, Quirk SM. (1988). Regulation of steroidogenesis in bovine preovulatory follicles. *J Anim Sci* 66(2): 1-8.
 68. Fossati F, Martincorena M, Regusci R. (2008). IATF en ovinos con semen fresco: comparación biológica y económica de protocolos de sincronización estral. Tesis de Grado. Facultad de Veterinaria, Paysandú, Uruguay.
 69. García-Palencia P, Sánchez MA, Nieto A, Vilar MP, González M, Veiga-Lopez A, González-Bulnes A, Flores JM. (2007). Sex steroid receptor expression in the oviduct and uterus of sheep with estrus synchronized with progestagen or prostaglandin analogues. *Anim Reprod Sci* 97: 25-35.
 70. Gil J, Olivera J, Menchaca A, Rubianes E. (2004). Effect of GnRH associated with the application of Timed Artificial Insemination in ewes. *Reprod Fert Dev* 16(4): 507.
 71. Gil J, Olivera J, Fierro S, Durán G, Gamarra J, Teixeira V, Araújo A, Stoletniy G. (2006). Inseminación intrauterina con semen congelado en majadas Merino Fino: comparación de protocolos de sincronización estral. INIA Tacuarembó. Serie de Actividades de Difusión 475. Capítulo 3.
 72. Ginther OJ. (2000). Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Anim Reprod Sci* 60-61: 61-79.
 73. 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: 689-703.
74. Ginther OJ, Wiltbank MC, Fricke PM, Gibbons JR, Kot K. (1996). Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol Reprod* 55: 1187-1194.
 75. Gonzalez-Bulnes, A, Santiago-Moreno J, Garcia-Garcia RM, del Campo A, Gomez-Brunet A, Lopez-Sebastian A. (2001). Origin of the preovulatory follicle in Mouflon sheep (*Ovis gmelini musimon*) and effect on the growth of remaining follicles during the follicular phase of oestrous cycle. *Anim Reprod Sci* 65: 265-272.
 76. 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.
 77. Gonzalez - Bulnes A, Lopez - Veiga 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.
 78. Gordon I. (1999). Fixed-time sheep artificial insemination. En "Controlled Reproduction in Sheeps and Goats". Ed. I. Gordon. CAB International Press: Wallingford, UK. Cap 3, pp.86-109.
 79. Griffiths JG, Gunn RG, Doney JM. (1970). Fertility in Scottish Blackface ewes as influenced by climatic stress. *J Agric Sci Camb* 75: 485-488.
 80. Gunn R, Doney J. (1973). The effects of nutritional and rainfall at the time of mating on the reproductive performance of ewe. *J Reprod Fert Suppl* 19: 253-258.
 81. Gustafsson H, Ploen L. (1986). The morphology of 16 and 17 day old bovine blastocysts from virgin and repeat breeder heifers. *Anat Histol Embryol* 15: 277-287.
 82. Hackett AJ, Langford GA, Robertson HA. (1981). Fertility of ewes after synchronisation of oestrus with a prostaglandin F_{2α} and artificial insemination. *Theriogenology* 15: 599-603.
 83. Hawk HW. (1973). Uterine Motility and Sperm Transport in the Estrous Ewe after Prostaglandin Induced Regression of Corpora Lutea. *J Anim Sci* 37: 1380-1385.
 84. Hawk HW, Conley HH. (1972). Investigation of sperm transport failures in ewes administered synthetic progestagen. *J Anim Sci* 34(4): 609-613.
 85. Hawk HW, Cooper BS, Pursell VG. (1981). Increased sperm death in the cervix and uterus of estrous ewes after regulation of estrus with prostaglandin or progestagen. *J Anim Sci* 52: 601-610.
 86. Hawken PAR, Beard AP, Esmaili T, Kadokawa H, Evans ACO, Blache D, Martin GB. (2007). The introduction of ram induces an increase in pulsatile LH secretion in cyclic ewes during the breeding season. *Theriogenology* 68: 56-66.
 87. Hixon JE, Flint AP, (1987). Effects of a luteolytic dose of oestradiol benzoate on uterine oxytocin receptor concentrations, phosphoinositide turnover and prostaglandin F-2 alpha secretion in sheep. *J Reprod Fertil* 79: 457-467.
 88. Houghton JAS, Liberati N, Schrick, FN, Townsend EC, Dailey RA, Inskip EK. (1995). Day of estrus cycle affects follicular dynamics after induced luteolysis in ewes. *J Anim Sci* 73: 2094-2101.
 89. Huet C, Monget P, Pisselet C, Monniaux D. (1997). Changes in extracellular matrix components and steroidogenic enzymes during growth and atresia of antral ovarian follicles in the sheep. *Biol Reprod* 56: 1025-1034.

90. Ing NH, Spencer TE, Bazer FW. (1996). Estrogen enhances endometrial estrogen receptor gene expression by a posttranscriptional mechanism in the ovariectomized ewe. *Biol Reprod* 54: 591-599.
91. Ing NH, Ott TL. (1999). Estradiol up-regulates estrogen receptor- α messenger ribonucleic acid in sheep endometrium by increasing its stability. *Biol Reprod* 60: 134-139.
92. Johnson SK, Dailey RA, Inskeep EK, Lewis PE. (1996). Effect of peripheral concentrations of progesterone on follicular growth and fertility in ewes. *Domest Anim Endocrinol* 13(1): 69-79.
93. Kastelic J, Ginther O. (1991). Factors affecting the origin of the ovulatory follicle in heifers with induced luteolysis. *Anim Reprod Sci* 26: 13-24.
94. Kelly RW, Crocker KP. (1990). Reproductive wastage in Merino flocks in western Australia: a guide for fundamental research. En: *Reproductive Physiology of Merino Sheep. Concepts and consequences*. Eds. Oldham CM, Martin GB, Purvis IW. *Austr. School Agr., Univ. Western Austr.* 13: 1-9.
95. Killian GJ. (2004). Evidence for the role of oviduct secretions in sperm function, fertilization and embryo development. *Anim Reprod Sci* 82-83: 141-153.
96. Kleemann DW, Walker SK. (2005). Fertility in South Australian commercial Merino flocks: sources of reproductive wastage. *Theriogenology* 63: 2416-2433.
97. Knight WT. (1990). Reproductive Wastage, a guide for fundamental research: a New Zealand perspective. En: *Reproductive Physiology of Merino Sheep. Concepts and consequences*. Eds. Oldham CM, Martin GB, Purvis IW. *Austr. School Agr., Univ. Western Austr.* 13: 11-21.
98. LeMaire WJ, Marsh JM. (1975). Interrelationships between prostaglandins, cyclic AMP and steroids in ovulation. *J Reprod Fertil Supp* 22: 53-74.
99. Liu X, Dal Q, Hart EJ, Duggavathi R, Barrett DM, Rawlings NC, Bartlewski PM. (2006). Ovarian and endocrine responses to prostaglandin F₂alpha (PGF₂alpha) given at the expected time of the endogenous FSH peak at mid-cycle in ewes. *Theriogenology* 66(4): 811-821.
100. Logan KA, Juengel JL, McNatty KP. (2002). Onset of steroidogenic enzyme gene expression during ovarian follicular development in sheep. *Biol Reprod* 66: 906-916.
101. 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.
102. Loubser PG, van Niekerk CH. (1981). Oestrus synchronisation in sheep with progesterone-impregnated (MAP) intravaginal sponges and a prostaglandin analogue. *Theriogenology* 15: 547-552.
103. Lozano JM, Lonergan P, Boland MP, O'Callaghan D. (2003). Influence of nutrition on the effectiveness of superovulation programmes in ewes: effect on oocyte quality and post-fertilization development. *Reproduction* 125: 543-553.
104. Lunstra DD, Christenson RK. (1981). Fertilization and embryonic survival in ewes synchronized with exogenous hormones during the anestrous and estrous seasons. *J Anim Sci* 53: 458-466.

105. Lynch CO, Kenny DA, Childs S, Diskin MG. (2010). The relationship between periovulatory endocrine and follicular activity on corpus luteum size, function, and subsequent embryo survival. *Theriogenology* 73: 190-198.
106. Mann GE, Neilly AS, Baird DT. (1992). Hormone production in vivo and in vitro from follicles at different stages of the estrous cycle in sheep. *J Endocrinol* 132: 225-234.
107. Martin GB, Milton J, Davidson R, Banchero Hunzicker G, Lindsay D, Blache D. (2004). Natural methods for increasing reproductive efficiency in small ruminants. *Anim Reprod Sci* 82-83: 231-246.
108. Maurel MC, Roy F, Hervé V, Bertin J, Vaiman D. (2003). Réponse immunitaire à la eCG utilisée dans le traitement de l'induction d'ovulation chez la chèvre et la brebis [Immune response to equine chorionic gonadotropin used for the induction of ovulation in goats and ewes.] *Gynecol Obstet Fertil* 31:766-769. (Abstract)
109. Maxwell WMC. (1986). Artificial insemination of ewes with frozen thawed semen at a synchronized oestrus. 1. Effect of time of onset of oestrus, ovulation and insemination on fertility. *Anim Reprod Sci* 10(4): 301-308.
110. McCrabb GJ, McDonald BJ, Hennoste LM. (1993). Heat stress during mid – pregnancy in sheep and the consequences for placental and fetal growth. *J Agric Sci Camb* 120: 265-271.
111. McCracken JA, Glew ME, Scaramuzzi RJ. (1970). Corpus luteum regression induced by prostaglandin F₂-alpha. *J Clin Endocrinol Metab* 30: 544-546.
112. McCracken J, Schramm W, Okulicz WC. (1984). Hormone receptor control of pulsatile secretion of PGF-2alpha from the ovine uterus during luteolysis and its abrogation in early pregnancy. *Anim Reprod Sci* 7: 31-55.
113. McNeilly AS, Picton HM, Campbell BK, Baird DT. (1991). Gonadotrophic control of follicle growth and corpus luteum in the ewe. *J Reprod Fert Suppl* 43: 177-186.
114. Meikle A. (2001). Reproductive Endocrinology of Prepubertal and Anestrous Ewes. Doctoral Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala.
115. Meikle A, Tasende C, Rodríguez M, Garófalo E. (1997). Effects of estradiol and progesterone on the reproductive tract and on uterine sex steroid receptors in female lambs. *Theriogenology* 48: 1105-1113.
116. Menchaca A. (2010). Sincronización de la ovulación en ovejas y cabras + IATF. Curso de Posgrado de Actualización en Reproducción en Pequeños Rumiantes Instituto Reproducción Animal Uruguay 3, 4 y 5 de marzo.
117. Menchaca A, Gil J, Olivera J, Rubianes E. (2003). Efecto de la condición corporal previo al servicio sobre la fertilidad y fecundidad en ovejas inseminadas artificialmente. V Simposio Internacional de Reproducción Animal. 27, 28 y 29 de junio. IRAC, Córdoba, Argentina, P 404.
118. Menchaca A, Rubianes E. (2002). Relation between progesterone concentrations during the early luteal phase and follicular dynamics in goats. *Theriogenology* 57: 1411-1419.
119. Menchaca A, Rubianes E. (2004). New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reprod Fert and Dev* 16: 403-413.
120. Menchaca A, Miller V, Gil J, Pinczac A, Laca M, Rubianes E. (2004). Prostaglandin F₂α treatment associated with Timed Artificial Insemination in ewes. *Reprod Dom Anim* 39(5): 352-355.
121. Moller-Holtkamp P. (1980). Conceptual e Iliren dos nuevas hormonas para

- combatir los trastornos de la reproducción en los animales. IV Jornadas Latinoamericanas y VIII Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay. Sección comunicaciones cortas: 5-16.
- 122.Naqvi SMK, Maurya VP, Gulyani R, Joshi A, Mittal JP. (2004). The effect of thermal stress on superovulatory response and embryo production in Bharat Merino ewes. *Small Rumin Res* 55: 57-63.
 - 123.Nephew KP, McClure KE, Ott TL, Dubois DH, Bazer FW, Pope WF. (1991). Relationship between variation in conceptus development and differences in estrous cycle duration in ewes. *Biol Reprod* 44: 536-539.
 - 124.Niswender GD, Farin CE, Gamboni F, Sawyer HR, Nett TM. (1986). Role of luteinizing hormone in regulating luteal function in ruminants. *J Anim Sci* 62: 1-13.
 - 125.Niswender GD, Juengel JL, Mcguire WJ, Belfiore CJ, Wiltbank MC. (1994). Luteal function: The estrous cycle and early pregnancy. *Biol Reprod* 50: 239-247.
 - 126.Olivera J, Gil J, Menchaca A, Rubianes E. (2004a). Effect of PGF2 α dose on the reproductive performance of a Timed Artificial Insemination protocol in sheep. *Reprod Fertil Dev* 16(4): 507.
 - 127.Olivera J, Gil J, Menchaca A, Rubianes E. (2004b). Parity effect on results of two insemination protocol after two PGF2 α treatments 7 days apart. *Reprod Fertil Dev* 16(4): 508.
 - 128.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. P- 195-196.
 - 129.Olivera J, Gil J, Fierro S, Gamarra J, Texeira V, Araújo A, Stoletniy G. (2006). Sincronización de celos para la IA a Tiempo 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: Núcleo Fundacional U.E. Glencoe 1999-2006". Diciembre 2006. Sección 2.
 - 130.Olivera J, Gil J, Fierro S, Araújo A, Filliol E, Stoletniy G. (2007). Sincronización de celos en ovinos: efecto del intervalo entre dosis de PGF2 α y del momento de IA a Tiempo Fijo con el protocolo Synchrovine®. XXXV Jornadas de Buiatría. 7, 8 y 9 de junio. Paysandú, Uruguay. P- 330-331.
 - 131.Olivera J, López V, Martincorena M, Fierro S, Gil J. (2009). La vía de inseminación y el protocolo de inducción estral afectan la eficiencia reproductiva de ovejas servidas con semen refrigerado. VI Jornadas Técnicas de la Facultad de Veterinaria. Montevideo. Uruguay.
 - 132.Parr RA. (1992). Nutrition-progesterone interaction during early pregnancy in sheep. *Reprod Fertil Dev* 4: 297-300.
 - 133.Pope WF, Cárdenas H. (2004). Sensitivity of sheep to exogenous prostaglandin F2 α early in the estrous cycle. *Small Rumin Res* 55: 245-248.
 - 134.Quinlivan TD, Robinson TJ. (1969). Numbers of spermatozoa in the genital tract after artificial insemination of progestagen-treated ewes. *J Reprod Fertil* 9(1): 73-86.
 - 135.Ramon JP, Folch J, Fernández-Arias A, Alabart JL, Cocero MJ, Echegoyen E. (1991). La técnica de la transferencia de embriones em el ganado ovino. *ITEA* 11(1): 61-63.
 - 136.Ravindra JP, Rawlings NC, Evans ACO, Adams GP. (1994).

- Ultrasonographic study of ovarian follicular dynamics in ewes during the oestrus cycle. *J Reprod Fertil* 101: 501-509.
137. Ravindra JP, Rawlings NC. (1997). Ovarian follicular dynamics in ewes during the transition from anestrus to the breeding season. *J Reprod Fertil* 110: 279-289.
 138. Rensis FD, Scaramuzzi RJ. (2003). Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow: a review. *Theriogenology* 60(6): 1139-1151.
 139. Revah I, Butler WR. (1996). Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. *J Reprod Fertil* 106(1): 39-47.
 140. Roy F, Combes B, Vaiman D, Cribiu EP, Pobel T, Deletang F, Combarous Y, Guillou F, Maurel MC. (1999). Humoral immune response to equine chorionic gonadotropin in ewes: association with major histocompatibility complex and interference with subsequent fertility. *Biol Reprod* 61: 209-218.
 141. 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.
 142. 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.
 143. Rubianes E, Beard A, Dierschke DJ, Bartlewski P, Adams GP, Rawlings NC. (1997b). Endocrine and ultrasound evaluation of the response to PGF 2 α and GnRH given at different stages of the luteal phase in cyclic ewes. *Theriogenology* 48: 1093-1104.
 144. 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.
 145. 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.
 146. Russel AJF, Doney JM, Gunn RG. (1969). Subjective assessment of body fat in live sheep. *J Agric Sci Cambridge* 72: 451-454.
 147. SAS. (2001). SAS 9.1.3, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
 148. Scaramuzzi RJ, Martin GB. (1984). Pharmacological agents for manipulating oestrus and ovulation in the ewe. In: *Reproduction in Sheep*. Australian Wool Corporation Technical Publication. Eds. Lindsay DR, Pearce DT. pp.316-325.
 149. 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.
 150. 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.
 151. 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.
 152. Shelton M. (1964). Relation of environmental temperature during gestation to birth weight and mortality in lambs. *J Anim Sci* 23: 360-364.
 153. Silva PJ, Juengel JL, Rollyson MK, Niswender GD. (2000). Prostaglandin

- metabolism in the ovine corpus luteum: Catabolism of prostaglandin F₂ α (PGF₂ α) coincides with resistance of the corpus luteum to PGF₂ α . *Biol Reprod* 63: 1229-1236.
154. Sirois J, Fortune JE. (1990). Lengthening the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: a model for studying ovarian follicular dominance. *Endocrinology* 127: 916-925.
 155. Smith JF, Allison AJ. (1971). The effect of exogenous progestagen on the levels of cervical mucus in the ewe. *J Reprod Fert* 24: 279-82.
 156. Sosa C. (2007). La subnutrición y el ambiente materno durante el ciclo sexual y la gestación temprana en ovinos. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, España.
 157. Sosa C, Lozano JM, Viñoles C, Acuña S, Abecia JA, Forcada F, Forsberg M, Meikle A. (2004). Effect of plane of nutrition on endometrial sex steroid receptor expression in ewes. *Anim Reprod Sci* 84: 337-348.
 158. Sosa C, Abecia JA, Forcada F, Meikle A. (2008). Undernutrition reduces the oviductal mRNA expression of progesterone and oestrogen receptors in sheep. *Vet J* 175: 413-415.
 159. Souza CJH, Campbell BK, Baird DT. (1996). Follicular dynamics and ovarian steroid secretion in sheep during anoestrus. *J Reprod Fert* 108: 101-106.
 160. Souza CJ, 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.
 161. Souza CJ, Campbell BK, Baird DT. (1998). Follicular waves and concentrations of steroids and inhibin a in ovarian venous blood during the luteal phase of the oestrus cycle in ewes with an ovarian autotransplant. *J Endocrinol* 156: 563-572.
 162. Stock AE, Fortune JE. (1993). Ovarian follicular dominance in cattle: Relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology* 132: 1108-1114.
 163. Spencer TE, Bazer FW. (1995). Temporal and spatial alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe. *Biol Reprod* 53: 1527-1543.
 164. Spencer TE, Bazer FW. (1996). Ovine interferon tau suppresses transcription of the estrogen receptor and oxytocin receptor genes in the ovine endometrium. *Endocrinology* 137: 1144-1147.
 165. Spencer TE, Becker WC, George P, Mirando MA, Ogle TF, Bazer FW. (1995a). Ovine interferon-tau inhibits estrogen receptor up-regulation and estrogen-induced luteolysis in cyclic ewes. *Endocrinology* 136: 4932-4944.
 166. Spencer TE, Becker WC, George P, Mirando MA, Ogle TF, Bazer FW. (1995b). Ovine interferon-tau regulates expression of endometrial receptors for estrogen and oxytocin but not progesterone. *Biol Reprod* 53: 732-745.
 167. Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC. (2004a). Implantation mechanisms: insights from the sheep. *Reproduction* 128: 657-668.
 168. Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Bazer FW. (2004b). Progesterone and placental hormone actions on the uterus: insights from domestic animals. *Biol Reprod* 71: 2-10.
 169. Stacey BD, Gemmel RRT, Thorburn GD. (1976). Morphology of the corpus luteum in the sheep during regression induced by prostaglandin F₂ α . *Biol Reprod* 14: 280-291.

170. Stringfellow D, Seidel S. (1998). Manual of International Embryo Transfer Society. A procedural guide and general information for the use of embryos transfer technology emphasizing sanitary procedures. Ed. Stringfellow D, Seidel S. 3th Edition. Append D.
171. Tervit HR, Havik PG. (1976). A modified technique for flushing ova from the sheep uterus. *N Z Vet J* 24: 138-140.
172. Thwaites CJ. (1969). Embryo mortality in the heat stressed ewe. II. Application of hot-room results to field conditions. *J Reprod Fert* 19: 255-262.
173. Tilbrook AJ, Turner AI, Clarke IJ. (2000). Effects on stress on reproduction in non – rodent mammals: the role of glucocorticoids and sex differences. *Rev Reprod* 5: 105-113.
174. Toosi BM, Seekallu SV, Barrett DMW, Davies KL, Duggavathi R, Bagu ET, Rawlings NC. (2010). Characteristics of peaks in serum concentrations of follicle-stimulating hormone and estradiol, and follicular wave dynamics during the interovulatory interval in cyclic ewes. *Theriogenology* 73(9): 1192-1201.
175. Trounson AO, Willadsen SM, Moor RM. (1976). Effect of prostaglandin analogue Cloprostenol on oestrus, ovulation and embryonic viability in sheep. *J Agric Sci Camb* 86: 609-611.
176. Ungerfeld R, Rubianes. (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.
177. Vázquez MI, Blanch MS, Alanis GA, Chaves MA, Gonzalez-Bulnes A. (2010). Effects of treatment with prostaglandin analogue on developmental dynamics and functionality of induced corpora lutea in goats. *Anim Reprod Sci* 118: 42-47.
178. Viñoles C. (2003). Effect of nutrition on follicle development and ovulation rate in the ewe. Doctoral Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala.
179. 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.
180. 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.
181. Viñoles C, Forsberg M, Banchero G, Rubianes E. (2001). Effect of long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. *Theriogenology* 55(4): 993-1004.
182. 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.
183. Viñoles C, Quadrelli R, Marinho P, Bareille S, Driancourt M. (2006). El agregado de antibióticos disminuye la cantidad de mucus y el olor de las esponjas al finalizar el tratamiento. XXXIV Jornadas Uruguayas de Buiatría. 8 al 10 de junio. Paysandú, Uruguay. P- 211-212.
184. Viñoles C, Paganoni B, Milton M, Martín 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. P- 264-265.
185. Wathes DC, Hamon M. (1993). Localization of oestradiol, progesterone and oxytocin receptors in the uterus during the oestrous cycle and early pregnancy of the ewe. *J Endocrinol* 138: 479-492.
 186. Wathes DC, Lamming GE. (1995). The oxytocin receptor, luteolysis and the maintenance of pregnancy. *J Reprod Fertil (Suppl)* 49: 53-67.
 187. White LM, Keisler DH, Dailey RA, Inskeep EK. (1987). Characterization of Ovine Follicles Destined to Form Subfunctional Corpora Lutea. *J Anim Sci* 65: 1595-1601.
 188. Wiley TM, Cárdenas H, Pope WF. (1997). Effect of the rate of progesterone decline at luteolysis on the ovulatory follicles and subsequent estrous cycle length in ewes. *Anim Reprod Sci* 46: 78-87.
 189. Wilkins J, Croker K. (1990). Embryonic wastage in ewes. In: *Reproductive Physiology of Merino Sheep. Concepts and consequences*. Eds. Oldham CM, Martin GB, Purvis IW. Austr. School Agr., Univ. Western Austr. 13: 169-177.
 190. Wiltbank MC. (1994). Cell types and hormonal mechanisms associated with mid-cycle corpus luteum function. *J Anim Sci* 72: 1873-1883.
 191. Wiltbank MC, Gallagher KP, Christensen AK, Brabec RK, Keyes PL. (1990). Physiological and immunocytochemical evidence for a new concept of blood flow regulation in the corpus luteum. *Biol. Reprod.* 42: 139-149.
 192. 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.
 193. Winterberguer Torres S, Sevellec C. (1987). *Atlas du développement embryonnaire précoce chez les ovins*. Ed. INRA, Paris.