

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIA ANIMAL**



**“Simplificación de los métodos de superovulación  
en ovejas de la raza Corriedale”**

**TESIS DOCTORAL**

**Laura Simonetti**

**Director: Dr. Fernando Forcada**

La Tesis titulada **“SIMPLIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS DE SUPEROVULACIÓN EN OVEJAS DE LA RAZA CORRIEDALE”** es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencia Animal, de la Universidad Politécnica de Valencia, España.

**El Doctorando**

**Fda. Laura Simonetti**

**El Director de Tesis**

**Fdo. Fernando Forcada**

**El Tutor de Tesis**

**Fdo. Jose S. Vicente Antón**

## PREFACIO

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencia Animal, de la Universidad Politécnica de Valencia, España, y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otras.

La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en:

- “Departamento de Producción Animal”, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Lomas de Zamora (UNLZ), Argentina.
- “Reserva Ovina N°8” y “Laboratorio de Reproducción Animal”, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina (INTA), dentro del marco del convenio entre la UNLZ y el INTA.
- “Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos”, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, España.

La Tesis ha sido financiada por los proyectos 13/A151 (Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Lomas de Zamora, Argentina) y CICYT AGL2004-00432 (Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, España)

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento al Dr. Fernando Forcada por su contribución científica y guía en este proceso de aprendizaje. Pero por sobre todo, por su apoyo incondicional y ánimo inagotable. Siempre presente con sus palabras de aliento, haciéndome notar lo tanto que habíamos avanzado ... lo poco que restaba. Por su infinita paciencia.

Al grupo de Reproducción Ovina del “Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos”, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, España, quienes durante mi estancia tan lejos de mi tierra me brindaron su calidez. Especialmente a Macu, compañera incansable de RIAs y ELISAs al son de una música.

A Zaragoza, esa ciudad blanca, que por esos días supo ser mi casa.

A la Estación Experimental INTA-Balcarce, particularmente a la “Reserva Ovina” y al grupo de “Reproducción Animal” por todas las facilidades materiales y humanas que me proporcionaron. Con especial énfasis al Dr. Ricardo Alberio y al Ing. Carlos Solanet, que año tras año me dieron la bienvenida para la realización de mi trabajo y se preocuparon por hacer posible hasta lo difícil.

Al aporte invaluable de mis compañeros Oscar Rivera y Néstor Carou, quienes dejando de lado sus ocupaciones, “metieron mano” en las laparotomías haciendo el trabajo con tanto empeño como si fuera suyo.

A los entonces alumnos de grado, hoy colegas, que todos los años se sumaron con su “presente” al equipo de trabajo y le metieron garra al asunto. Que se esforzaron más allá del cansancio. Que aportaron su humor fresco. A todos ellos:

Marina Ganchegui, Jonathan Camarasa, Rodrigo Buceta, Mariana Castellón, Carlitos Muñoz, Julia Mauriño y María Paula Diez.

A mi segundo hogar, la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Lomas de Zamora (Argentina), que me vió transitar todo este tiempo desde que tímida y adolescente ingresé a sus aulas. A las autoridades de dicha institución, que me brindaron la posibilidad de seguir perfeccionándome.

A la Universidad Politécnica de Valencia (España) que hizo posible un Programa de Doctorado de jerarquía a nuestro alcance. Al Dr. José Salvador Vicente Antón, quien gentilmente aceptó ser mi tutor en Valencia y me brindó la oportunidad de trabajar junto al Dr. Forcada.

A mi mamá y mi papá que desde siempre me inculcaron la importancia del conocimiento y me abrieron las puertas del saber, haciéndome ver que lo que debiera ser por derecho es una oportunidad para no tantos.

A mis amigos, que son mis “hermanos”, mis afectos sin compromiso ni lazo de sangre. Ese tesoro que vale más que cualquier conocimiento. Por su cariño, por saber escuchar, comprender y compartir.

Y finalmente, a vos, Marcelo ... mi gran compañero de vida. Tenía todas las palabras ensayadas en mi mente ... pero sucede que llegado el momento final, se me traban y no logro hilvanarlas ... a veces las palabras no alcanzan.

## PUBLICACIONES DERIVADAS

**Parte de los resultados de esta Tesis han sido publicados en los siguientes trabajos:**

Simonetti, L., Rivera, O., Carou, N., 2003. Superovulación en ovejas Corriedale mediante diferentes tratamientos hormonales. Proc. "XII Congreso Mundial de Corriedale", Montevideo, Uruguay (Trabajo completo).

Simonetti, L., Forcada, F., Rivera, O., Carou, N., 2004. Simplificación de los tratamientos superovulatorios en ovinos. Revista Argentina de Producción Animal, "XXVII Congreso Argentino de Producción Animal", Tandil, Argentina (Abstract).

Simonetti, L., Forcada, F., Rivera, O., Carou, N., 2005. Evaluación de la respuesta superovulatoria y los niveles hormonales de cuatro tratamientos superovulatorios en ovinos. Revista Argentina de Producción Animal, "XXVIII Congreso Argentino de Producción Animal", Bahía Blanca, Argentina (Abstract).

Simonetti, L., Rivera, O., Carou, N., Forcada, F., 2006. Comparación de diferentes tratamientos superovulatorios en ovinos. Revista Argentina de Producción Animal, "XXVIII Congreso Argentino de Producción Animal", Mar del Plata, Argentina (Abstract).

Simonetti, L., Forcada, F., Abecia, A., Palacín, I., Rivera, O.E., Carou, N., Lynch, G.M., 2007. Efectos del tratamiento superovulatorio sobre la presentación de los celos, el pico preovulatorio de LH y la tasa ovulatoria en ovejas Corriedale.

Revista Argentina de Producción Animal, "XXIX Congreso Argentino de Producción Animal", Santiago del Estero, Argentina (Abstract).

Simonetti, L., Forcada, F., Rivera, O.E., Carou, N., Alberio, R.H., Abecia, J.A., Palacín, I., 2008. Simplified superovulatory treatments in Corriedale ewes. Anim. Reprod. Sci. 104, 227-237.

## GLOSARIO

- AETA: “American Embryo Transfer Association”; “Asociación Americana de Transferencia Embrionaria”
- AETE: “Association Europeenne de Transferí Embryonnaire”; “Asociación Europea de Transferencia Embrionaria”
- AMPc: adenosín monofosfato cíclico
- CL: cuerpo lúteo
- cm: centímetro
- CETA: “Canadian Embryo Transfer Association”; “Asociación Canadiense de Transferencia Embrionaria”
- CNA: Censo Nacional Agropecuario
- col.: colaboradores
- DS: desvío estándar
- E2: estradiol
- eCG: gonadotrofina coriónica equina
- EDTA: ácido etilén diamino tetracético
- ELISA: enzimoimmunoensayo
- ER: estructuras recuperadas (ovocitos sin fertilizar y embriones)
- ET: embriones totales
- EV: embriones viables
- FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación



- FGA: acetato de fluorogestona
- FLA: Federación Lanera Argentina
- FP: folículo persistente
- FSH: hormona folículoestimulante
- FSHo/PVP: hormona folículoestimulante disuelta en polivinilpirrolidona
- FSHo: hormona folículoestimulante ovina
- FSHo+eCG (Grupos A1 y A2): 176 unidades NIADDK-oFSH-17 de FSH ovina, disueltas en solución salina y administradas en una única inyección i.m. 48h antes de la remoción de las esponjas, junto con 500 UI de eCG i.m.
- FSHo\_4di (Grupo B1): 176 unidades NIADDK-oFSH-17 de FSH ovina, disueltas en solución salina y administradas en 4 dosis iguales i.m. a intervalos de 12 h, comenzando a las 24 h antes de la remoción de las esponjas.
- FSHo/PVP (Grupo C1): 176 unidades NIADDK-oFSH-17 de FSH ovina, disueltas en solución 30% de polivinilpirrolidona y administradas en una única inyección i.m. 24 h antes de la remoción de las esponjas.
- FSHo\_6di (Grupo D1): 176 unidades NIADDK-oFSH-17 de FSH ovina, disueltas en solución salina y administradas en 6 dosis iguales i.m. a intervalos de 12 h, comenzando a las 48 h antes de la remoción de las esponjas.
- FSHo3/4\_4di+eCG (Grupo E1): 132 unidades NIADDK-oFSH-17 de FSH ovina, disueltas en solución salina y administradas en 4 dosis iguales i.m. a intervalos de 12 h, comenzando a las 24 h antes de la remoción de las esponjas, y 500 UI de eCG i.m. administradas junto con la primer inyección de la FSHo.
- FSHo3/4/PVP+eCG (Grupo F1): 132 unidades NIADDK-oFSH-17 de FSH ovina, disueltas en solución 30% de polivinilpirrolidona y administradas en una única inyección i.m. 24 h antes de la remoción de las esponjas, junto con 500 UI de eCG i.m.

- FSHo3/4+eCG (Grupo B2): 132 unidades NIADDK-oFSH-17 de FSH ovina, disueltas en solución salina y administradas en una única inyección i.m. 48 h antes de la remoción de las esponjas, junto con 500 UI de eCG i.m.
- FSHo\_8dd (Grupo C2): 176 unidades NIADDK-oFSH-17 de FSH ovina, disueltas en solución salina, y administradas en 8 dosis decrecientes i.m. a intervalos de 12 h, comenzando a las 72 h antes de la remoción de las esponjas.
- FSHp: hormona folículoestimulante porcina
- GnRH: hormona liberadora de gonadotrofinas
- h: horas
- ha: hectárea
- <sup>125</sup>I
- IA: inseminación artificial
- IETS: “Internacional Embryo Transfer Society”; “Sociedad Internacional de Transferencia Embrionaria”
- i.m.: intramuscular
- INDEC: Instituto Nacional de Estadísticas y Censos
- INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
- kg: kilogramo
- LH: hormona luteinizante
- MAP: acetato de medroxiprogesterona
- min: minuto
- mg: miligramo

- ml: mililitro
- mm: milímetro
- mm<sup>2</sup>: milímetro cuadrado
- MOET : superovulación y transferencia embrionaria
- n: cantidad
- NIH-FSH-S1: unidades de hormona folículoestimulante
- OIE: “Oficce International des Epizooties” ; “Oficina Internacional de Epizootias”
- P4: progesterona
- PBS: fosfato buffer salino
- PGF<sub>2</sub>α: prostaglandina F2 alfa
- PMSG: gonadotropina del suero de yegua gestante
- PRE-RE: previo al retiro de las esponjas
- PVP: polivinilpirrolidona
- RIA: radioinmunoensayo
- s.c.: subcutáneo
- SAGPyA: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación
- SAS: Statistical Analysis System
- SEM: error estándar de medias
- SRA: Sociedad Rural Argentina
- TMB: cromógeno tetrametyl benzidina
- UI: unidades internacionales

- UNLZ: Universidad Nacional de Lomas de Zamora
- vs.: versus
- $\mu\text{g}$ : microgramo
- $\mu\text{l}$ : microlitro

## RESUMEN

La superovulación permite aumentar la tasa de mejoramiento genético a través de las hembras. En ovinos, la raza Corriedale de doble propósito (lana, carne) es numéricamente importante en Argentina, donde se distribuye en toda su superficie y es criada bajo condiciones extensivas. Sin embargo, la información sobre la respuesta superovulatoria en ovejas Corriedale es escasa y no se han realizado estudios para el desarrollo de protocolos sencillos de estimulación apropiados para estos rebaños extensivos. El objetivo del estudio fue evaluar la viabilidad de simplificar los tratamientos superovulatorios en ovejas de la raza Corriedale durante la estación de cría. Se realizaron dos experimentos, utilizándose ovejas Corriedale dentro de la estación reproductiva del otoño. Las ovejas fueron sincronizadas con esponjas intravaginales con progestágeno y superovuladas según diferentes tratamientos. En el **Experimento 1**, se evaluaron protocolos simplificados de administración de FSH ovina (FSHo) en combinación o no con eCG: A1 (n=13): 176 unidades FSHo en una única inyección en vehículo salino junto con 500 UI eCG aplicadas 48 h antes de la retirada de las esponjas (PRE-RE); B1 (n=12): 176 unidades FSHo repartidas en 4 dosis iguales en vehículo salino cada 12 h comenzando 24 h PRE-RE; C1 (n=13): 176 unidades FSHo en una única inyección en vehículo retardante (polivinilpirrolidona; PVP) 24 h PRE-RE; D1 (n=14): 176 unidades FSHo repartidas en 6 dosis iguales en vehículo salino cada 12 h comenzando 48 h PRE-RE; E1 (n=7): 132 unidades FSHo repartidas en 4 dosis iguales en vehículo salino cada 12 h comenzando 24 h PRE-RE y asociadas a 500 UI eCG junto con la primera inyección; F1 (n=7): 132 unidades FSHo en una única inyección en PVP junto con 500 UI eCG, 24 h PRE-RE. En el **Experimento 2**, el protocolo simplificado que obtuvo los mejores resultados en el Experimento 1 (A1) fue seleccionado, A2 (n=16), y comparado con el mismo protocolo, pero usando una dosis de FSHo reducida (132 unidades), B2 (n=14), y con el protocolo más convencional de FSHo (176 unidades en 8 dosis decrecientes comenzando 72 h PRE-RE), C2 (n=17). Las ovejas fueron expuestas a carneros provistos de arneses marcadores y se registraron los celos cada 6 h a partir de la retirada de las esponjas. El intervalo al pico preovulatorio de LH y su magnitud

fueron determinados a partir de muestras de sangre extraídas cada 6 h y analizadas mediante test inmunoenzimático de tipo sándwich (ELISA). La concentración de P4 al celo fue medida por RIA en muestras de sangre extraídas al inicio de los celos. Las laparotomías fueron realizadas 6 días tras el inicio de los celos. Se determinó el número de cuerpos lúteos (CL) y de folículos persistentes (FP). Se analizaron los porcentajes de ovejas ovuladas (al menos 1 CL funcional) y superovuladas (al menos 3 CL funcionales). Se lavaron los cuernos uterinos y se registraron las estructuras recuperadas (ER: ovocitos sin fertilizar y embriones). Los embriones (ET) fueron evaluados morfológicamente y se registraron aquellos viables (de calidad excelente o buena; EV). Se analizaron los porcentajes de recuperación (ER/CL), fertilización (ET/ER) y viabilidad (EV/ET). Se extrajo sangre para ser analizada por RIA y calcular P4 al momento de la recuperación de embriones. Las variables fueron analizadas por Chi-cuadrado o Test Exacto de Fisher, o por Análisis de Varianza según correspondiera. En el **Experimento 1**, al comparar A1, B1 y C1, se obtuvieron los resultados que se detallan a continuación. El inicio del celo y el pico de LH ocurrieron más temprano en aquellas ovejas en cuyo tratamiento se incluyó eCG (A1) ( $P < 0,05$ ). La concentración de P4 al celo fue mayor ( $P < 0,05$ ) para A1. La tasa de superovulación difirió entre A1 y C1 (100% y 58,3%;  $P < 0,05$ ). La tasa ovulatoria fue mayor en A1 ( $13,8 \pm 1,9$ ) que en B1 ( $6,2 \pm 1,1$ ) o C1 ( $4,8 \pm 1,0$ ) ( $P < 0,05$ ). El número de folículos persistentes no dependió del tratamiento ( $P > 0,10$ ). La producción de P4 por cuerpo lúteo no difirió entre los grupos, si bien la concentración total más elevada se produjo en A1 por su mayor tasa ovulatoria ( $P < 0,05$ ). La cantidad de estructuras recuperadas fue mayor en A1 ( $8,4 \pm 1,4$ ) que en B1 ( $3,1 \pm 1,1$ ) o C1 ( $3,2 \pm 1,1$ ) ( $P < 0,05$ ). El grupo A1 tendió a producir más embriones ( $5,4 \pm 1,6$ ) que B1 ( $1,4 \pm 0,4$ ) ( $P = 0,06$ ). Sin embargo, C1 tuvo tasas de fertilización y de viabilidad superiores (89,7% y 76,9% en C1 vs. 64,2% y 53,2% en A1, y 45,9% y 40,5% en B1;  $P < 0,05$ ). Finalmente, A1 tendió ( $P = 0,08$ ) a producir más embriones viables ( $4,5 \pm 1,3$ ), especialmente comparado con B1 ( $1,2 \pm 0,4$ ). La alternativa de repartir la FSHo en 6 dosis iguales (D1) en lugar de 4 (B1), si bien no logró aumentar la tasa ovulatoria, pareció mejorar ( $P < 0,05$ ) las tasas de recuperación (65,4% vs. 49,3%), de fertilización (82,3% vs. 45,9%) y de viabilidad (72,5% vs. 40,5%) y por ende el número de embriones

viabiles ( $3,1 \pm 0,7$  vs.  $1,2 \pm 0,4$ ;  $P < 0,05$ ). La opción de combinar eCG a la FSHo administrada en 4 dosis iguales (E1) o en una única inyección en PVP (F1) acortó los intervalos al celo y al pico de LH ( $P < 0,05$ ). El grupo E1 tuvo mayores tasas de fertilización y de viabilidad que B1 (78,3% vs. 45,9% y 73,9% vs. 40,5%;  $P < 0,05$ ), pero pese a duplicar la cantidad de embriones viables ( $2,8 \pm 1,7$  vs.  $1,2 \pm 0,4$ ) las diferencias no fueron significativas. El grupo F1 superó el bajo porcentaje de superovulación de C1 (100% vs. 58,3%) y aumentó la cantidad de cuerpos lúteos (F1:  $9,4 \pm 1,4$  y C1:  $4,8 \pm 1,0$ ). Sin embargo, no aumentó la producción de embriones viables (F1:  $3,0 \pm 0,9$  y C1:  $2,5 \pm 0,9$ ;  $P > 0,10$ ) debido a su baja tasa de recuperación (F1: 53% vs. C1: 68,4%;  $P < 0,05$ ). En el **Experimento 2**, el protocolo convencional (C2) retrasó el inicio de los celos y el pico de LH ( $30,4 \pm 1,7$  y  $33,3 \pm 2,5$  h en C2 vs.  $22,0 \pm 1,4$  y  $24,6 \pm 2,4$  h en A2, y  $20,1 \pm 1,0$  y  $19,0 \pm 1,8$  h en B2;  $P < 0,05$ ). Las tasas ovulatorias fueron elevadas, sin diferencias entre grupos. C2 tuvo una baja incidencia de folículos persistentes ( $0,3 \pm 0,2$ ), siendo significativa su diferencia con A2 ( $1,3 \pm 0,5$ ) ( $P < 0,10$ ). La concentración de P4 por cuerpo lúteo fue inferior ( $P < 0,05$ ) en C2 en comparación con A2 y B2. La tasa de recuperación fue mayor en C2 (72,5% vs. 57,3% en A2 y 56,7% en B2;  $P < 0,05$ ), pero la cantidad de estructuras recuperadas fue similar. La tasa de fertilización dependió del tratamiento (A2: 54,2%; B2: 81,6% y C2: 93,9%;  $P < 0,05$ ), de manera que el grupo C2 tendió a producir más embriones ( $7,3 \pm 1,0$  vs.  $4,3 \pm 1,1$  en A2 y  $4,8 \pm 0,8$  en B2;  $P = 0,07$ ). La viabilidad embrionaria fue menor en A2 (42,4%) en comparación con B2 (68,4%) y C2 (71,2%) ( $P < 0,05$ ). La cantidad de embriones viables no dependió del tratamiento ( $3,3 \pm 1,0$ ;  $4,0 \pm 0,8$  y  $5,5 \pm 0,8$  para A2, B2 y C2;  $P > 0,10$ ). En conclusión, el estudio demuestra la posibilidad de emplear protocolos simplificados para superovular ovejas Corriedale durante el otoño. Entre ellos, la administración de una dosis reducida de FSHo en única inyección junto con eCG resultó ser el régimen superovulatorio más apropiado por combinar simplicidad y menor dosis de la gonadotropina (que implica reducir el costo) sin afectar a la producción de embriones.

**Palabras claves:** Superovulación; Ovinos; Hormonas; Embriones.

## ABSTRACT

Superovulation has the potential to increase the rate of genetic improvement through the female line. In sheep, Corriedale, a dual-purpose (wool, meat) breed, is numerically important in Argentina, where it is well distributed throughout all the area and managed under extensive conditions. However, little is known about the superovulatory response in Corriedale ewes and no studies have reported developing protocols that could be easily applied in such open flocks. The aim of the study was to evaluate the viability of simplifying superovulatory treatments in Corriedale ewes, during the breeding season. Two experiments were designed, using Corriedale ewes in the autumn breeding season. The ewes were synchronized with progestogen intravaginal sponges and superovulated according to different treatments. In **Experiment 1**, simplified schedules based on ovine FSH (oFSH) in combination or not with eCG were tested: A1 (n=13): 176 units' oFSH given as a single injection in saline along with 500 IU eCG 48 h before sponge removal (B-SR); B1 (n=12): 176 units' oFSH dissolved in saline were divided into 4 equal doses and administered at 12-h intervals starting 24 h B-SR. C1 (n=13): 176 units' oFSH given as a single injection in long acting vehicle (polyvinylpyrrolidone; PVP) 24 h B-SR. D1 (n=14): 176 units' oFSH dissolved in saline were divided into 6 equal doses and administered at 12-h intervals starting 24 h B-SR. E1 (n=7): 132 units' oFSH dissolved in saline, divided into 4 equal doses and administered at 12-h intervals starting 24 h B-SR, along with 500 IU eCG given at the time of the first oFSH injection. F1 (n=7): 132 units' oFSH given as a single injection in PVP along with 500 IU eCG, 24 h B-SR. In **Experiment 2**, the simplified protocol that exhibited the best performance in Experiment 1 (A1) was selected, A2 (n=16) and compared with the same protocol but using less oFSH (132 units), B2 (n=14), and with the most conventional protocol of oFSH (176 units in 8 decreasing doses, 72 h B-SR), C2 (n=17). Ewes were exposed to rams fitted with crayons and signs of oestrus were checked at 6-h intervals from sponge withdrawal. The interval to preovulatory LH peak and the magnitude of the surge were determined from blood samples collected at 6-h intervals and analysed using a sandwich enzyme immunoassay (EIA). P4 concentration at oestrus was measured by RIA in blood



samples extracted at the time of oestrus onset. Six days after the onset of oestrus, ewes were submitted to laparotomy. Numbers of corpora lutea (CL) and persistent follicles (PF) were recorded. Percentages of ovulated (at least one functional CL) and superovulated (at least three functional CL) ewes were computed. The uterine horns were flushed and collected ova (CO: unfertilized ova and total embryos) were registered. Embryos (TE) were morphologically evaluated and those classified as viable (excellent or good quality; VE) were recorded. The rates of recovery (CO/CL), fertilization (TE/CO) and viability (VE/TE) were calculated. Blood samples were collected at embryo recovery to determine P4 by RIA. Variables were analysed by Chi-square or Fisher Exact Test, or by Analysis of Variance as appropriate. In **Experiment 1**, when comparing A1, B1 and C1, results were as follows. The onset of oestrus and the LH peak occurred earlier in those ewes that were co-treated with eCG (A1) ( $P < 0.05$ ). P4 concentration at oestrus was higher ( $P < 0.05$ ) in A1. The rate of superovulation differed between A1 and C1 (100% and 58.3%, respectively;  $P < 0.05$ ). The ovulation rate was higher in A1 ( $13.8 \pm 1.9$ ) than in B1 ( $6.2 \pm 1.1$ ) or C1 ( $4.8 \pm 1.0$ ) ( $P < 0.05$ ). The number of persistent follicles was no dependent on treatment ( $P > 0.10$ ). Progesterone secreted per corpus luteum was not different among groups, so that total concentration was higher in A1 because of its higher ovulation rate ( $P < 0.05$ ). The number of collected ova was higher in A1 ( $8.4 \pm 1.4$ ) than in B1 ( $3.1 \pm 1.1$ ) or C1 ( $3.2 \pm 1.1$ ) ( $P < 0.05$ ). Group A1 tended to produce more embryos ( $5.4 \pm 1.6$ ) than did B1 ( $1.4 \pm 0.4$ ) ( $P = 0.06$ ). However, C1 had higher rates of fertilization and viability than the other groups (89.7% and 76.9% in C1 vs. 64.2% and 53.2% in A1 and 45.9% and 40.5% in B1;  $P < 0.05$ ). Finally, A1 tended ( $P = 0.08$ ) to produce more viable embryos ( $4.5 \pm 1.3$ ) specially when compared to B1 ( $1.2 \pm 0.4$ ). The alternative of dividing the oFSH into 6 (D1) instead of 4 (B1) equal doses failed to increase ovulation rate, but it produced higher ( $P < 0.05$ ) rates of recovery (65.4% vs. 49.3%), fertilization (82.3% vs. 45.9%) and viability (72.5% vs. 40.5%). So, D1 resulted in more viable embryos than B1 ( $3.1 \pm 0.7$  vs.  $1.2 \pm 0.4$ ;  $P < 0.05$ ). The choice of combining eCG to the oFSH administered either into 4 equal doses (E1) or in one injection in PVP (F1) reduced the intervals to the oestrus and the LH peak ( $P < 0.05$ ). Group E1 had higher rates of fertilization and viability than did B1

(78.3% vs. 45.9% and 73.9% vs. 40.5%;  $P < 0.05$ ) but although its number of viable embryos was duplicated ( $2.8 \pm 1.7$  vs.  $1.2 \pm 0.4$ ), differences were not significant. Group F1 overcame the low percentage of superovulation of C1 (100% vs. 58.3%) and increased the number of corpora lutea (F1:  $9.4 \pm 1.4$  and C1:  $4.8 \pm 1.0$ ). However, it did not raise the production of viable embryos because of its low recovery rate (F1: 53% vs. C1: 68.4%;  $P < 0.05$ ). In **Experiment 2**, the conventional protocol (C2) resulted in a later oestrus onset and LH peak ( $30.4 \pm 1.7$  and  $33.3 \pm 2.5$  h in C2 vs.  $22.0 \pm 1.4$  and  $24.6 \pm 2.4$  h in A2, and  $20.1 \pm 1.0$  and  $19.0 \pm 1.8$  h in B2;  $P < 0.05$ ). Ovulation rates were high regardless of treatment. C2 had a low incidence of persistent follicles ( $0.3 \pm 0.2$ ), which was significantly different with A2 ( $1.3 \pm 0.5$ ) ( $P < 0.10$ ). P4 concentration per corpora lutea was lower ( $P < 0.05$ ) in C2 in comparison with A2 and B2. Recovery rate was greater in C2 (72.5% vs. 57.3% in A2 and 56.7% in B2;  $P < 0.05$ ), but the number of collected ova was similar among groups. Fertilization rate was dependent on treatment (A2: 54.2%; B2: 81.6% and C2: 93.9%;  $P < 0.05$ ) and C2 tended to produce more embryos than the others ( $7.3 \pm 1.0$  vs.  $4.3 \pm 1.1$  in A2 and  $4.8 \pm 0.8$  in B2;  $P = 0.07$ ). Viability rate was lower in A2 (42.4%) when compared to B2 (68.4%) and C2 (71.2%) ( $P < 0.05$ ). Finally, the number of viable embryos did not depend on treatment ( $3.3 \pm 1.0$ ,  $4.0 \pm 0.8$  and  $5.5 \pm 0.8$  for A2, B2 and C2;  $P > 0.10$ ). In conclusion, the study supports the use of simplified protocols to superovulate Corriedale ewes during the autumn. Among them, the reduced-dose oFSH given once along with eCG is the most appropriate superovulatory schedule because it combines simplicity and a lower dose of gonadotrophin (which implies a reduction in cost), without decreasing embryo production.

**Keywords:** Superovulation; Sheep; Hormones; Embryos.

## RESUM

La superovulació permet augmentar la taxa de millorament genètic a través de les femelles. En ovins, la raça Corriedale de doble propòsit (llana, carn) és numèricament important a Argentina, on es distribuïx en tota la seua superfície i és criada baix condicions extensives. No obstant, la informació sobre la resposta superovulatòria en ovelles Corriedale és escassa i no s'han realitzat estudis per al desenvolupament de protocols senzills d'estimulació apropiats per a estos ramats extensius. L'objectiu de l'estudi va ser avaluar la viabilitat de simplificar els tractaments superovulatoris en ovelles de la raça Corriedale durant l'estació de cria. Es van realitzar dos experiments, utilitzant-se ovelles Corriedale dins de l'estació reproductiva de la tardor. Les ovelles van ser sincronitzades amb esponges intravaginals amb progestagen i superovuladas segons diferents tractaments. En l'**Experiment 1**, es van avaluar protocols simplificats d'administració de FSH ovina (FSHo) en combinació o no amb eCG: A1 (n=13): 176 unitats FSHo en una única injecció en vehicle salí junt amb 500 UI eCG aplicades 48 h abans de la retirada de les esponges (PRE-RE); B1 (n=12): 176 unitats FSHo repartides en 4 dosis iguals en vehicle salí cada 12 h començant 24 h PRE-RE; C1 (n=13): 176 unitats FSHo en una única injecció en vehicle retardant (polivinilpirrolidona; PVP) 24 h PRE-RE; D1 (n=14): 176 unitats FSHo repartides en 6 dosis iguals en vehicle salí cada 12 h començant 48 h PRE-RE; E1 (n=7): 132 unitats FSHo repartides en 4 dosis iguals en vehicle salí cada 12 h començant 24 h PRE-RE i associades a 500 UI eCG junt amb la primera injecció; F1 (n=7): 132 unitats FSHo en una única injecció en PVP junt amb 500 UI eCG, 24 h PRE-RE. En l'**Experiment 2**, el protocol simplificat que va obtindre el millor resultats en l'Experiment 1 (A1) va ser seleccionat, A2 (n=16), i comparat amb el mateix protocol, però usant una dosi de FSHo reduïda (132 unitats), B2 (n=14), i amb el protocol més convencional de FSHo (176 unitats en 8 dosis decreixents començant 72 h PRERE), C2 (n=17). Les ovelles van ser exposades a moltons proveïts d'arnesos marcadors i es van registrar els zels cada 6 h a partir de la retirada de les esponges. L'interval al pic preovulatori de LH i la seua magnitud van ser determinats a partir de mostres de sang extretes cada 6 h i analitzades

per mitjà de test immunoenzimàtic de tipus sandvitx (ELISA). La concentració de P4 al zel va ser mesurada per RIA en mostres de sang extretes a l'inici dels zels. Les laparotomies van ser realitzades 6 dies després de l'inici dels zels. Es va determinar el nombre de cossos lutis (CL) i de fol·licles persistents (FP). Es van analitzar els percentatges d'ovelles ovulades (almenys 1 CL funcional) i superovulades (almenys 3 CL funcionals). Es van llavar els uters i es van registrar les estructures recuperades (ER: ovòcits sense fertilitzar i embrions). Els embrions (ET) van ser avaluats morfològicament i es van registrar aquells viables (de qualitat excel·lent o bona; EV). Es van analitzar els percentatges de recuperació (ER/CL), fertilització (ET/ER) i viabilitat (EV/ET). Es va extraure sang per a ser analitzada per RIA i calcular P4 al moment de la recuperació d'embrions. Les variables van ser analitzades per Chi-cuadrado o Test Exacte de Fisher, o per Anàlisi de Variància segons corresponguera. En l'**Experiment 1**, al comparar A1, B1 i C1, es van obtenir els resultats que es detallen a continuació. L'inici del zel i el pic de LH van ocórrer més prompte en aquelles ovelles en les quals es va incloure en el tractament eCG (A1) ( $P < 0,05$ ). La concentració de P4 al zel va ser major ( $P < 0,05$ ) para A1. La taxa de superovulació va diferir entre A1 i C1 (100% i 58,3%;  $P < 0,05$ ). La taxa ovulatòria va ser major en A1 ( $13,8 \pm 1,9$ ) que en B1 ( $6,2 \pm 1,1$ ) o C1 ( $4,8 \pm 1,0$ ) ( $P < 0,05$ ). El nombre de fol·licles persistents no va dependre del tractament ( $P > 0,10$ ). La producció de P4 per cos luti no va diferir entre els grups, si bé la concentració total més elevada es va produir en A1 per la seua major taxa ovulatòria ( $P < 0,05$ ). La quantitat d'estructures recuperades va ser major en A1 ( $8,4 \pm 1,4$ ) que en B1 ( $3,1 \pm 1,1$ ) o C1 ( $3,2 \pm 1,1$ ) ( $P < 0,05$ ). El grup A1 va tendir a produir més embrions ( $5,4 \pm 1,6$ ) que B1 ( $1,4 \pm 0,4$ ) ( $P = 0,06$ ). No obstant, C1 va tindre taxes de fertilització i de viabilitat superiors (89,7% i 76,9% en C1 vs. 64,2% i 53,2% en A1, i 45,9% i 40,5% en B1;  $P < 0,05$ ). Finalment, A1 va tendir ( $P = 0,08$ ) a produir més embrions viables ( $4,5 \pm 1,3$ ), especialment comparat amb B1 ( $1,2 \pm 0,4$ ). L'alternativa de repartir la FSHo en 6 dosis iguals (D1) en compte de 4 (B1), si bé no va aconseguir augmentar la taxa ovulatòria, va paréixer millorar ( $P < 0,05$ ) les taxes de recuperació (65,4% vs. 49,3%), de fertilització (82,3% vs. 45,9%) i de viabilitat (72,5% vs. 40,5%) i per tant el nombre d'embrions viables ( $3,1 \pm 0,7$  vs.  $1,2 \pm 0,4$ ;  $P < 0,05$ ). L'opció de combinar eCG a la

FSHo administrada en 4 dosis iguals (E1) o en una única injecció en PVP (F1) va acurtar els intervals al zel i al pic de LH ( $P < 0,05$ ). El grup E1 va tindre majors taxes de fertilització i de viabilitat que B1 (78,3% vs. 45,9% i 73,9% vs. 40,5%;  $P < 0,05$ ), però a pesar de duplicar la quantitat d'embrions viables ( $2,8 \pm 1,7$  vs.  $1,2 \pm 0,4$ ) les diferències no van ser significatives. El grup F1 va superar el baix percentatge de superovulació de C1 (100% vs. 58,3%) i va augmentar la quantitat de cossos lutis (F1:  $9,4 \pm 1,4$  i C1:  $4,8 \pm 1,0$ ). No obstant, no va augmentar la producció d'embrions viables (F1:  $3,0 \pm 0,9$  i C1:  $2,5 \pm 0,9$ ;  $P > 0,10$ ) a causa de la seua baixa taxa de recuperació (F1: 53% vs. C1: 68,4%;  $P < 0,05$ ). En l'**Experiment 2**, el protocol convencional (C2) va retardar l'inici dels zels i el pic de LH ( $30,4 \pm 1,7$  i  $33,3 \pm 2,5$  h en C2 vs.  $22,0 \pm 1,4$  i  $24,6 \pm 2,4$  h en A2, i  $20,1 \pm 1,0$  i  $19,0 \pm 1,8$  h en B2;  $P < 0,05$ ). Les taxes ovulatòries van ser elevades, sense diferències entre grups. C2 va tindre una baixa incidència de fol·licles persistents ( $0,3 \pm 0,2$ ), sent significativa la seua diferència amb A2 ( $1,3 \pm 0,5$ ) ( $P < 0,10$ ). La concentració de P4 per cos luti va ser inferior ( $P < 0,05$ ) en C2 en comparació amb A2 i B2. La taxa de recuperació va ser major en C2 (72,5% vs. 57,3% en A2 i 56,7% en B2;  $P < 0,05$ ), però la quantitat d'estructures recuperades va ser semblant. La taxa de fertilització va dependre del tractament (A2: 54,2%; B2: 81,6% i C2: 93,9%;  $P < 0,05$ ), de manera que el grup C2 va tendir a produir més embrions ( $7,3 \pm 1,0$  vs.  $4,3 \pm 1,1$  en A2 i  $4,8 \pm 0,8$  en B2;  $P = 0,07$ ). La viabilitat embrionària va ser menor en A2 (42,4%) en comparació amb B2 (68,4%) i C2 (71,2%) ( $P < 0,05$ ). La quantitat d'embrions amb viabilitat no va dependre del tractament ( $3,3 \pm 1,0$ ;  $4,0 \pm 0,8$  y  $5,5 \pm 0,8$  para A2, B2 y C2;  $P > 0,10$ ). En conclusió, l'estudi demostra la possibilitat d'emprar protocols simplificats per a superovular ovelles Corriedale durant la tardor. Entre ells, l'administració d'una dosi reduïda de FSHo en única injecció junt amb eCG va resultar ser el règim superovulatori més apropiat per combinar simplicitat i menor dosi de la gonadotrofina (que implica reduir el cost) sense afectar la producció d'embrions.

**Paraules clau:** Superovulació, Ovins, Hormones, Embrions.

## INDICE GENERAL

	<b>Página</b>
TÍTULO, AUTOR y DIRECTOR	2
PREFACIO	3
AGRADECIMIENTOS	4
PUBLICACIONES DERIVADAS	6
GLOSARIO	8
RESUMEN	13
Palabras clave	15
ABSTRACT	16
Key words	18
RESUM	19
Paraules clau	21
ÍNDICE GENERAL	22
ÍNDICE DE TABLAS	26
ÍNDICE DE FIGURAS	28
I. INTRODUCCIÓN	31
1.1. PANORAMA DE LA PRODUCCIÓN OVINA EN ARGENTINA	31
1.1.1. Historia del ovino en Argentina	31
1.1.2. Efectivos ovinos, razas y regiones de explotación	32
1.1.3. Actualidad y perspectivas de la explotación ovina	36

1.2. LA RAZA CORRIEDALE	38
1.2.1. Origen y localización	38
1.2.2. Características morfológicas	39
1.2.3. Aspectos productivos	39
1.2.4. Aspectos reproductivos	40
1.3. SUPEROVULACIÓN EN OVINOS	42
1.3.1. Objetivos e importancia	42
1.3.2. Difusión, limitantes y perspectivas	48
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	51
2.1. ASPECTOS DE LA FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA DE LA OVEJA	51
2.1.1. Ciclo anual y su regulación	51
2.1.2. Ciclo estral y su regulación	52
2.1.3. Desarrollo folicular	57
2.2. TRATAMIENTOS SUPEROVULATORIOS	63
2.2.1. Principios del tratamiento	63
2.2.1.1. El tratamiento de sincronización	63
2.2.1.1.1. Progestágenos	63
2.2.1.1.2. Prostaglandinas	64
2.2.1.2. El tratamiento de estimulación ovárica	66
2.2.1.2.1. Gonadotrofina Coriónica Equina (eCG)	68
2.2.1.2.2. Hormona Folículo Estimulante (FSH)	71

2.2.2. Simplificación de los protocolos de administración de FSH	76
2.2.2.1. Dosis decrecientes vs. dosis constantes	76
2.2.2.2. Administración en una única inyección	77
2.2.2.2.1. Utilización de vehículos salinos	77
2.2.2.2.2. Utilización de vehículos no salinos	78
2.2.2.2.2.1. Propilenglicol	79
2.2.2.2.2.2. Polivinilpirrolidona (PVP)	80
2.2.2.2.3. Combinación con eCG	84
2.2.3. Alteraciones endócrinas de la superovulación	87
2.2.3.1. Hormona Luteinizante	87
2.2.3.2. Estradiol	88
2.2.3.3. Progesterona	90
2.2.4. Factores que afectan la superovulación	94
III. OBJETIVOS	100
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	103
4.1. LOCALIZACIÓN DEL ENSAYO	103
4.2. ANIMALES EXPERIMENTALES	103
4.3. TRATAMIENTOS SUPEROVULATORIOS	104
4.3.1. Experimento 1	104
4.3.2. Experimento 2	106
4.4. SERVICIOS Y DETECCIÓN DE LOS CELOS	106
4.5. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA OVÁRICA	107



4.6. RECUPERACIÓN Y EVALUACIÓN EMBRIONARIA	108
4.7. ANÁLISIS HORMONALES	113
4.7.1. Análisis de LH	113
4.7.2. Análisis de progesterona	115
4.8. ANÁLISIS DE LOS DATOS	115
V. RESULTADOS	119
5.1. EXPERIMENTO 1	119
5.2. EXPERIMENTO 2	136
VI. DISCUSIÓN	149
6.1. PRESENTACIÓN DEL CELO Y PICO DE LH	149
6.2. FUNCIONALIDAD LUTEAL	151
6.3. SUPEROVULACIÓN Y PRODUCCIÓN DE EMBRIONES	154
VII. CONCLUSIONES	164
VIII. BIBLIOGRAFÍA	165
IX. ANEXOS	200
9.1. ANEXO I – ESTADIOS DEL DESARROLLO EMBRIONARIO	200
9.2. ANEXO II – EVALUACIÓN EMBRIONARIA	201

## INDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
Nº 1a: Experimento 1. Presentación del celo y niveles hormonales en ovejas Corriedale tratadas con 176 unidades NIH-FSH-S1 de FSHo, administradas en una única inyección junto con 500 UI eCG (Grupo A1), repartidas en cuatro dosis iguales (Grupo B1) o en única inyección en vehículo PVP (Grupo C1)	123
Nº 1b: Experimento 1. Respuesta ovárica y producción de embriones en ovejas Corriedale tratadas con 176 unidades NIH-FSH-S1 de FSHo, administradas en una única inyección junto con 500 UI eCG (Grupo A1), repartidas en cuatro dosis iguales (Grupo B1) o en única inyección en vehículo PVP (Grupo C1)	124
Nº 2a: Experimento 1. Presentación del celo y niveles hormonales en ovejas Corriedale tratadas con 176 unidades NIH-FSH-S1 de FSHo repartida en cuatro (Grupo B1) o seis (Grupo D1) dosis iguales	125
Nº 2b: Experimento 1. Respuesta ovárica y producción de embriones en ovejas Corriedale tratadas con 176 unidades NIH-FSH-S1 de FSHo repartida en cuatro (Grupo B1) o seis (Grupo D1) dosis iguales	126
Nº 3a: Experimento 1. Presentación del celo y niveles hormonales en ovejas Corriedale tratadas con 176 unidades NIH-FSH-S1 de FSHo, administradas en cuatro dosis iguales (Grupo B1) o con 132 unidades, administradas en cuatro dosis iguales y 500 UI eCG (Grupo E1)	127
Nº 3b: Experimento 1. Respuesta ovárica y producción de embriones en ovejas Corriedale tratadas con 176 unidades NIH-FSH-S1 de FSHo, administradas en cuatro dosis iguales (Grupo B1) o	128

con 132 unidades, administradas en cuatro dosis iguales y 500 UI eCG (Grupo E1)

- Nº 4a: Experimento 1. Presentación del celo y niveles hormonales en ovejas Corriedale tratadas con 176 unidades NIH-FSH-S1 de FSHo en única inyección en vehículo PVP (Grupo C1) o con 132 unidades en única inyección en vehículo PVP y 500 UI eCG (Grupo F1) 129
- Nº 4b: Experimento 1. Respuesta ovárica y producción de embriones en ovejas Corriedale tratadas con 176 unidades NIH-FSH-S1 de FSHo en única inyección en vehículo PVP (Grupo C1) o con 132 unidades en única inyección en vehículo PVP y 500 UI eCG (Grupo F1) 130
- Nº 5a: Experimento 2. Presentación del celo y niveles hormonales en ovejas Corriedale tratadas con 176 (Grupo A2) o 132 (Grupo B2) unidades NIH-FSH-S1 de FSHo y 500 UI eCG en única inyección, o con 176 unidades en ocho dosis decrecientes (Grupo C2) 139
- Nº 5b: Experimento 2. Respuesta ovárica y producción de embriones en ovejas Corriedale tratadas con 176 (Grupo A2) o 132 (Grupo B2) unidades NIH-FSH-S1 de FSHo y 500 UI eCG en única inyección, o con 176 unidades en ocho dosis decrecientes (Grupo C2) 140

## INDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Nº 1: Regiones de producción ovina y sus principales razas	35
Nº 2: Explotación de ovinos en la Provincia de Buenos Aires (rebaño de raza Corriedale de INTA Balcarce)	36
Nº 3: Ovejas de raza Corriedale	41
Nº 4: Representación esquemática del desarrollo folicular y de los perfiles hormonales durante el ciclo estral de la oveja	62
Nº 5: Estructuras ováricas	108
Nº 6: Recuperación de los embriones mediante laparotomía	109
Nº 7: Búsqueda de los embriones bajo microscopio	110
Nº 8: Embriones no viables	111
Nº 9: Embriones viables	112
Nº 10: Concentraciones plasmáticas periovulatorias de LH (ng/ml) en ovejas Corriedale tratadas con 176 unidades NIH-FSH-S1 de FSHo, administradas en una única inyección junto con 500 UI eCG (Grupo A1; n=11), repartidas en cuatro dosis iguales (Grupo B1; n=10) o en única inyección en vehículo PVP (Grupo C1; n=10)	131
Nº 11: Concentraciones plasmáticas periovulatorias de LH (ng/ml) en ovejas Corriedale tratadas con 176 unidades NIH-FSH-S1 de FSHo repartidas en cuatro dosis iguales (Grupo B1; n=10) o en única inyección en vehículo PVP (Grupo C1; n=10). Se grafican las curvas para los dos ensayos en los que se emplearon estos protocolos.	132

- Nº 12: Concentraciones plasmáticas periovulatorias de LH (ng/ml) en ovejas Corriedale tratadas con 176 unidades NIH-FSH-S1 de FSHo repartidas en cuatro (Grupo B1; n=10) o seis dosis iguales (Grupo D1; n=10) 133
- Nº 13: Concentraciones plasmáticas periovulatorias de LH (ng/ml) en ovejas Corriedale tratadas con 176 unidades NIH-FSH-S1 de FSHo administradas en cuatro dosis iguales (Grupo B1; n=10) o con 132 unidades administradas en cuatro dosis iguales y 500 UI eCG (Grupo E1; n=7) 134
- Nº 14: Concentraciones plasmáticas periovulatorias de LH (ng/ml) en ovejas Corriedale tratadas con 176 unidades NIH-FSH-S1 de FSHo en una única inyección en vehículo PVP (Grupo C1; n=10) o con 132 unidades iguales en única inyección en vehículo PVP y 500 UI eCG (Grupo F1; n=7) 135
- Nº 15: Concentraciones plasmáticas periovulatorias de LH (ng/ml) en ovejas Corriedale tratadas con 176 (Grupo A2; n=10) o 132 (Grupo B2; n=6) unidades NIH-FSH-S1 de FSHo y 500 UI eCG en única inyección, o con 176 unidades en ocho dosis decrecientes (Grupo C2; n=9) 141
- Nº 16: Relación entre el intervalo al celo y la tasa ovulatoria en ovejas Corriedale estimuladas mediante tratamientos hormonales que incluyen eCG (Grupos A1, E1, F1, A2 y B2) 142
- Nº 17: Relación entre el intervalo al celo y la tasa ovulatoria en ovejas Corriedale estimuladas mediante tratamientos hormonales que no incluyen eCG (Grupos B1, C1, D1 y C2) 143
- Nº 18: Relación entre el intervalo al pico de LH y la tasa ovulatoria en ovejas Corriedale estimuladas mediante tratamientos hormonales que incluyen eCG (Grupos A1, E1, F1, A2 y B2) 144

Nº 19: Relación entre el intervalo al pico de LH y la tasa ovulatoria en ovejas Corriedale estimuladas mediante tratamientos hormonales que no incluyen eCG (Grupos B1, C1, D1 y C2)	145
Nº 20a, 20b, 20c, 20d, 20e: Presentación de casos atípicos	146
Nº 20a: Caso de una oveja perteneciente al grupo C1	146
Nº 20b: Caso de una oveja perteneciente al grupo D1	146
Nº 20c: Caso de una oveja perteneciente al grupo D1	147
Nº 20d: Caso de una oveja perteneciente al grupo A2	147
Nº 20e: Caso de una oveja perteneciente al grupo B2	148

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1. PANORAMA DE LA PRODUCCIÓN OVINA EN ARGENTINA

#### 1.1.1. Historia del ovino en Argentina

En América no existían ovinos antes de la llegada de los conquistadores españoles. El origen genético de los ovinos que iniciaron la formación de la población argentina fueron supuestamente las ovejas denominadas Churras y Montañesas Españolas y algunos pocos ejemplares de rebaños de rechazo del tipo Merino, que se embarcaron hacia América durante los primeros años de la conquista española (Calvo, 1978). La crianza de estos animales fue descuidada y sobre la base de apareamientos realizados en forma azarosa se conformó el tipo actualmente denominado criollo.

La introducción de las razas ovinas mejoradas aconteció más tardíamente. Hacia principios del siglo XIX, debido a la importancia que iba adquiriendo el comercio internacional de lanas, comenzó un proceso de absorción de las ovejas criollas con la introducción de la raza Merino procedente de Europa. En este siglo, la producción ovina Argentina se constituyó en la actividad agropecuaria más rentable y en el motor del acelerado proceso de acumulación capitalista. El principal producto de exportación era la lana, desarrollada principalmente en la Provincia de Buenos Aires. La actividad era dependiente de los precios internacionales; cuando éstos se modificaron la carne ovina cobró importancia, siendo posible la exportación de carnes congeladas debido al desarrollo de la industria frigorífica. Para satisfacer esta demanda, hacia el año 1860, se importaron los primeros ejemplares de la raza Lincoln, más apta para la producción cárnica. Hasta fines del siglo XIX la exportación de reses ovinas fue mayor que la de reses vacunas (Sábato, 1989). Según datos extraídos de diversas fuentes como INDEC (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos) y SAGPyA (a) (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación),

entonces el país contaba con unos 74 millones de cabezas ovinas. El ingreso de otras razas ovinas, principalmente doble propósito, aconteció a partir de principios del siglo XX.

Durante el siglo XX se registró una fuerte disminución del stock ovino por diferentes motivos. La ganadería vacuna comenzó a ocupar un lugar importante junto a la agricultura en la región Pampeana, zona de mayor potencial productivo. Estas dos actividades fueron paulatinamente desplazando a la ovina hacia otras regiones del país con mayores restricciones agroecológicas, principalmente la Patagónica. Otros problemas, tales como la desertificación en la Patagonia, los vaivenes en el mercado internacional, la existencia de mercados y canales de comercialización poco transparentes para el productor y la falta de aplicación de tecnología en la producción ovina con respecto a otras actividades competitivas, habrían de ahondar la crisis del sector ovino (Müller, 1998).

### **1.1.2. Efectivos ovinos, razas y regiones de explotación**

El último Censo Nacional Agropecuario, que data del año 2002, registró un stock de 12.558.904 cabezas ovinas, distribuido en 55.843 establecimientos agropecuarios (INDEC). A pesar de no disponerse de censos más recientes, se estima que para el año 2006 esta cifra habría aumentado a unos 16 millones (SAGPyA (a)).

La población ovina argentina se halla integrada por razas de distintas aptitudes:

- Laneras: Merino.
- Carniceras: Hampshire Down, Southdown, Scottish Black Face.
- Lecheras: Frisona, Manchega, Pampinta.
- Doble propósito (lana y carne): Corriedale, Romney Marsh, Ideal, Lincoln.
- Triple propósito (carne, lana y leche): Texel.



- Peleteras: Karakul.
- Tipos primitivos: Criolla.

El mayor porcentaje de las razas utilizadas en el país son orientadas a la producción de lana y al doble propósito lana-carne. Cerca del 44,8% del stock está constituido por la raza Merino, seguida por el 37,9% de Corriedale. Las razas restantes tienen una participación muy por debajo de estas dos prioritarias (Müller, 2005).

En cuanto a su localización, la actividad ovina se concentra principalmente en la región Patagónica, con el 67% del stock nacional. Seguidamente, se halla la región Pampeana con el 11%, la región Mesopotámica con el 10%, el Noroeste con 5%, en tanto que el 7% corresponde al resto del país (INDEC) (Figura 1).

Las características generales de las regiones de cría ovina se detallan a continuación:

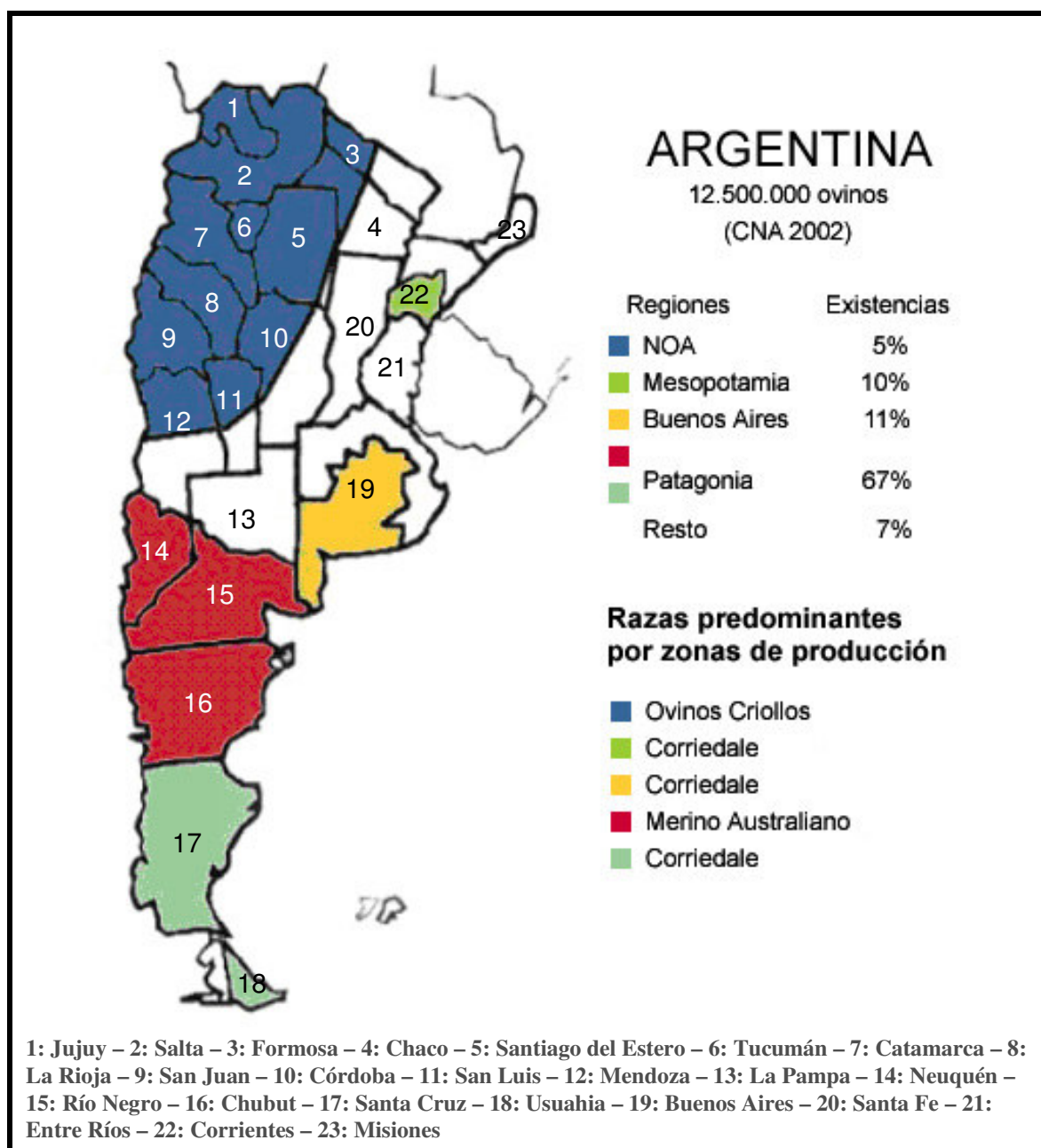
- Patagonia: es una región con grandes limitantes agroecológicas, donde la explotación ovina es casi la única actividad, teniendo una fuerte orientación hacia lana. Se explotan ovinos en sistemas de producción muy extensivos, es decir con una muy baja carga animal por unidad de superficie, basados en la utilización del pastizal natural, muchas veces en condiciones de desertificación. Los rebaños son muy numerosos, su objetivo de explotación es netamente comercial y es la región que a pesar de sus limitantes, posee la mayor aplicación tecnológica. La raza predominante es Merino, seguida por Corriedale y sus cruza.
- Provincia de Buenos Aires: esta zona presenta las mejores condiciones competitivas, tanto edafoclimáticas que permiten una explotación más intensiva, como de comercialización debido a su cercanía a los principales centros de consumo. Se desarrollan mayoritariamente la agricultura y la ganadería vacuna, con un mayor grado de utilización de pasturas implantadas. La cría ovina, tan importante en el pasado, tiene actualmente un rol secundario, falta la aplicación tecnológica y en muchas ocasiones el rebaño se

halla relegado al autoconsumo. Se explotan ovinos con diferentes propósitos: carne, lana y/o leche, siendo la raza que presenta mayor número de animales la Corriedale, aunque se encuentran muchas otras más, como Romney Marsh, Lincoln, Hampshire Down, Texel, Merino y Frisona.

- Mesopotamia: los sistemas de explotación son mixtos (vacuno y ovino), con predominio del campo natural con características de monte. Los rebaños son criados con fines comerciales, y junto con la ganadería vacuna, contribuyen a los ingresos de los establecimientos. Se crían principalmente ovinos de doble propósito (lana y carne). La raza predominante es Corriedale, seguida muy por debajo por Romney Marsh e Ideal.
- Región del Noroeste: es una región con limitantes edafoclimáticas. Las explotaciones son minifundistas, basadas en una ganadería de subsistencia donde predomina el ovino tipo Criollo sin mejora genética y generalmente en convivencia con el caprino. Más actualmente, la raza Corriedale ha sido introducida en la región con el objetivo de mejorar la producción local a partir de su cruzamiento sobre la base de ovinos tipo Criollo.

En síntesis, los sistemas de producción más difundidos en el país son semi-extensivos a extensivos, con superficies extensas y cargas animales bajas (entre 10 y 0,1 ovinos/ha, dependiendo de las zonas de explotación). La explotación se basa en la utilización de campo natural o pastos implantados, siendo poco frecuente que se recurra a la suplementación. Estas características condicionan muy particularmente el esquema productivo, existiendo una baja intervención humana; en muchas situaciones (especialmente en la región Patagónica) el personal entra en contacto con los animales 3 o 4 veces al año, cuando se esquila, se baña o se identifica (Cátedra de “Ovinos, Caprinos y Camélidos Sudamericanos, UNLZ).

**Figura 1:** Regiones de producción ovina y sus principales razas.



**Figura 2:** Explotación de ovinos en la Provincia de Buenos Aires (rebaño de raza Corriedale de INTA Balcarce)



### **1.1.3. Actualidad y perspectivas de la explotación ovina**

Como se ha indicado, el sector ovino Argentino orienta su producción principalmente a lana. Según la Federación Lanera Argentina (FLA), la producción de lana se estima en unas 72.000 toneladas base sucia para la campaña 2005/06 (citado por SRA). La Patagonia es la región que mayor producción de lana aporta, siendo éstas las lanas más finas, y por lo tanto las de mayor valor económico. De esta producción, cerca del 80% se destina a la exportación, registrándose unas 56.890 toneladas de lana base sucia exportadas (ya sea sucia o con algún grado de elaboración) para esa misma campaña. Los principales destinos de las exportaciones de lanas argentinas fueron Alemania, Italia, China y México,

quienes concentraron más del 63% de las mismas. En cuanto a la participación de las distintas finuras de lana en las exportaciones, Argentina exporta lana de todas las finuras comerciales. Del total exportado, el 54% corresponde a lanas finas (especialmente entre 20 y 21,9 micras, rango que representó para la campaña 2005/06 algo más del 30% de las exportaciones), el 41% a lanas medianas (entre las cuales se hallan las aportadas por los rebaños Corriedale) y el 4% restante a lanas gruesas (FLA; SAGPyA (a); SRA).

La producción de carne ovina fue estimada en 51.700 toneladas para el año 2005 (FAO). El destino de la carne es básicamente para consumo en los mismos establecimientos y para la venta local, siendo escaso el volumen que se comercializa en los grandes centros de consumo. En cuanto al mercado interno, las posibilidades de consumo de carne ovina son prometedoras. La exportación de carne ovina para la campaña 2005/06 alcanzó las 8.288 toneladas (SAGPyA), teniendo Argentina un cupo máximo de exportación para la Unión Europea (nuestro principal comprador) que suele rondar las 20.000 toneladas. Es importante destacar que en los últimos años y a partir de la modificación del tipo de cambio (devaluación de la moneda argentina), se produjo un importante incremento en las exportaciones. En cuanto a la procedencia, actualmente sólo es posible exportar desde el sur del paralelo 42 (Patagonia) debido a restricciones sanitarias. El principal importador de las carnes ovinas argentinas es España, quien para la citada campaña compró el 53% de las ventas argentinas destinadas a los países europeos (SAGPyA (a)).

Recientemente, la economía del sector ovino se ha visto beneficiada por la mejora de los precios internacionales de la lana y el tipo de cambio (\$/US\$) a partir de la salida de la convertibilidad (paridad cambiaria), que favorece la exportación. A esta situación debemos sumar la reglamentación de la Ley de fomento para la "Recuperación de la Ganadería Ovina" (Ley N° 25.422, del año 2002), diseñada con participación de los productores, los gobiernos provinciales, los legisladores y la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación (SAGPyA), y cuyo principal objetivo consistió en establecer una política de transformación. Bajo este panorama, la producción ovina se presenta como una alternativa muy promisoría. Para potenciar la explotación ovina resulta vital

aumentar la eficiencia de los sistemas productivos mediante la aplicación de diferentes medidas de mejora tecnológica: reproductivas, nutricionales, sanitarias y genéticas. Entre ellas, la implementación de ciertas técnicas reproductivas, tales como la inseminación artificial (IA) y la superovulación y transferencia embrionaria (MOET) permitirían aumentar rápidamente la mejora genética de los rebaños.

## **1.2. LA RAZA CORRIEDALE**

### **1.2.1. Origen y localización**

Originaria de Nueva Zelanda, el objetivo fue generar un animal capaz de dar en forma constante los corderos y vellones producidos por los mestizos de Merino por razas de lana larga. En las primeras etapas de formación del Corriedale, como razas de lana larga intervinieron el Lincoln, Leicester, Border Leicester y Romney Marsh, pero luego la preponderancia del Lincoln se fue haciendo cada vez mayor. Entonces se realizaron cruzamientos entre carneros Lincoln y ovejas Merino Australiano para generarse finalmente la raza Corriedale, con igual proporción de sangre de ambas razas parenterales (Pérez Álvarez y col., 1989).

La raza Corriedale se adapta a ambientes muy variados en suelo, clima y altura. De gran distribución extensiva en el mundo, los núcleos más importantes se hallan en Uruguay, Argentina, Australia, Nva. Zelanda, Brasil, Chile, Perú y USA. Actualmente su mayor difusión está en Sudamérica (Pérez Álvarez y col., 1989).

Su ingreso en Argentina se dio hacia 1910 conjuntamente en Tierra del Fuego (sur de Patagonia) y Buenos Aires. A partir de entonces, como consecuencia de su adaptación, se extendió en todo el país. En su momento, era la raza prioritaria. En la actualidad, en virtud del gran descenso de las existencias ovinas ocurrido en todas las regiones pero en especial en Pradera Pampeana, ocupa el segundo lugar (37,9% de las existencias totales del país) tras el Merino.

Sin embargo, a diferencia de éste que se concentra en la Patagonia, la raza Corriedale logra una distribución mayor en toda la superficie territorial. Actualmente se cría en todas las regiones de explotación ovina: Pradera Pampeana, Litoral, Patagonia (sur de Sta. Cruz y Tierra del Fuego). Además, en la región del Noroeste está siendo cruzada con la criolla (Cátedra de “Ovinos, Caprinos y Camélidos Sudamericanos, UNLZ).

### **1.2.2. Características morfológicas**

Presenta cabeza con forma de cono truncado, de hocico ancho y cuadrado. Posee ollares anchos y gruesos, de coloración oscura, aunque no necesariamente negra. Lana blanca y suave sobre la nariz. Su cara es algo tapada, tendiendo a descubrirla, con lana formando copete que no avance sobre el puente nasal, bajo el nivel de una línea trazada desde la base de las orejas hasta los ojos, continuándola hacia la nariz a ese nivel. Provista de orejas con lana, medianas y orientadas hacia delante, semierectas de grosor medio. Carece de cuernos. Presenta sus mucosas y pezuñas de color negro. Su piel es lisa. Sus extremidades no son largas, pero tampoco cortas, y están libres de fibras coloreadas (Pérez Álvarez y col., 1989). La Figura 3 presenta ovejas Corriedale selectas donde pueden apreciarse sus características raciales.

### **1.2.3. Aspectos productivos**

Productivamente, se considera de doble aptitud, bien equilibrada entre lana y carne.

Produce un vellón semidenso ( $29 \text{ fibras/mm}^2$ ) con buena aceptación comercial, clasificado como “cruza fina”, con un diámetro promedio de fibra entre 25 y 29 micras y un largo de mecha entre 10 y 15 cm de crecimiento anual (Pérez Álvarez y col., 1989). Los valores de finura de la lana serían un poco más gruesos para el país (27 a 31 micrones), aunque es un parámetro variable en función de las

regiones. En algunas resulta demasiado gruesa y falta calidad, mientras que en otras, especialmente Patagonia, destaca por su buen color y finura (Müller, 2005).

En cuanto a sus características carniceras, presenta un cuerpo moderadamente ancho y profundo con costillas de buen arqueado y buenas masas musculares, características imprimidas por Lincoln. Para la producción de corderos, la oveja Corriedale posee muy buenas condiciones para criar los corderos durante los primeros meses de vida. De este modo, su buena precocidad y condiciones de maduración temprana determinan un engorde rápido, comercializándose en general los corderos de destete (Pérez Álvarez y col., 1989).

#### **1.2.4. Aspectos reproductivos**

En cuanto a sus aspectos reproductivos, presenta una estacionalidad intermedia entre Merino (muy poco estacional) y Lincoln (de marcada estacionalidad reproductiva). La época otoñal corresponde a la de mayor actividad ovárica (Fort y col., 1992; Sánchez y col., 1994). Sin embargo, la duración de la estación reproductiva parece no estar tan claramente definida. Un ensayo realizado en la región semiárida pampeana (Fort y col., 1992) registra actividad estral a partir de febrero, mostrando un aumento de la tasa de celos hasta llegar a un máximo en el mes de abril. Por otro lado, un estudio realizado en el sudeste bonaerense (Sánchez y col., 1994) define los siguientes períodos: reposo sexual (menos del 20% de ciclicidad), comprendido entre agosto y enero; transición hacia la estación reproductiva (entre 20% y 50% de ciclicidad), de febrero a marzo; plena temporada sexual (más del 50% de ciclicidad), de abril a junio; finalmente, transición hacia el anestro (entre 50% y 20% de ciclicidad) durante el mes de julio. Un estudio realizado en Uruguay basado en los niveles plasmáticos de progesterona, sugiere que el inicio y fin de la actividad ovárica ocurren hacia mediados de febrero y mediados de julio, respectivamente (Perdigón y col., 1997). Fernández Abella (1993) señala una estación de cría más amplia, que en las ovejas Corriedale en Uruguay estaría entre noviembre-diciembre y junio-julio. En conjunto, a las diferencias de estacionalidad que tienen lugar en el seno de cada raza ovina



(Thimonier y Mauleón, 1969), hay que añadir la utilización de prácticas de manejo que pueden modificar el inicio de la estación de cría, tales como el efecto macho o la selección artificial del hombre al realizar los apareamientos en una época restringida del año. Así, cuando se emplean rebaños con una cubrición concentrada en el otoño y se refugan los animales que no resultan gestantes, se estarían eliminando probablemente ovejas que podrían empezar más tardíamente su actividad sexual y por ende podrían presentar estros en primavera. Esto podría contribuir a la explicación de las discrepancias bibliográficas junto con la variedad de latitud en la que se explota la raza. Otro aspecto reproductivo se refiere a la tasa ovulatoria y su modificación a lo largo de la estación sexual. La raza Corriedale se considera una raza de baja a mediana tendencia mellicera, con una tasa ovulatoria máxima en los meses de marzo-abril (Sánchez y col., 1994), abril (Fort y col., 1992) o mayo (Irazoqui y Menvielle, 1982) con valores medios de 1,2 (Sánchez y col., 1994) a 1,5 (Rodríguez Iglesias y col., 1991; Fort y col., 1992) óvulos liberados.

**Figura 3:** Ovejas de raza Corriedale.



### **1.3. SUPEROVULACIÓN EN OVINOS**

La superovulación, generalmente asociada a la transferencia de embriones, fue denominada con el término “MOET” (“multiple ovulation and embryo transfer”) por Nicholas y Smith en el año 1983. Ésta consiste en inducir mediante tratamientos hormonales una alta tasa ovulatoria en las hembras donantes para luego recuperar y transferir los embriones, directamente o tras su conservación, a otras hembras de la misma especie pero de menor valor, las cuales actúan a modo de receptoras para llevar a cabo la etapa de la gestación. Una reproductora donante podrá formar parte de un programa de transferencia en más de una oportunidad al objeto de multiplicar su potencial reproductivo (Bonino Morlán y col., 1989).

#### **1.3.1. Objetivos e importancia**

Los objetivos de la aplicación de las técnicas de superovulación y transferencia embrionaria se detallan a continuación.

- *Mejora genética:*

En los planes de mejora genética existen dos técnicas reproductivas tendientes a aumentar el progreso genético de los rebaños: la inseminación artificial y la superovulación seguida de la transferencia de embriones. La inseminación artificial tiene por finalidad incrementar la tasa reproductiva de los carneros. Consiste en la recolección artificial del semen seguida por su deposición en el tracto reproductivo de las hembras en celo para producir la fecundación de los óvulos maduros. De este modo, la obtención y fraccionamiento del semen de un carnero evaluado como genéticamente superior, permite acelerar la mejora de las características productivas de los rebaños al aumentar el número de crías logradas con respecto a las que se obtendrían en monta natural con el mismo carnero. Por su parte, las técnicas de superovulación y transferencia de embriones permiten mejorar la tasa reproductiva de las hembras, al lograrse un

mayor número de crías por oveja en un período determinado. De esta manera, la limitante que constituye el bajo número de crías que pueden lograrse a partir de una hembra, podría ser superada mediante estas técnicas. Sin embargo, la presión de selección de la oveja donante, a diferencia del carnero, no puede ser muy elevada, constituyendo ésta una de las limitantes más importantes para el uso de las técnicas MOET en los planes de mejora. No obstante, la mayor tasa reproductiva que se logra mediante la superovulación y transferencia embrionaria permite aumentar la presión de selección ya sea por disponer de un mayor número de crías por hembra para destinar a la selección de los reemplazos, como por permitir reducir el número de madres seleccionadas de una generación para procrear la generación siguiente de reproductores. También es posible acortar el intervalo generacional cuando las donantes son hembras jóvenes (borregas) y las receptoras son de mayor edad.

La magnitud del efecto sobre la mejora genética es inversamente proporcional a la fecundidad de la raza. En razas de baja fecundidad el mejoramiento logrado con estas técnicas puede llegar a duplicar al obtenido mediante la reproducción natural. A su vez, se obtiene un mayor beneficio en cuanto a la mejora cuando las borregas superovuladas son inseminadas con borregos superiores (Müller, 1993).

- *Introducción y difusión rápida de especies, razas o genotipos de interés:*

Mediante el comercio de embriones es posible introducir genotipos exóticos, o aquellos que a pesar de presentar una limitada difusión local tienen importancia potencial en un mercado y ambiente cambiantes que buscan diversificar la producción o hacerla más eficiente. Un análisis de la magnitud de la difusión de genes superiores mediante técnicas MOET es realizado por Müller (1993). En su ejemplo sobre la multiplicación de genotipos, supone que si de una oveja pudieran lograrse 5 hijas por MOET y el procedimiento se repitiera sucesivamente en las hijas, al cabo de 10 años podrían haberse generado unas 30.000 crías. Esta descendencia aumentaría notablemente en el caso de realizar las técnicas MOET más de una vez por oveja. Este mismo autor (Müller, 1993) efectúa otro análisis suponiendo que se deseara absorber un rebaño por la

sangre superior que aportan carneros exóticos bajo los supuestos de una tasa anual de reposición del 25% y de que las borregas producen por MOET igual cantidad de crías que el rebaño en su conjunto en reproducción natural. Al cabo de 4 años, las borregas nacidas por MOET son  $\frac{3}{4}$  contra  $\frac{1}{2}$  sangre de aquellas nacidas por reproducción natural, en un plan de absorción por retrocruzamiento normal. De esta forma, con técnicas MOET se llegaría en 6 años a la nueva raza, en tanto que se demoraría 10 años por reproducción natural.

- *Conservación indefinida de especies, razas o individuos y mantenimiento de la diversidad genética:*

Actualmente, se vislumbra a nivel mundial una tendencia a disminuir la diversidad genética en la mayoría de las especies de interés zootécnico. Existe una tendencia hacia la 'globalización' en el uso de las razas, de modo que cada vez más un número limitado de razas son explotadas en el mundo. Contrariamente, existen otras razas o tipos que son poco valorados zootécnicamente, tal como sucede con numerosas razas salvajes y locales cuyo uso se reduce progresivamente hasta amenazar su existencia a corto o medio plazo. Una de las razones para mantener razas salvajes y locales radica en que ellas suelen estar perfectamente adaptadas al clima o terreno locales además de tener ciertas características demandadas para la elaboración de productos regionales que las identifican. Finalmente, por supuesto, las razas locales son valoradas como patrimonio cultural. Aquellas razas menos difundidas tienden a ser mantenidas sólo localmente y a menudo en poblaciones reducidas. En estas poblaciones pequeñas, la diversidad se pierde como resultado de la deriva genética.

Por otro lado, a pesar de que las razas comerciales están representadas por un gran número de animales, la diversidad genética de las mismas puede también ser pequeña debido a la selección de un bajo número de reproductores para dar lugar a una progenie numerosa, lo que conduce a una alta tasa de consanguinidad. Generalmente, la consanguinidad está asociada con una mayor frecuencia de enfermedades hereditarias, malformaciones o disfunciones. La diversidad genética permite disminuir la consanguinidad. Además, se necesita

diversidad genética como una herramienta para la continua explotación. El material genético que puede almacenarse para constituir un banco de germoplasma son los gametos y los embriones, y su estrategia de elección depende del objetivo que se persiga. En el caso de buscar aumentar la diversidad genética, se buscará un intercambio frecuente con la población, lo cual hace que el semen sea la mejor opción. Para el propósito de preservar ciertas razas y ser capaces de restablecerla cuando sea necesario, el almacenamiento de embriones es la mejor alternativa. En muchos países, el establecimiento de bancos genéticos está cobrando interés, especialmente para mantener razas salvajes y locales de varias especies, entre ellas la ovina (Woelders y col., 2004). Woelders y col. (2003) destacan que se necesitan solamente 200 embriones almacenados para mantener una raza. Sin embargo, debido al elevado costo de producción de embriones, la conservación de este material genético aún no ha sido utilizada frecuentemente en la preservación de razas amenazadas de extinción.

- *Comercio internacional de material genético:*

La importación/exportación de genética ha sido promovida con la finalidad de mejorar los rebaños, aumentar la variabilidad o introducir otras razas. La comercialización de genética puede realizarse en forma de animales en pie, semen o embriones. El traslado de animales en pie tiene las ventajas de ser el 100% del genotipo deseado y usualmente de edad reproductiva, con lo cual el impacto sobre la majada es inmediato. Sin embargo, tiene varias limitantes importantes tales como el riesgo sanitario que conlleva la difusión de enfermedades; el elevado costo del transporte a larga distancia; la puesta en cuarentena en el lugar de destino; los riesgos de accidentes durante el transporte y/o cuarentena y las dificultades de adaptación al nuevo ambiente, que incluso pueden resultar en una alta morbilidad si existen diferencias muy marcadas en el manejo, clima o enfermedades endémicas. La comercialización de genética en forma de semen tiene las ventajas de: menor costo; bajo riesgo de transmisión de enfermedades; logística para su transporte más simple; permite una distribución masiva de los genes; vigor híbrido en el caso de cruzar razas; inmunidad pasiva proveniente de las madres nativas. Sin embargo, sus desventajas son: las crías

tendrán sólo el 50% de los nuevos genes, con lo cual se demandará tiempo para lograr la pureza racial; las crías no serán productivas sino hasta uno o dos años; necesidad de contar con la tecnología de inseminación artificial. La comercialización de genética en forma de embriones resulta en general el mejor método para la migración de genes, debido a sus ventajas competitivas: se obtienen el 100% de los genes deseados; el coste es generalmente más bajo que el de animales en pie; el riesgo de transmisión de enfermedades es muy bajo; la logística de transporte es simple; también existe inmunidad pasiva vía materna. No obstante y al igual que para la inseminación artificial, llevará un tiempo hasta que los animales de esa nueva genética sean productivos y se necesitará la adopción de la tecnología de transferencia embrionaria (Seidel y Seidel, 1991; Thibier y Guerin, 2000).

- *Reducción de riesgos en la transmisión de enfermedades:*

El riesgo de transmitir enfermedades genéticas mediante la transferencia embrionaria es el mismo que el involucrado en la monta natural o en la inseminación artificial, es decir, no existe un aumento en la incidencia de anomalías genéticas debido a tales procedimientos (King y col., 1985). A pesar de las medidas sanitarias vigentes a nivel internacional, la propagación de enfermedades infecciosas está todavía asociada al intercambio de animales vivos. Si se siguen los procedimientos regulados, varios investigadores (Stringfellow, 1985; Hare, 1986; Hare y Seidel, 1987) avalan que el riesgo de transmitir enfermedades infecciosas vía transferencia embrionaria es menor que el que acarrea la monta natural o la inseminación artificial. Esta mayor seguridad radica en las características físicas del embrión y en la habilidad para chequear la presencia de patógenos y poder eliminarlos. Antes de su recuperación, los embriones se hallan expuestos sólo al ambiente uterino de la donante. Por lo tanto, aún cuando la donante estuviera infectada, existe una baja probabilidad de infección con otros patógenos que los presentes en el fluido uterino. Los virus raramente logran niveles infectantes en el fluido uterino y además los patógenos presentes allí con frecuencia no adhieren a los embriones. Los embriones, en los primeros estadios de su desarrollo, representan una barrera para la transmisión

de agentes patógenos debido a que su zona pelúcida es la protectora natural que aísla las células embrionarias de la mayor parte de los agentes infecciosos que pueden contaminar el medio uterino (Seidel y Seidel, 1991). Sin embargo, ciertos patógenos pueden adherir a la zona pelúcida, como así lo informa Hare (1986). Dichos embriones pueden ser descontaminados mediante el tratamiento con enzimas. Además, una buena parte de los agentes patógenos son eliminados con los sucesivos lavados a que son sometidos los embriones tras su recuperación. Finalmente, los medios de lavado llevan frecuentemente antibióticos. La posibilidad de infección de un embrión entre la colecta y la transferencia a la receptora puede ser controlada asegurando un ambiente estéril de trabajo. Finalmente y aún cuando el embrión estuviera infectado con patógenos adheridos, estos pocos organismos suelen ser eliminados por el cuerpo de la receptora sin causar infección (Seidel y Seidel, 1991). En síntesis, la reglamentación internacional de los protocolos de manipulación del material genético vigente en el Manual de la IETS (International Embryo Transfer Society, 1987) contribuye a evitar estos problemas sanitarios. Bajo estas condiciones, el riesgo de transmitir enfermedades por embriones resultaría insignificante, como ha sido corroborado por Philpott (1993). Por otra parte, cada país cuenta con su reglamentación para la importación y la exportación de embriones, dependiendo del 'status sanitario' según el informe de la OIE ("Office International des Epizooties"; "Oficina Internacional de Epizootias").

- *Aumento de la eficiencia del funcionamiento de los programas de selección:*

La eficiencia del funcionamiento de los programas de selección se incrementa mediante las técnicas MOET, ya que es posible mejorar la precisión de la estimación del valor genético de las hembras, para ciertas características de interés productivo, a partir de la información que aportan sus hermanas, medio hermanas e hijas (Müller, 1993).

- *Apoyo a otras técnicas reproductivas:*

Son técnicas en las que interviene la manipulación de embriones, como el sexaje y la clonación. Por ejemplo, en un futuro, embriones de un clon podrían ser

criopreservados, de modo que si un clon en particular resultara valioso, varios embriones clonados podrían ser obtenidos y diseminados en la población, con el consecuente impacto sobre el valor genético de la población (Seidel y Seidel, 1991).

### **1.3.2. Difusión, limitantes y perspectivas**

La superovulación y transferencia embrionaria es una tecnología relativamente reciente, que ha sido desarrollada hace unos 55 años.

La técnica es atractiva en todas las especies para lograr los objetivos citados con anterioridad. Sin embargo, tiene varias limitantes que contribuyen a su escasa difusión en comparación con otra tecnología como la inseminación artificial. Su coste es elevado y el número de embriones que pueden lograrse por hembra y por tratamiento es reducido. Otro inconveniente radica en que cierto porcentaje de hembras no responden a los tratamientos de superovulación, imposibilitando su multiplicación por técnicas MOET. Este porcentaje de hembras que fallan es difícil de predecir (Thibier, 2005a).

Las estadísticas disponibles sobre la cantidad de hembras superovuladas, la obtención y transferencia de embriones provienen de los reportes anuales presentados por organismos tales como AETE (“Association Europeenne de Transfert Embryonnaire”), AETA (“American Embryo Transfer Association”) y CETA (“Canadian Embryo Transfer Association”), y a nivel mundial, por la IETS (“Internacional Embryo Transfer Society”). Las estadísticas que ellos proveen estarían subestimadas debido a la dificultad para obtener información en algunas regiones.

Aunque las técnicas de superovulación y transferencia de embriones se han utilizado a nivel mundial en las diferentes especies de interés zootécnico, han logrado su mayor difusión en la especie bovina. Anualmente, unos 500.000 embriones bovinos son obtenidos en el mundo por multiovulación y transferidos. En comparación con la inseminación artificial, su difusión es mucho menor. Sin



embargo, es importante destacar que la mayoría de los toros en programas de inseminación artificial en el mundo proceden de embriones transferidos (Thibier, 2005a). En los últimos años, se ha informado el notable aumento de su difusión en Asia y América del Sur. En Argentina, durante el año 2004, se informaron unos 3018 lavados y la obtención de 13.840 embriones bovinos, posicionándose entre los principales 5 países fuera de Europa y América del Norte.

Las estadísticas para la especie ovina indican cifras cercanas a los 100.000 embriones transferibles generados por año en los últimos años, superiores a los tan sólo 10.000 reportados para el año 2001. Esta discrepancia no estaría relacionada con un aumento en la actividad, sino que es debido a la mayor información recolectada. Durante el 2004 se habrían obtenido 84.943 embriones, de los cuales 62.088 fueron transferidos directamente y 6.006 tras criopreservación (Thibier, 2005b). Tres países han contribuido principalmente a este número, Sudáfrica, Australia y Nueva Zelanda. En Sudáfrica, de 2.317 colectas se recuperaron 19.048 embriones totales, de los cuales las 2/3 partes fue clasificado como transferible, 913 fueron transferidos en fresco, 155 tras congelación y 6.666 fueron almacenados. En Australia, se estimaron unas 9.600 ovejas lavadas, de las cuales se obtuvieron unos 70.000 embriones transferibles, con 59.800 transferidos y cerca del 10% congelados. Los informes procedentes de Nueva Zelanda fueron muy parciales, ya que a pesar de que este país está activamente involucrado con la transferencia embrionaria ovina, sólo se refirieron 920 embriones transferidos.

Varios son los motivos de la escasa aplicación de las técnicas MOET en ovinos. En esta especie, en virtud de la imposibilidad del acceso al útero por la vía transcervical, los métodos empleados para la recuperación embrionaria son la laparotomía y a veces la laparoscopia. Estos métodos son invasivos y suelen limitar la cantidad de recuperaciones que pueden realizarse por hembra al ir generándose adherencias a medida que aumenta el número de intervenciones (Tervit y col., 1991). La predicción certera de la respuesta superovulatoria que permita decidir la conveniencia de proceder a la recuperación de embriones en una determinada donante está más limitada en ovinos. A tales efectos, la

ultrasonografía transrectal, generalmente empleada en vacas, en ovejas resulta no sólo laboriosa, sino además estresante para las hembras. Finalmente y más allá de estos inconvenientes técnicos, es importante destacar que las existencias ovinas mundiales son menos numerosas que las bovinas, los ovinos se distribuyen en regiones más marginales y su explotación está más relegada en términos de aplicación tecnológica.

En Argentina no se dispone de cifras oficiales con detalle y se sabe que la difusión de esta tecnología es muy reducida, aunque se habría incrementado en los últimos años. Recientemente varios productores están buscando introducir genética extranjera, especialmente de Australia y Nueva Zelanda, debido a la excelente genética disponible allí y a la restricción para importar de otros países por motivos sanitarios. La información provista por la SAGPyA señala que si bien en años previos no se habían importado embriones ovinos, durante el año 2004 se importaron 909 dosis de embriones de biotipo lanero, de las cuales el 80% (813 dosis) procedieron de Nueva Zelanda y el resto (96 dosis) de Australia. Además, la cantidad de dosis de semen ovino que se importó durante el 2004 fue cinco veces mayor que en el año 2003. Este interés en invertir en genética para mejorar la lana y/o carne de los rebaños se debe a que actualmente la producción ovina nacional se encuentra en una mejor condición, sumado a la situación macroeconómica en general y la aplicación del “Régimen para la Recuperación de la Ganadería Ovina” (Ley 25.422). A diferencia de otras razas importantes como la Merino, las opciones para la introducción de genética de raza Corriedale son escasas, ya que en los países más avanzados en genética ovina, tales como Nueva Zelanda y Australia, las poblaciones de Corriedale son reducidas (Müller, 2005).

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. ASPECTOS DE LA FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA DE LA OVEJA

La oveja es un rumiante poliéstrico estacional que posee un patrón reproductivo regido por dos ciclos: un ciclo anual y un ciclo estral.

#### 2.1.1. Ciclo anual y su regulación

El ciclo anual de la actividad ovárica está determinado por un patrón reproductivo en el que se diferencia una época de estación reproductiva (o de cría) y una época de anestro. Durante la estación de cría, las ovejas manifiestan comportamiento sexual (celo y aceptación de la monta) y ovulaciones espontáneas en forma cíclica, mientras que fuera de la estación reproductiva, es decir durante el anestro, no presentan conducta sexual ni ovulaciones. La amplitud de la estación reproductiva varía con las razas y representaría un mecanismo de adaptación a las condiciones del medio donde ellas se originaron, de modo que el nacimiento de las crías ocurra en un período favorable del año para su supervivencia y crecimiento. Independientemente de la duración de la estación de cría, todas las razas ovinas alcanzan su plenitud reproductiva en el otoño.

Dos mecanismos principales controlan las variaciones estacionales: (a) un ritmo endógeno circanual de actividad neuroendócrina que aparece cuando los animales son mantenidos experimentalmente en fotoperíodo constante (Karsch y col., 1989), y (b) los cambios de la duración del día y su interpretación por el sistema nervioso central. El proceso anual se halla bajo el control de la variación en la relación luz/oscuridad diaria (fotoperíodo) y está regulado por eventos endocrinos donde las hormonas cumplen un rol fundamental a través de mecanismos de retroacción positivo y negativo. La melatonina es secretada durante las horas de oscuridad por la glándula pineal y su mayor o menor secreción determina la sensibilidad del eje hipotálamo-hipófisis a la acción de los

estrógenos (E2), lo que regula la actividad pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH): los días largos aumentan la inhibición y los días cortos la disminuyen. De este modo, el fotoperíodo decreciente induce la actividad reproductiva (Marshall, 1937; Hafez, 1952; Karsch y col., 1984; Goodman, 1994).

### **2.1.2. Ciclo estral y su regulación**

El ciclo estral de la oveja tiene una duración promedio de 16 a 17 días (Marshall, 1904; Hafez, 1987) y se divide en dos fases:

- La fase luteal se extiende por 12 a 14 días y comprende las etapas de metaestro y diestro.
  - El metaestro es la fase que le sigue a la ovulación, durante la cual el remanente del folículo ovulado se transforma en una estructura luteal que impide la ovulación (Keyes y col., 1983; Fernández Abella, 1993).
  - El diestro ocurre a partir del día 5-7 del ciclo estral, cuando el cuerpo lúteo es funcional y segrega cantidades altas de progesterona (P4); el diestro continúa durante toda la gestación en caso de fecundación o sufre lisis hacia el día 12 a 14 para iniciarse una nueva fase folicular (Fernández Abella, 1993).
- La fase folicular se extiende unos 3 a 4 días y abarca las etapas de proestro y estro.
  - El proestro es el período que precede al estro, de una duración de 2 a 3 días; se inicia a partir de la regresión luteal y comprende la emergencia y el desarrollo del/los folículos ovulatorios (McDonald, 1991; Fernández Abella, 1993).
  - El estro o celo es definido como el período de receptividad sexual, su duración varía entre 12 y 50 horas dependiendo de varios factores (raza, edad, época, alimentación, contacto con machos) (Bindon y col., 1979;

Quirke y col., 1979; Hafez, 1987; Goodman, 1994). La oveja es bastante discreta con respecto a la manifestación del celo, siendo los signos más marcados la actitud de búsqueda del macho y la pasividad ante la monta. Otros signos, tales como orina más frecuente, nerviosismo, balidos, movimiento de la cola, hinchazón y enrojecimiento de la vulva y emisión de flujo cervical, no son tan manifiestos. La ovulación (día 0) se produce en forma espontánea y ocurre hacia el final del celo, unas 24 a 30 h después del inicio del mismo (Hafez, 1987).

La regulación del ciclo estral se halla bajo el control del eje hipotálamo-hipófisis que interactúa con los ovarios y el útero a través de la secreción de diferentes hormonas.

A nivel del sistema nervioso central, el hipotálamo produce GnRH. Los modelos propuestos por Karsch y col. (1984) y O'Callaghan y col. (1987) sostienen que la secreción hipotalámica es modulada tanto por estímulos externos (principalmente el fotoperíodo) como internos (esteroides ováricos, aunque también parecieran estar involucrados los opioideos endógenos; Brooks y col., 1983). La GnRH ejerce su acción sobre la hipófisis, donde regula la producción de las gonadotropinas LH (hormona luteinizante) y FSH (hormona folículo estimulante). Ambas son sintetizadas y almacenadas por las células de la adenohipófisis, para ser luego liberadas por exocitosis en respuesta a la estimulación de GnRH (Fawcett y col., 1969). Las gonadotropinas actúan a nivel ovárico, induciendo la síntesis de esteroides: E2 y P4, hormonas que a su vez por mecanismos de retroalimentación regulan la producción de gonadotropinas.

Durante la fase luteal, el cuerpo lúteo se desarrolla a partir del folículo ovulatorio en un proceso conocido como "luteinización". Este proceso se inicia siguiendo al pico preovulatorio de LH, donde por acción de esta hormona ocurren cambios morfológicos y bioquímicos en las células tecaes y de la granulosa del folículo (Baird, 1992). Luego de la ovulación la membrana basal se rompe, el remanente folicular se retrae y su antro se llena de sangre y linfa. Ocurre la formación de las células luteínicas a partir de las células de la granulosa que crecen acumulando lípidos y pigmentos luteínicos. Esta estructura en formación

se vasculariza a partir de los vasos de la teca que forman una red capilar (Rosell Pardo y col., 2004).

La progesterona es el principal producto de secreción del cuerpo lúteo y actúa básicamente sobre los órganos genitales, siendo responsable del establecimiento y mantenimiento de la gestación (Alila y Dowd, 1991). La producción de P4 es un indicador de la funcionalidad del cuerpo lúteo y para que se desarrolle una función luteínica normal es necesario un desarrollo preovulatorio normal (Rosell Pardo y col., 2004). Las concentraciones sanguíneas de P4 aumentan desde valores basales durante la fase folicular, para alcanzar durante la fase luteal niveles funcionales hacia el día 5 (el día 0 corresponde a la ovulación) y máximos cerca del día 7 a 9; estos niveles elevados se mantienen hasta el día 13 a 14 (Quirke y col., 1979; Haresing, 1985; Stellflug y col., 1997).

El mantenimiento y regresión del cuerpo lúteo está regido por mecanismos luteotróficos y luteolíticos. La acción luteotrófica es ejercida por la LH y la prolactina. La acción luteolítica viene dada por la Prostaglandina F2 alfa ( $\text{PGF}_2\alpha$ ) producida por el endometrio uterino hacia el día 12-14 del ciclo bajo un mecanismo donde interactúan el cuerpo lúteo, los folículos ováricos y el útero (McCracken y col., 1984). El E2, de origen folicular, estimula en el endometrio uterino la síntesis de receptores para oxitocina (Beard y Lamming, 1994) y la producción de enzimas involucradas en la síntesis de  $\text{PGF}_2\alpha$  (Silvia y col., 1991). La secreción de la  $\text{PGF}_2\alpha$  depende de la unión de la oxitocina a sus receptores. A partir del día 13 del ciclo, aumentan dichos receptores y se activa la luteólisis (Silvia y col., 1991). En situaciones donde los receptores aparecen demasiado temprano se produce la regresión prematura del cuerpo lúteo (Hunter, 1991). Durante un ciclo normal, la P4 inhibe la formación de receptores para E2 en el endometrio y por lo tanto el E2 no puede estimular la síntesis de receptores de oxitocina (McCracken y col., 1984). Este mecanismo inhibitorio depende de a) las concentraciones de P4, siendo más efectivo a concentraciones altas (Beard y Lamming, 1994); b) el tiempo de exposición a P4, ya que luego de unos 10 días el útero se vuelve refractario a la P4 al agotarse sus propios receptores (Vallet y col., 1990). Entonces, la P4 ya no es capaz de inhibir la síntesis de receptores

para E2, con lo cual el E2 producido por los folículos ováricos estimulará la formación de receptores para oxitocina y finalmente ocurrirá la secreción pulsátil de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . El primer pulso de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , estimulado por la oxitocina de origen hipofisario, produce la liberación de oxitocina luteal y comienza a establecerse un mecanismo de retroalimentación positiva entre ambas hormonas. Así, se instala un patrón de secreción pulsátil de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  dependiendo de la pérdida/recuperación de sensibilidad a la oxitocina en el útero. En este mecanismo el estradiol promueve la síntesis de receptores a oxitocina (McCracken y col., 1984). La secreción pulsátil de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  continúa hasta que se completa la regresión del cuerpo lúteo debido a cambios que conducen a su degeneración (Silvia y col., 1991).

A lo largo del ciclo la LH no es secretada en forma continua, sino que presenta un patrón pulsátil de secreción. Cada pulso comprende la elevación de esta hormona durante un lapso breve, seguido por su descenso al nivel basal, donde permanece hasta el pulso siguiente. La frecuencia y amplitud de estos pulsos de LH varían a lo largo del ciclo estral. Durante la fase luteínica los niveles altos de P4 (segregada por el cuerpo lúteo), actuando a nivel hipotalámico, inducen una baja frecuencia en la secreción de pulsos de GnRH y consecuentemente de LH. Este efecto es sinergizado por los niveles basales de E2 (segregado por los folículos en crecimiento) que ejercen una retroalimentación negativa al disminuir la respuesta de la adenohipófisis a la GnRH. De este modo, durante la fase luteal los pulsos de LH son de baja frecuencia y alta amplitud, lo que impide el desarrollo folicular final y por lo tanto, la ovulación (Goodman y Karsch, 1980; Karsch, 1984; Bettencourt, 1999).

Tras la luteólisis, que marca el fin de la fase luteal y el inicio de la fase folicular, se produce la caída abrupta de los niveles de P4, lo que representa el fin de la inhibición en la producción de GnRH. Así, comienza a aumentar progresivamente la frecuencia de pulsos de GnRH y por lo tanto de las gonadotropinas (Goodman y Karsch, 1980; Karsch, 1984).

La FSH es producida en forma de ondas en coincidencia con las ondas foliculares (Bister y Paquay, 1983). El patrón predominante habla de 3 ondas

foliculares que emergen en torno a los días 0, 6 y 11 del ciclo sexual (Viñoles y col., 2000). La FSH favorece el crecimiento y la maduración de los folículos y ovocitos; induce en el folículo la aparición de receptores de la LH y mantiene la secreción de estrógenos. La secreción de FSH es más o menos continua pero presenta dos picos durante la fase folicular. En coincidencia con el pico preovulatorio de LH, se produce un pico principal de FSH seguido por un segundo pico de menor nivel unas 18 a 24 horas después (Salamonsen y col., 1973). Durante la fase folicular la secreción de FSH está afectada negativamente, en parte por la retroalimentación negativa del E2 (Goodman, 1988) pero sobre todo por la inhibina folicular, glucoproteína producida por las células de la granulosa que actúa también mediante un mecanismo de retroacción negativa a nivel hipofisario para inhibir la secreción de FSH (Baird y col., 1991).

Las fluctuaciones de E2 son un reflejo de lo que acontece a nivel ovárico con las ondas foliculares, ya que tiene su origen en los folículos ováricos, los cuales pueden desarrollarse o sufrir atresia durante el curso de cada ciclo (McNatty y col., 1984; Ravindra y Rawlings, 1997; Bartlewski y col., 2000). De este modo, se han identificado 3 a 4 picos de E2 en un ciclo, cada uno en coincidencia con el final de la fase de crecimiento del folículo mayor de la onda folicular (Souza y col., 1998; Bartlewski y col., 1999; Bister y col., 1999). El incremento de E2, proveniente de los folículos en crecimiento durante la fase folicular, sumado a la existencia de niveles basales de P4, ejerce una retroalimentación positiva sobre el eje hipotálamo-hipófisis (Downey, 1980). El E2 actúa sobre el hipotálamo resultando en un incremento en la frecuencia de pulsos de GnRH y por ende aumenta la frecuencia pulsátil de LH, cuya amplitud se mantiene baja. Esto hace que, de un modo gradual, aumenten las concentraciones sanguíneas de LH, necesarias para que se produzca la maduración folicular final y ocurra el pico preovulatorio de E2 (Baird, 1978; Karsch y col., 1984; Haresign, 1985). La manifestación del celo se induce por el incremento de E2 secretado por los folículos en desarrollo durante la fase folicular final. Sin embargo, se necesita la acción previa de P4, que durante la fase luteal realiza un "priming" sobre los centros comportamentales del cerebro, para aumentar la sensibilidad a E2 vía incremento de la cantidad de receptores para



E2 en el hipotálamo medio-basal y así condicionar posteriormente la manifestación del celo (Blache y col., 1994). El pico de E2 es seguido por la descarga preovulatoria de LH, que se presenta en forma de pico con una duración de 8 a 12 horas (Duggavathi, 2004). Para que ello ocurra se requiere un incremento en la secreción de GnRH hipotalámica y el aumento de la sensibilidad hipofisiaria, eventos que son dependientes de E2 (Karsch y col., 1997). El E2 actúa en el hipotálamo medio-basal induciendo la descarga de GnRH y consecuentemente el pico de LH necesario para que acontezca la ovulación unas 24 h después del pico preovulatorio de LH (Legan y Karsch, 1979). El análisis de los perfiles de secreción de GnRH y LH demuestra que los picos preovulatorios de ambas hormonas ocurren paralelamente; sin embargo el pico de GnRH se extiende por 36 a 48 h, es decir hasta fines del celo (Caraty y col., 2002). La secreción prolongada de GnRH podría ser interpretada como un exceso fisiológico, sin embargo el estudio de Caraty y col. (2002) sugiere que su finalidad es mantener la receptividad sexual hasta la ovulación, después del efecto inicial gobernado por el E2. Finalmente, el pico preovulatorio de LH induce la ovulación del/los folículo/s (E2 desciende) y la luteinización de la estructura folicular remanente, con la consecuente formación del cuerpo lúteo e inicio de la fase luteal. En el día de la ovulación, las concentraciones periféricas de E2 descienden a niveles no detectables en coincidencia con el pico secundario de FSH (Bister y Paquay, 1983; Baird y col., 1991).

En la Figura 4 se grafican las variaciones de las principales hormonas (P4, E2, LH y FSH) durante el ciclo estral de la oveja.

### **2.1.3. Desarrollo folicular**

La foliculogénesis es el proceso mediante el cual se forman los folículos, pasando por diferentes etapas de crecimiento y desarrollo, hasta que se produce la ovulación o bien entran en atresia (Picazo y López, 1995).

Este proceso se inicia tempranamente durante la vida embrionaria, de modo que al nacer, la oveja, al igual que la mayoría de las hembras de especies domésticas, cuenta con una reserva o “pool” de ovocitos que han detenido su crecimiento. Estos ovocitos, que no poseen zona pelúcida y están rodeados por una sola capa plana de células de la pregranulosa, conforman los folículos primordiales (Picazo y López, 1995)

En forma continua, desde antes de la pubertad, se produce la activación folicular (reclutamiento inicial) cuando dejan de estar presentes ciertos factores inhibitorios que mantenían a los folículos en estado quiescente (Fortune, 2002). A medida que progresan en su desarrollo, sus células de la pregranulosa se tornan cuboidales y comienza a formarse la teca interna para ser folículos primarios. Estos dan lugar a los folículos secundarios, en los que las células de la granulosa han proliferado para conformar varias capas (Hirshfield, 1991). Todos estos folículos son clasificados como preantrales ya que aún no se ha conformado el antro (Hirshfield, 1991). La foliculogénesis, hasta la etapa en que se forma el antro folicular, es independiente de las gonadotrofinas, de modo que la etapa inicial de la foliculogénesis es estimulada por otros factores (Fortune, 2002).

A medida que progresa la foliculogénesis los folículos se hacen sensibles a las gonadotrofinas, de modo que son capaces de responder al incremento de la FSH. Los folículos sensibles a las gonadotrofinas miden en la oveja unos 0,8 a 2 mm (Driancourt y col., 1993).

A partir de la pubertad y durante toda la vida reproductiva, grupos de folículos antrales que han abandonado la reserva continúan su desarrollo bajo la acción de las gonadotrofinas, iniciándose así la etapa de dependencia de éstas (Eppig, 2001). Este proceso de desarrollo folicular gobernado por las gonadotrofinas tiene lugar en una forma organizada y cíclica, describiendo un patrón que ha sido denominado “ondas foliculares” (Montgomery y col., 2001) (Figura 4). Así, se ha descrito un ritmo de secreción de FSH en ondas que se repiten en promedio cada 5 a 6 días (Bister y Paquay, 1983), en concordancia con el patrón cíclico de ondas foliculares propuesto previamente (Smeaton y Robertson, 1971; Brand y de Jong, 1973) y confirmado más tarde mediante ultrasonografía (Ginther y col., 1995). Los

estudios realizados en ovejas difieren con respecto a la cantidad de ondas foliculares que se desarrollan durante un ciclo, de modo que se han reportado entre 2 y 4 ondas (Ginther y col., 1995; Leyva y col., 1998; Viñoles y Rubianes, 1998; Bartlewski y col., 1999; Evans y col., 2000). Debido a esta variación, la emergencia de la onda folicular ovulatoria acontecería entre los días 9 y 14 del ciclo estral (Viñoles, 2000). Cada onda folicular consta de tres etapas: reclutamiento, selección y dominancia (Driancourt y Cahill, 1984).

El reclutamiento corresponde a la emergencia o inicio de la onda folicular. Es la etapa donde un grupo limitado de folículos antrales son capaces de responder al incremento en los niveles de FSH en sangre y depender de ella para continuar su crecimiento (Driancourt y Fry, 1988). Para ser reclutados, los folículos deben ser saludables y depender de las gonadotrofinas, lo que se corresponde con un tamaño de 2 mm en la oveja (Driancourt y col., 1993).

La FSH es la hormona clave del inicio del reclutamiento, como así lo evidencia la asociación entre el surgimiento de la FSH y el reclutamiento (Ginther y col., 1995). Para que ocurra este reclutamiento debe existir una concentración mínima o umbral de FSH, la cual es variable entre animales (Picton y McNeilly, 1991), pero estable para un mismo animal a lo largo del tiempo (Brown, 1978). El efecto principal de la FSH es inducir la actividad aromatasa en las células de la granulosa (Saumande, 1990) para que se sintetice E2. De esta forma, la aparición de la actividad aromatasa se asocia con el reclutamiento folicular. El tamaño de los folículos para ser reclutados (2 mm) coincide precisamente con el comienzo de la actividad aromatasa (Driancourt, 2001).

El mecanismo de producción de E2 por el folículo responde a la "Hipótesis de las dos células", debido a que las células de la granulosa y las células de la teca presentes en el folículo son las encargadas de su síntesis. Para que ello ocurra, el folículo cuenta con receptores de LH en las células de la teca y receptores de FSH en las células de la granulosa. El punto de partida para la producción de E2 es el colesterol, el cual es transformado en pregnenolona en las células de la teca o la granulosa. En respuesta a la LH, la pregnenolona en las células de la teca es convertida en andrógenos, los que pasan a través de la

membrana basal hacia la granulosa. En las células de la granulosa, bajo acción de la FSH, los andrógenos son convertidos por aromatización en estrógenos (Thibault y Levasseur, 1979).

La FSH y los estrógenos cumplen la función de ejercer una acción mitogénica en las células granulosas y aumentar la producción de líquido folicular en la medida que el antro va creciendo (Padrón, 1990).

La selección sigue a la fase de reclutamiento. El folículo dominante crece a una tasa alta y los demás folículos subordinados crecen inicialmente a una velocidad menor, para luego detener su crecimiento. Este fenómeno de crecimiento diferencial se ha denominado desviación (Ginther y col., 1997). Se asume que el folículo más grande será el seleccionado para ovular (Ginther y col., 1996) pero el proceso resulta ser más complejo. El folículo seleccionado tiene la mayor cantidad de receptores de LH y FSH, su actividad aromatasas es máxima por lo que posee los mayores niveles intrafoliculares de estradiol (Hsueh y col., 1984) y pareciera ser el primero en desarrollar receptores para la LH en las células de la granulosa, lo que ocurre al alcanzar unos 4 mm (Driancourt, 2001).

Durante la dominancia tienen lugar el crecimiento final del folículo preovulatorio y su maduración en tanto que los demás folículos del grupo completan su regresión por atresia (Ko y col., 1991). La aparición de nuevos folículos en crecimiento estaría disminuída pero no suprimida totalmente; sin embargo, el desarrollo posterior estaría inhibido (González-Bulnes y col., 2004).

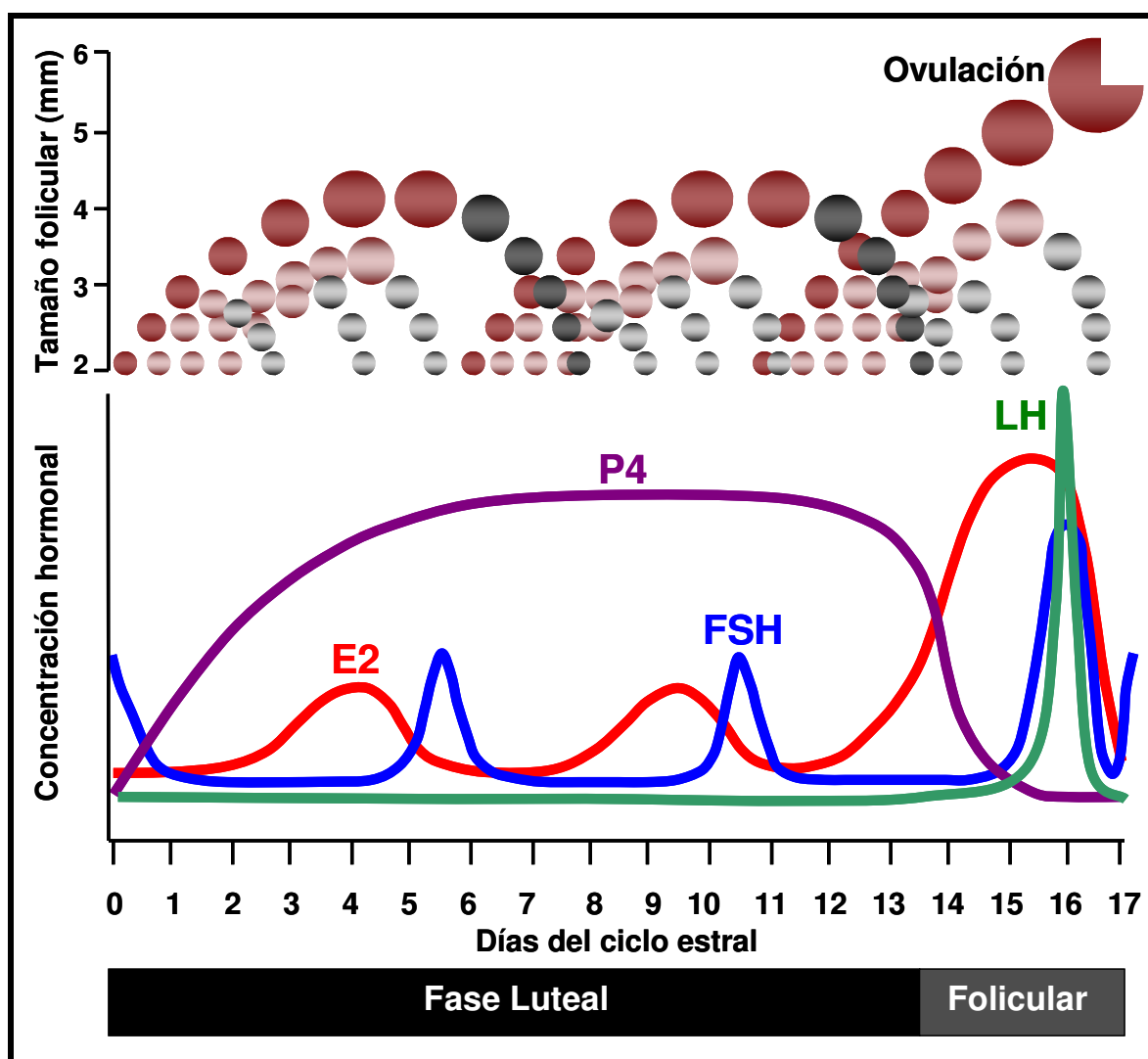
El mecanismo principal que regula la selección es la reducción de la FSH, que acontece 2 a 3 días después del inicio del reclutamiento. Esta caída ocurre por acción combinada de la inhibina y el E2 producidos por el futuro folículo dominante, que actúan por retroalimentación negativa sobre la pituitaria (Gibbons y col., 1997). Este mecanismo sirve para retirar el apoyo que brinda la FSH a los otros folículos menos desarrollados, de modo que su descenso conduce a la disminución de la actividad aromatasas. También es posible que ocurra la síntesis de factores por el folículo dominante que inhiben directamente la producción de E2 en los folículos subordinados. De esta forma se limita la producción de E2 en

los folículos menos maduros, marcándose así el cese de la proliferación de la granulosa. En el proceso de síntesis esteroidal se fomenta la conversión a un microambiente androgénico que finalmente inducirá en el folículo su atresia irreversible (Rosell Pardo y col., 2004). Sin embargo, el folículo dominante debe superar las consecuencias de la supresión de FSH provocada por su propia producción de E2, siendo la aparición de receptores de LH en las células de la granulosa el requisito para que ello ocurra (Ireland y Roche, 1983). El desarrollo de los receptores de LH en la granulosa es iniciado por la FSH y el ritmo de formación de estos receptores se incrementa al unísono con el aumento en la concentración de E2 (Richards y Midgley, 1976). De esta forma, la producción acelerada de E2 actúa a nivel central para estimular el pico de LH y a nivel local para promover la inducción del receptor correspondiente. En síntesis, el cambio a la dependencia de LH provee a los folículos seleccionados de la capacidad para sobrevivir y continuar creciendo ante concentraciones bajas de FSH (McNeilly y col., 1991). Este folículo dominante finalmente se atresia u ovula dependiendo de la existencia o no de cuerpo lúteo (Sirois y Fortune, 1988); en el caso de existir cuerpo lúteo, la P4 inhibe los pulsos de LH, de modo que el folículo dominante no termina su maduración y sufre atresia.

La existencia de dominancia folicular en la oveja ha sido motivo de estudio (Driancourt y col., 1985; Schrick y col., 1993; Lopez-Sebastian y col., 1997). La magnitud de la dominancia es medida por la diferencia de tamaño entre el folículo dominante y el folículo subordinado más grande, diferencia que es de sólo 2 a 3 mm en la oveja, por lo cual la dominancia en esta especie sería más débil (Driancourt, 2001). Cuando la concentración de LH es baja, los folículos más grandes se tornan críticamente dependientes de la FSH sin establecer dominancia, lo cual ocurre durante la fase luteal de la oveja debido a los efectos supresores de la progesterona. Tras la luteólisis, al ir aumentando la secreción de LH, la dominancia se hace evidente (González-Bulnes y col., 2004).

Luego del cese de la síntesis de E2 como consecuencia de la ovulación, ocurre un pico secundario de FSH, el cual estimula la emergencia de una nueva onda folicular (Rosell Pardo y col., 2004).

**Figura 4:** Representación esquemática del desarrollo folicular y de los perfiles hormonales durante el ciclo estral de la oveja.



Se muestra el crecimiento y la atresia de los folículos para un patrón de 3 ondas de desarrollo folicular hacia los días 0, 6 y 11 (desde el reclutamiento de folículos de al menos 2 mm de diámetro hasta su atresia u ovulación, con 5 a 6 mm). La LH se mantiene basal durante casi todo el ciclo y alcanza niveles elevados sólo durante el pico preovulatorio. La FSH es producida en ondas en coincidencia con las ondas foliculares y su elevación principal ocurre junto al pico preovulatorio de LH. El E2 presenta elevaciones periódicas en coincidencia con el final de la fase de crecimiento del folículo mayor de la onda folicular y su elevación principal ocurre en la onda ovulatoria. La P4, que se mantiene baja durante la fase folicular, va aumentando con el transcurso de la fase luteal y cae abruptamente tras la luteólisis.

## **2.2. TRATAMIENTOS SUPEROVULATORIOS**

### **2.2.1. Principios del tratamiento**

El tratamiento hormonal está basado en la simulación de los acontecimientos endocrinos que regulan el ciclo sexual de la oveja, con la finalidad de inducir el celo y estimular el crecimiento y la ovulación de la población de folículos en un momento determinado.

Los protocolos utilizados para superovular comprenden básicamente la combinación de un tratamiento de sincronización de los celos y la ovulación (progestágenos y/o prostaglandinas) y un tratamiento de sobrestimulación ovárica (gonadotrofinas).

#### **2.2.1.1. El tratamiento de sincronización**

##### **2.2.1.1.1. Progestágenos**

La progesterona y sus análogos sintéticos han sido empleados en la regulación del ciclo estral de los ovinos a partir de la observación de que la progesterona producida naturalmente por el cuerpo lúteo inhibe el desarrollo folicular terminal y la ovulación (Cognie, 1992).

El método más difundido es el de la esponja de poliuretano impregnada de un análogo de la progesterona o progestágeno (Robinson, 1964, 1965). Los progestágenos más utilizados son el acetato de medroxiprogesterona (MAP) y el acetato de fluorogestona (FGA). La colocación de esta esponja por vía intravaginal tiene por finalidad simular la fase luteal del ciclo sexual, independientemente de la época del año o del momento del ciclo en que se encuentre la oveja al iniciar dicho tratamiento. La esponja permanece en la vagina durante un tiempo equivalente al de la fase luteal de un ciclo natural, es decir 12 a

14 días, al fin del cual es retirada por tracción de sus hilos. Durante su permanencia, la esponja va liberando su principio activo, de modo que las concentraciones elevadas del progestágeno inhiben la secreción pulsátil de GnRH por parte del hipotálamo, con el consecuente bloqueo de la ovulación. La retirada de la esponja provoca la disminución rápida en la circulación de las concentraciones del progestágeno y por lo tanto se produce la desaparición de la inhibición del eje hipotálamo-hipofisario y el comienzo de los acontecimientos endócrinos que inducen el celo y la ovulación. Estos fenómenos se presentan en forma concentrada, es decir sincronizadamente (Cognie, 1992).

Debido a que comúnmente el tratamiento de sincronización se inicia en ovejas cuyo momento del ciclo estral no se conoce, algunas presentarán el aporte del progestágeno exógeno más la progesterona endógena segregada por el cuerpo lúteo, y otras sólo del progestágeno exógeno en ausencia de cuerpo lúteo. En éstas, durante los últimos días del tratamiento las concentraciones plasmáticas del progestágeno pueden ser demasiado bajas como para suprimir la LH a los niveles de una fase luteal (Kojima y col., 1992), produciendo un inadecuado desarrollo folicular con persistencia de folículos envejecidos (Viñoles y col., 1999) cuya ovulación ha sido asociada a una menor fertilidad en algunos ensayos (Ungerfeld y Rubianes, 1999; Viñoles y col., 2001), aunque no en otros (Evans y col., 2001). Thompson y col. (1990) demostraron una mejor respuesta tras utilizar dos dispositivos consecutivos al mantenerse altas las concentraciones del progestágeno en plasma durante todo el período de sincronización.

#### **2.2.1.1.2. Prostaglandinas**

La  $PGF_2\alpha$  ha sido descrita como la luteolisina natural en las hembras de diferentes especies incluyendo la oveja (Caldwell y Moor, 1971). Entre los días 13 a 15 del ciclo estral (el día 0 corresponde a la ovulación) se produce la ruptura del cuerpo lúteo y la caída brusca de los niveles de progesterona por acción de la  $PGF_2\alpha$  sintetizada por el endometrio en ausencia de estructuras embrionarias (Echternkamp y col., 1976).



En virtud de su mecanismo de acción, ha sido propuesta la administración de  $\text{PGF}_2\alpha$  o sus análogos sintéticos en programas de sincronización de los celos (Acritopoulou, 1979). Este método es efectivo en tanto exista un cuerpo lúteo activo para responder a la prostaglandina (Acritopoulou, 1979), es decir dentro de la estación reproductiva, y más específicamente, en ovejas que se hallan en fase luteal media o tardía. Esta limitante en la capacidad de respuesta en función del momento de la fase luteal, hace necesario realizar dos inyecciones con un intervalo de entre 9 a 12 días. De esta manera, la primera inyección de prostaglandina induce la luteólisis sólo en aquellas hembras con cuerpo lúteo funcional; la segunda inyección encontrará a todas las hembras en condiciones de responder a la prostaglandina exógena con la subsecuente inducción de los celos y la ovulación en forma concentrada.

Sin embargo, este protocolo de sincronización suele asociarse a un aumento en la incidencia de regresión luteal (Schiewe y col., 1990; 1991).

En los últimos años, algunos autores han propuesto el uso de análogos de la  $\text{PGF}_2\alpha$  asociados a las esponjas vaginales ya sea en protocolos de sincronización para IA o de supeovulación para técnicas MOET. En este último caso, son interesantes los resultados de producción y viabilidad embrionaria obtenidos por González-Bulnes y col. (2004) inyectando cloprostenol a las 72 h antes de la retirada de la esponja cuando los protocolos de superovulación tienen lugar en periodo de actividad reproductiva.

A partir de la observación que la presencia de un cuerpo lúteo al inicio del tratamiento superovulatorio se asocia con un mayor número de embriones viables (ver punto **2.2.4. Factores que afectan la superovulación** del presente capítulo), se ha desarrollado un protocolo para aplicar el progestágeno durante la fase luteal muy temprana, una vez sincronizado el ciclo mediante prostaglandinas (González-Bulnes y col., 2004).

### **2.2.1.2. El tratamiento de estimulación ovárica**

En ovejas cíclicas el reclutamiento de los folículos antrales es dirigido por la FSH endógena y el proceso finaliza cuando el/los folículos dominantes sintetizan cantidades suficientes de inhibina y estradiol. La retroalimentación negativa de estas hormonas sobre la secreción de FSH reduce su concentración por debajo del umbral necesario para un mayor reclutamiento (desarrollado en el capítulo **2.1. ASPECTOS DE LA FISIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE LA OVEJA**, parte **2.1.3. Desarrollo folicular**).

Durante la superovulación, las gonadotrofinas son suplementadas a los efectos de aumentar el número de folículos que ovulan. Su mecanismo de acción está basado en la unión y activación de los receptores de FSH de las células de la granulosa presentes en los folículos (Driancourt, 1987, 2001).

El aumento de la tasa ovulatoria por encima de la normal inducido por las gonadotrofinas exógenas se produce mediante la combinación de distintos mecanismos. Entre ellos, tiene lugar el reclutamiento de folículos más pequeños, de modo que el tamaño mínimo de los folículos para ser reclutados disminuye a unos 0,8 mm. También se produce una disminución del tamaño de los folículos preovulatorios, a unos 2-3 mm generalmente (Driancourt, 1987, 2001). Un trabajo reciente ha establecido que los folículos deben alcanzar un tamaño mínimo de 3 mm para lograr ovocitos viables, en tanto que aquellos que miden 2 mm suelen asociarse a mayores tasas de degeneración embrionaria. El reclutamiento de folículos demasiado pequeños, que tendría lugar especialmente en ovejas con tasa ovulatoria elevada, no permitiría un adecuado desarrollo folicular y maduración del ovocito, aún cuando fueran capaces de ovular (Veiga-Lopez y col., 2005). Un estudio de Gonzalez-Bulnes y col. (2000) señala que la cantidad de cuerpos lúteos estaría relacionada con la población de folículos de al menos 4 mm al momento del inicio del celo, pero no con la clase más limitada de folículos iguales o mayores a 6 mm, tamaño referido como ovulatorio en ovinos, especialmente de raza Merino (López Sebastián y col., 1997). La citada reducción en el tamaño de los folículos ovulatorios ha sido encontrada no sólo en ovejas

superovuladas, sino también durante el ciclo estral en hembras de líneas muy prolíficas (Cahill y col., 1979; McNatty y col., 1986; Avdi y col., 1997). Otro mecanismo alterado por la administración de gonadotrofinas es el ritmo de crecimiento del "pool", de modo que se duplicaría la tasa de crecimiento folicular, alcanzando unos 3 mm/día (Driancourt, 1987, 2001). Finalmente, la protección folicular de la atresia y la extensión del reclutamiento, aún en presencia previa de folículos grandes, permiten que más folículos sean incluidos en el grupo ovulatorio (Driancourt, 1987, 2001).

Sin embargo, las gonadotrofinas ejercen al mismo tiempo efectos negativos. Entre ellos, aumentan la incidencia de alteraciones en el desarrollo folicular, en la maduración de los ovocitos y en los mecanismos ovulatorios. Frecuentemente, folículos que han iniciado su atresia son rescatados (González-Bulnes y col., 2002a), pero el desarrollo de esta población folicular suele ser inadecuado, lo que conduce a fallos ovulatorias (Rubianes y col., 1997). Asimismo se han observado alteraciones en la competencia folículo-ovocito, en los patrones endócrinos durante los períodos periovulatorios y preimplantacionales, en la capacidad de desarrollo de los embriones y en el ambiente uterino, todas ellas asociadas a una menor y variable viabilidad embrionaria en ovejas superovuladas (Greve y col., 1995; Rubianes y col., 1997; González-Bulnes y col., 2003b).

La superovulación en ovinos ha sido realizada mediante la utilización de diferentes fuentes hormonales. Entre las hormonas más comúnmente empleadas se hallan la eCG (Gonadotrofina Coriónica Equina; también denominada PMSG, Gonadotrofina del Suero de Yegua Preñada) y la FSH (Hormona Folículo Estimulante).

Estas gonadotrofinas deben ser administradas en cantidad adecuada. El número promedio de folículos en crecimiento generalmente aumenta en la medida que se incrementa la dosis total de la gonadotrofina inyectada hasta alcanzar un máximo, valor que está relacionado con la cantidad de folículos presentes en los ovarios de las hembras tratadas. Sin embargo, no resulta práctico intentar alcanzar la respuesta ovárica máxima pues se ha demostrado que por encima de cierta dosis de gonadotrofinas el número de folículos que finalmente ovulan se

mantiene o incluso disminuye (eCG: Mutiga y Baker, 1982; Samartzi y col., 1995b; González-Reyna y col., 1999; FSH: Smith, 1984; Wierzcho y col., 1992; D'Alessandro y col., 1996; eCG+FSH: Ryan y col., 1991). También es posible que la LH no sea suficiente para producir la ovulación de todos los folículos en desarrollo (Whyman y Moore, 1980), y que algunos folículos no sean capaces de responder al estímulo ovulatorio probablemente debido a alteraciones en su maduración (Moor y col., 1985; Hafez, 1987) o a una reducción del número de receptores para LH (Saumande y Chupin, 1986), o incluso debido a la ausencia del pico preovulatorio de LH (Saumande y Chupin, 1986). El aumento de la dosis de eCG va acompañado de una mayor incidencia de folículos persistentes (Ryan y col., 1991; Samartzi y col., 1995b; González-Reyna y col., 1999), aunque no parece suceder lo mismo ante dosis elevadas de FSH (D'Alessandro y col., 1996). También se ha visto un aumento en la proporción de ovejas con cuerpos lúteos regresados a medida que se incrementa la dosis total de las gonadotrofinas (Ryan y col., 1991; D'Alessandro y col., 1996). Desde la perspectiva práctica, fallos de recuperación (Ryan y col., 1991; Samartzi y col., 1995b), de fertilización (Ryan y col., 1991; D'Alessandro y col., 1996) y alteraciones en la viabilidad de los embriones (Ryan y col., 1991; D'Alessandro y col., 1996) han sido asociados con dosis altas de las gonadotrofinas.

#### **2.2.1.2.1. Gonadotrofina Coriónica Equina (eCG)**

La eCG (Gonadotrofina Coriónica Equina), también denominada PMSG (Gonadotrofina del Suero de la Yegua Preñada), fue descubierta por Cole y Hart hacia el año 1930. Es una gonadotrofina extrahipofisaria que pertenece al grupo de las glicoproteínas, constituida por dos cadenas polipeptídicas (subunidades alfa y beta) en las cuales se han injertado azúcares y ácido siálico. Tiene un peso molecular elevado, de 68.000 a 75.000 daltons. Es producida naturalmente por las copas endometriales de la yegua entre los días 40 y 120 de la gestación (Allen y Morr, 1972).

Su acción es ejercida mediante el AMPc y presenta actividad tanto de FSH como de LH cuando es inyectada en una especie distinta a la equina. Aunque predomina la actividad FSH, la relación FSH:LH resulta muy variable en función de factores tales como la raza y el momento de la gestación de las yeguas de las cuales se obtiene (González Menció y col., 1978). La eCG actúa sobre la población folicular, de modo que promueve el desarrollo folicular, la secreción y la multiplicación de las células de la granulosa e induce la liberación endógena de LH (Pelletier y Thimonier, 1975).

En virtud de su elevado contenido en ácido siálico, la eCG no pasa el filtro renal, con lo cual su período de acción es largo, con una vida media de aproximadamente 21 horas (McIntosh y col., 1975). Esta característica le confiere utilidad práctica al permitir su administración en una única inyección, de modo que el tratamiento de estimulación basado en la eCG resulta más sencillo en comparación con la FSH.

La eCG fue la primera fuente hormonal empleada en programas de superovulación ovina. Se recomienda su aplicación 24 a 48 h previas a la finalización del tratamiento de sincronización, en una dosis que varía entre 1000 y 2000 UI.

A pesar de que ha sido ampliamente utilizada en programas de transferencias embrionarias, la bibliografía abunda en la descripción de los efectos negativos cuando se la suministra en dosis elevadas. Debido a su prolongada duración en circulación, la eCG estimula el crecimiento folicular durante un tiempo más extenso, haciendo que el período de ovulación sea más largo; esto significa que las ovulaciones pueden presentarse en forma desincronizada (Cameron y col., 1988). Además, la continua estimulación del reclutamiento y crecimiento folicular durante el período periovulatorio conduce a la formación de folículos grandes segregando estradiol que persisten tras la ovulación (Jabbour y Evans, 1991a; Martemucci y col., 1995; Chagas e Silva y col., 2003). Estas alteraciones producirían fallos en los procesos de fertilización y/o de recuperación, de modo que es escasa la cantidad de embriones que pueden lograrse por donante (Martemucci y col., 1995; Blanco y col., 2003;

Chagas e Silva y col., 2003) (ver punto **2.2.3. Alteraciones endócrinas de la superovulación** del presente capítulo). Otra desventaja que conlleva el tratamiento con eCG, es la formación de anticuerpos ante inyecciones repetidas, con la consecuente refractariedad ovárica (McKelvey y col., 1986). Más allá de estos inconvenientes, la eCG es una fuente hormonal muy variable entre lotes, lo cual profundiza aún más la variabilidad en la respuesta a los tratamientos superovulatorios y limita su empleo práctico (González Menció y col., 1978; Bonino Morlán y Hughes, 1996).

Con la finalidad de evitar estos inconvenientes, se ha probado la inclusión de anticuerpos anti-eCG y de GnRH en los protocolos basados en la eCG. Los resultados mejoran con la neutralización de la hormona con anticuerpos anti-eCG (Jabbour y Evans, 1991b; Martemucci y col., 1995; Rubianes y col., 1996), pero aumenta notablemente el costo del tratamiento. La administración del anticuerpo en el momento adecuado disminuye la cantidad de folículos grandes al evitar el crecimiento adicional de los folículos pequeños una vez producida la ovulación (Martemucci y col., 1995) y reduce la secreción de estradiol periovulatorio (Jabbour y Evans, 1991b). Rubianes y col. (1996) señalan que el empleo de antisuero produce una mayor tasa de recuperación debido a la reducción de la incidencia de ovejas con regresión luteal. Por su parte, se ha demostrado que la adición de GnRH al tratamiento con eCG en el momento apropiado permite un mejor control del momento de la ovulación (Walker y col., 1986) y aumenta la proporción de los folículos que ovulan (Jabbour y Evans, 1991b; Naqvi y Gulyani, 1998), probablemente al incrementar la disponibilidad de LH (Naqvi y Gulyani, 1998). Además, el tratamiento con GnRH mejoraría la tasa de fertilización al limitar la secreción periovulatoria de estrógenos (Jabbour y Evans, 1991b).

En conjunto y a pesar de todas sus desventajas, la eCG sigue siendo utilizada debido especialmente a su bajo costo y a su sencilla administración. Es necesario aclarar que existen ciertos países, como Alemania, donde está prohibido el uso de FSH, con lo cual la estimulación ovárica en animales bajo programas de transferencias embrionarias se realiza mediante eCG (Becker, 2002).

### 2.2.1.2.2. Hormona Folículo Estimulante (FSH)

La FSH (Hormona Folículo Estimulante) es una hormona glucoproteica producida en las células gonadotrofas de la adenohipófisis. Estructuralmente, consta de dos cadenas polipeptídicas llamadas subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , unidas por puentes disulfuro. La subunidad  $\alpha$  está formada por 92 aminoácidos y es idéntica en una misma especie a otras hormonas glucoproteicas como la LH; esta subunidad confiere la especificidad de especie. La subunidad  $\beta$ , conformada por 118 aminoácidos, es diferente en cada hormona glucoproteica; esta subunidad es la que se acopla con el receptor, de modo que confiere la especificidad biológica o de acción. Las dos cadenas son sintetizadas por separado y se unen en el retículo endoplásmico de la célula gonadotrofa, de manera que sólo el dímero es capaz de ejercer la acción biológica de la hormona. A estas cadenas se unen cuatro cadenas carbohidratadas, de constitución variable, especialmente en su contenido en ácido siálico (Haisenleder y col., 1994). El ácido siálico tiene importancia en el catabolismo de las hormonas glucoproteicas en el hígado (una mayor cantidad de este ácido brinda una mayor protección ante la degradación). La FSH posee un bajo contenido de ácido siálico, lo que hace que su vida media en la circulación sea de sólo 3 a 5 horas (Laster, 1972; Demoustier y col., 1988).

En virtud de los problemas mencionados referentes al empleo de eCG, se ha planteado la alternativa de superovular empleando FSH. La utilización de FSH se asocia con una menor variabilidad en la tasa ovulatoria y con una menor cantidad de folículos anovulatorios (Chagas e Silva y col., 2003), de modo que no causaría una alteración importante en los procesos de esteroidogénesis (ver punto **2.2.3. Alteraciones endócrinas de la superovulación** del presente capítulo) produciendo unas adecuadas tasas de fertilidad (Bindon y Piper, 1982) y recuperación (Chagas e Silva y col., 2003). En este sentido, el estudio de Evans y Armstrong (1984) encontró una menor cantidad de espermatozoides en el útero y oviductos tras la inseminación artificial cervical de ovejas tratadas con eCG en comparación con aquellas tratadas con FSH.

Las fuentes comerciales de FSH disponibles en el mercado son extractos de pituitaria de diferentes especies, principalmente la porcina y la ovina. Son administradas en una dosis que varía entre 16 y 21 mg Armour según las razas.

La bibliografía indica un descenso en la respuesta a partir de la estimulación con FSH heteróloga repetidamente en las mismas ovejas (Al-Kamali y col., 1985; Fuki y col., 1985), observándose una reducción progresiva en el número de ovejas que superovulan así como una tasa ovulatoria significativamente inferior al segundo tratamiento de estimulación. Sin embargo, Cordeiro y col. (2003) no encuentran diferencias en los resultados logrados entre dos estimulaciones repetidas. La utilización más reciente de FSH de origen ovino (Ovagen) pareció resolver este problema a corto plazo. A tal efecto, el estudio de Bari y col. (2001) demostró el mantenimiento de la tasa ovulatoria, el porcentaje de superovulación y la cantidad de embriones recuperados en donantes estimuladas repetidamente (4 veces) con FSH ovina a intervalos anuales. Sin embargo, Forcada y col. (2000) señalaron una reducción en la respuesta ovárica en ovejas Rasa Aragonesa luego de su tercer tratamiento superovulatorio al emplear un intervalo entre dos tratamientos consecutivos de 2 meses. Durante el ciclo estral se produce un crecimiento continuo de los folículos primordiales, de manera que se necesitan unos 40 días para que los folículos progresen desde el "pool" de folículos antrales al estadio preovulatorio. Además, se ha señalado una dotación de entre 20 y 30 folículos presentes en el ovario en cada ciclo estral normal de la oveja que son capaces de responder a las gonadotrofinas. Teniendo en cuenta este hecho, se ha indicado que el tratamiento superovulatorio repetido a intervalos tan cortos como bimensuales, no debería en teoría producir mermas significativas en la respuesta dentro de un programa MOET (Bari y col., 2001).

Como la FSH no es naturalmente una hormona de estructura molecular simple sino que se presenta como isoformas, los preparados comerciales resultan variables. Las preparaciones hipofisarias disponibles difieren en su potencia, como ha sido demostrado por Phillips y col. (1993). Dichas diferencias en términos de potencia podrían ser salvadas mediante un ajuste de las cantidades a administrar. Sin embargo, un problema no menor radica en la falta de consistencia



en su actividad entre ensayos para una misma marca, lo cual sugiere que los extractos hipofisarios se comportan diferentemente en cada ensayo mostrando una amplia variabilidad entre los lotes (Phillips y col., 1993). Otro factor de variación es la duración plasmática de la FSH inyectada. La vida media de las preparaciones comerciales y sus pendientes de declinación han mostrado ser muy variables (Phillips y col., 1993). En tal sentido, el estudio de Moore y col. (2000) ha asociado la vida media de extractos hipofisarios ovinos a aspectos como el sexo, la edad y el estadio fisiológico.

Las preparaciones comerciales contienen cantidades altas de FSH y variables de LH, dependiendo del producto. Pluset (FSH porcina) posee cantidades iguales de FSH y LH, es decir una relación 1:1. Folltropin-V (FSH porcina) es un extracto al que se le ha extraído aproximadamente el 80% de la LH, mientras que Ovagen (FSH ovina) es el extracto más purificado, con muy baja contaminación de LH. A modo ilustrativo, el estudio de Henderson y col. (1990) informa en Folltropin una relación FSH:LH de 49:1 y en Ovagen, una relación de 1090:1. Un alto contenido en LH parece asociarse con una reducción de la respuesta ovulatoria (Chupin y col., 1987; Torrès y col., 1987), con lo que la tendencia con el tiempo ha sido hacia la utilización de gonadotrofinas más purificadas. De este modo, algunos autores destacan que las preparaciones de FSH lograrían una mejor respuesta si su contenido LH fuera inferior al 10% (Donaldson, 1991; Boscos y col., 2002) debido a que la relación FSH:LH sería crítica para el desarrollo preovulatorio de los folículos y la ovulación (Donaldson, 1991; D'Alessandro y col., 2005). Concentraciones elevadas de LH durante un lapso extenso antes del pico de LH alterarían éste (Taft y col., 1996) y/o la habilidad de los folículos para ovular sin modificaciones en el reclutamiento y crecimiento (Rubianes y col., 1995). El estudio de González-Bulnes y col. (2000) evidencia que la estimulación con una fuente de FSH no purificada, además de provocar el desarrollo de más folículos, produce una mayor incidencia de atresia folicular debido al incremento de LH en plasma que alteraría el mecanismo que previene la atresia (Nöel y col., 1994), y fallos de ovulación por saturación de receptores (Boland y col., 1991). Recientemente, el estudio comparativo entre FSH pura (Ovagen) y FSH con un alto contenido en LH (Pluset) realizado en

ovejas Merino Negro Portuguesa destaca unos mejores resultados a partir de la estimulación con FSH pura, debido básicamente a una mayor tasa de recuperación que resulta en más embriones (Bettencourt y col., 2008). Sin embargo, el empleo de FSH más pura no logra evitar la presencia de folículos anovulatorios (González-Bulnes y col., 2000; Veiga-Lopez y col., 2005). Además, se ha sugerido que cantidades excesivamente bajas de LH al fin del tratamiento pueden inducir una menor tasa ovulatoria (Chupin y col., 1987) de manera que un mínimo de LH es necesaria para la ovulación. A pesar de que algunos autores informan que el tratamiento con LH pura al momento de la retirada de las esponjas en protocolos de estimulación con una relación FSH:LH conocida disminuye la variabilidad en la respuesta ovulatoria (Picton y col., 1990; Picazo y col., 1996), otros no han hallado efectos beneficiosos (Wright y col., 1981).

Algunos autores sostienen que el empleo de FSH como única hormona podría producir una menor proporción de ovejas en celo (Jabbour y Evans, 1991a), un menor porcentaje de ovejas que presentan respuesta superovulatoria (Wright y col., 1981; Eppleston y col., 1984; Jabbour y Evans, 1991a) o bien una respuesta ovárica pobre (Bonino Morlán y col., 1989). Murphy y col. (1984) sugieren que aún empleando preparaciones de FSH con una actividad considerable de LH, los niveles de LH podrían resultar insuficientes para generar una respuesta superovulatoria. Al objeto de superar estos problemas, estudios realizados inicialmente en ovejas de raza Merino (Ryan y col., 1984, 1991; Jabbour y Evans, 1991a) sugirieron la adopción de protocolos basados en tratamientos combinados, donde la eCG aportaría una actividad similar a la LH en forma adicional. Según Ryan y col. (1991) el co-tratamiento de FSHp (12 o 18 mg) con una dosis moderada de eCG (800 UI) se asoció con una tasa ovulatoria superior a la observada tras estimular sólo con FSHp. En conjunto, el tratamiento combinado indujo una mayor proporción de ovejas que exhibieron respuesta superovulatoria así como un efecto aditivo de las gonadotrofinas exógenas en aquellas hembras que superovularon sin incremento alguno de la incidencia de folículos persistentes. La adición de eCG permitiría además disminuir la dosis de FSH a administrar, con la ventaja de reducir el costo del tratamiento, debido a las diferencias en precios entre estas dos fuentes hormonales (la eCG es más

económica que la FSH). Sin embargo, otros autores no han hallado efectos benéficos tras implementar el tratamiento combinado de ambas gonadotrofinas (Cseh y Seregi, 1993; Naqvi y Gulyani, 1998). No obstante y contrariamente a quienes prefieren su combinación con eCG, actualmente la mayor parte de los protocolos de sobrestimulación ovárica utilizan FSH como única fuente hormonal. Incluso, la estimulación sólo con FSHo purificada (Ovagen) ha brindado muy buenos resultados en varias investigaciones (Forcada y col., 2000; Bari y col., 2001; Lymberopoulos y col., 2001; Veiga-López y col., 2005; Bettencourt y col., 2008) algunas de ellas con vistas a la formación de bancos de germoplasma de razas en peligro de extinción.

Como la FSH presenta una vida media corta, se requiere una administración frecuente de la misma con la finalidad de mantener concentraciones plasmáticas suficientes para lograr una respuesta ovárica adecuada (Demoustier y col., 1988). De este modo, debe ser repartida en un régimen de dosis múltiples constituido por inyecciones dos veces por día durante un lapso de 2 (Torrès y col., 1987; D'Alessandro y col., 1996, 2005; Chagas e Silva y col., 2003), 3 (Jabbour y Evans, 1991a; Bettencourt y col., 2008) o 4 días (Evans y Armstrong, 1984; Forcada y col., 2000; Bari y col., 2001; Gonzalez-Bulnes y col., 2002b; D'Alessandro y col., 2005; Bettencourt y col., 2008). La necesidad de administrar la FSH en protocolos de dosis múltiples cada 12 horas fue sugerida por Thompson y col. (1990) al hallar una mayor tasa ovulatoria, respuesta ovárica total, ovocitos y embriones recuperados y transferibles en comparación con su administración cada 24 horas. Por otra parte, la habitual contaminación con LH de las preparaciones de FSH hace necesario la dosificación de la hormona en un régimen de concentraciones decrecientes, en tanto que las preparaciones más puras serían más laxas en su dosificación.

Estos regímenes de inyecciones de los tratamientos superovulatorios basados en FSH pueden resultar estresantes para los animales, laboriosos desde el punto de vista técnico y pueden conllevar errores en la dosificación y en los tiempos de inyección (D'Alessandro y col., 2001). La influencia del estrés ha sido demostrada por Edwards y col. (1987), quienes observaron que el movimiento de

vacas donantes durante 15 a 60 minutos cada 12 h con el objetivo de cumplir con un régimen superovulatorio de administración de FSH durante 4 días dos veces por día, redujo significativamente la tasa ovulatoria. El hecho de que el estrés puede afectar negativamente un aspecto primario de la existencia animal como es la reproducción, enfatiza su importancia y la necesidad de minimizarlo (Dobson, 2003). La importancia del estrés es expresada generalmente en términos económicos, pero también debiera considerarse el bienestar animal. Así, la exposición de un individuo ante una situación de estrés que puede evitarse compromete los principios del bienestar animal (Dobson, 2003).

## **2.2.2. Simplificación de los protocolos de administración de FSH**

### **2.2.2.1. Dosis decrecientes vs. dosis constantes**

Tradicionalmente la FSH ha sido administrada en un régimen de concentraciones decrecientes, pudiendo conducir a errores en su dosificación.

La alternativa de utilización de dosis constantes ha sido considerada con resultados contradictorios en función especialmente del grado de contaminación con LH de las preparaciones. Así, en aquellas preparaciones con un alto contenido en LH, la administración en dosis decrecientes ha demostrado ser más eficiente que su dosificación constante (Torrès y col., 1987).

El más bajo contenido de LH en las preparaciones comerciales disponibles, especialmente en el caso del preparado de FSH ovina (Ovagen), pareciera justificar la posibilidad del uso de un protocolo de dosis constantes en reemplazo del tradicional de concentraciones decrecientes necesariamente adoptado con las preparaciones no purificadas. Incluso el laboratorio proveedor de Ovagen (Immuno-Chemical Products Bio, Nueva Zelanda) sugiere la adopción de un protocolo de dosis iguales.

El trabajo de Bari y col. (2001) basado en los registros de ocho años aportados por el programa MOET en ovejas Scottish Blackface desarrollado en

Reino Unido, informa resultados muy satisfactorios a partir de la estimulación con FSH ovina repartida en un régimen de 8 dosis de concentraciones iguales. Resultados igualmente satisfactorios han sido reportados por otros investigadores tras aplicar este mismo régimen (LyMBERopoulos y col., 2001; Bettencourt y col., 2008).

Sin embargo, otros estudios han demostrado resultados variables al repartir la FSHo en dosis iguales (Bunch y col., 2000; Gonzalez-Bulnes y col., 2000, 2002b; Berlinguer y col., 2004). De hecho, recientemente González-Bulnes y col. (2004) han mostrado unos mejores resultados de tasa de ovulación y de embriones viables obtenidos con protocolos decrecientes de FSHo en relación a los constantes, señalando que los primeros pueden estar más próximos a los cambios de la secreción hipofisaria que tienen lugar en la fase folicular del ciclo sexual natural.

## **2.2.2.2. Administración en una única inyección**

### **2.2.2.2.1. Utilización de vehículos salinos**

En vacas, se han realizado varios estudios para evaluar la vía de administración de la hormona suministrada en una única inyección disuelta en solución salina. Los resultados generados han sido tanto satisfactorios (s.c.: Bo y col., 1991; Hockley y col., 1992; Misra y col., 1992; Brogliatti y col., 1998) como no satisfactorios (i.m.: Suzuki y col., 1994; Yamamoto y col., 1994; s.c.: Takedomi y col., 1993, 1995).

Kelly y col. (1997) han mostrado una liberación más lenta desde un depósito subcutáneo en comparación con uno intramuscular, con el mantenimiento de niveles circulantes de la gonadotrofina durante un lapso más prolongado, debido probablemente a los diferentes grados de vascularización de ambos sitios. Más aún, la tasa de absorción de la FSH dependería de la cantidad de grasa presente en el sitio de inyección, como es referido por Bo y col. (1994).

En ovinos, los estudios de inducción a la superovulación con FSH administrada en única inyección en vehículo salino han brindado resultados poco satisfactorios. El trabajo de Watanabe y col. (1998a) señala resultados insatisfactorios a partir de la estimulación con una única inyección i.m. de FSHp en salina. Bajo este protocolo, las ovejas no manifestaron conducta sexual (celo silente) y presentaron una reducida tasa ovulatoria y fallos en los procesos de recuperación, fertilización y viabilidad embrionaria. El análisis endocrinológico de estas ovejas (Watanabe y col., 1998b) puso en evidencia las alteraciones en sus perfiles hormonales. La concentración de FSH en plasma aumentó rápidamente tras la inyección para luego disminuir moderadamente, permaneciendo más baja por un mayor período que la dosificación múltiple de la gonadotrofina. En forma similar, se detectó una elevación instantánea del estradiol, de baja magnitud, tras la inyección; ésta resultó ser la única elevación observada al no producirse posteriormente el típico pico preovulatorio de estradiol. Del mismo modo, otro ensayo (Okada y col., 1999) señaló resultados poco satisfactorios a partir de la estimulación con este protocolo debido a la ausencia de celo, la baja tasa ovulatoria (considerada no superovulatoria) y finalmente la ausencia de embriones logrados.

Con posterioridad, otro ensayo (Riesenberg y col., 2001), si bien indicó la posibilidad de obtener respuesta superovulatoria mediante la administración de FSH en salina en una única aplicación s.c. antes o al momento del retiro de los dispositivos sincronizadores, señaló el establecimiento de una función luteal ineficaz que induciría una tasa alta de regresión luteal. La aceleración del desarrollo folicular podría inducir ovulación antes de que las células de la granulosa adquirieran la maduración necesaria para luteinizarse adecuadamente en respuesta al pico ovulatorio de LH (Armstrong y col., 1982).

#### **2.2.2.2.2. Utilización de vehículos no salinos**

Las concentraciones circulantes de una sustancia dependen de su absorción desde el sitio de administración y de su metabolización (Bo y col.,

1994). Basados en la tasa de metabolización (Demoustier y col., 1988), es esperable que una rápida absorción de la FSH administrada sería acompañada por una rápida clarificación. Por lo tanto, los folículos expuestos a niveles altos de FSH por un período muy corto no serían capaces de sostener su crecimiento hasta la ovulación (Bo y col., 1994).

Por este motivo, las investigaciones referentes a la administración de FSH en una única inyección, condujeron a la formulación de vehículos retardantes, es decir no salinos, entre los cuales figuran el propilenglicol y la polivinilpirrolidona.

#### **2.2.2.2.1. Propilenglicol**

El propilenglicol es considerado un vehículo de liberación lenta para las hormonas esteroideas como la progesterona. Cuando la progesterona se administra disuelta en propilenglicol, se aumenta el período de altas concentraciones a 5 días en comparación con un lapso de 3 días cuando es administrada en aceite de oliva (López-Sebastián, no publicado).

Con respecto a su aplicación en superovulación ovina, López-Sebastián y col. (1993) informaron un incremento en el número de cuerpos lúteos a partir de la administración de 10 mg FSHp en propilenglicol, pero no en salina. Sin embargo, este comportamiento diferencial se contradice con un casi idéntico patrón de FSH en plasma inducido por ambos vehículos. Ello ha permitido sugerir que el efecto del propilenglicol tendría lugar a través de una alteración de la naturaleza bioquímica de la FSH, la cual retendría su actividad biológica aún cuando dejara de ser detectable por la técnica de radioinmunoensayo (Peckham y col., 1973). Siguiendo con el estudio de López-Sebastián y col. (1993), la tasa ovulatoria fue similar en ovejas que recibieron salina o propilenglicol solos o FSHp en salina y se incrementó si en el momento de la administración de FSHp en salina los animales recibían propilenglicol en un sitio separado. Sin embargo, la mayor tasa ovulatoria se logró administrando la hormona en propilenglicol, sugiriendo que este vehículo

podría cambiar la actividad enzimática del hígado, que es el sitio principal de metabolización de la FSH, y por ende aumentar la vida media de la hormona.

Más recientemente, López-Sebastián y col. (1999) mostraron entre 0 y 16 ovulaciones en ovejas Merino tratadas con FSH en propilenglicol frente a valores de tasa ovulatoria entre 0 y 6 si la hormona se administraba en salina. Por tanto y a pesar de la variabilidad, las posibilidades de lograr una respuesta superovulatoria fueron mayores en las ovejas tratadas con FSH en propilenglicol.

#### **2.2.2.2.2. Polivinilpirrolidona (PVP)**

Otra posibilidad de simplificación de los protocolos de superovulación radica en el empleo de polivinilpirrolidona (PVP; povidona) como diluyente no salino de la FSH.

El PVP es un polímero orgánico sintético formado por cadenas de múltiples vinilpirrolidonas. Presenta pesos moleculares elevados (entre 10.000 y 70.000 daltons dependiendo del grado de polimerización), es soluble en agua y en un rango amplio de solventes orgánicos. Si bien el monómero es carcinógeno y extremadamente tóxico en especial para la vida acuática, su polímero (PVP) en estado puro es completamente inocuo (Polivinilpirrolidona; <http://es.wikipedia.org/wiki/Polivinilpirrolidona>).

Actualmente, sólo suele ser empleado como agente retardante de compuestos inyectables vía intramuscular o subcutánea, pero no intravenosa. Debido a que se trata de un polímero, su peso molecular es variable. Por esta razón, en el caso de la administración intravenosa, las moléculas más pequeñas pueden ser metabolizadas por el riñón, en tanto que las de peso molecular más alto permanecen en el organismo acumulándose en células macrofágicas del hígado, ganglios linfáticos y bazo. En ocasiones, dichos acúmulos pueden simular desde enfermedades de depósito hasta adenocarcinoma metastásico (Bubis y col., 1975; Kuo y Hsueh, 1984). En el caso de las inyecciones intramusculares, la



sustancia es fagocitada por las células macrofágicas dando lugar a un simple granuloma a cuerpo extraño (Meléndez Guerrero y col., 1997).

El PVP es actualmente empleado para la elaboración de drogas de larga acción, debido a sus propiedades de unirse y estabilizar varias moléculas, permitiendo de esta manera prolongar su tasa de metabolización (D'Alessandro y col., 2001).

La cualidad retardante del PVP como vehículo de FSH fue demostrada por Takedomi y col. (1995) en vacas, quienes informaron el incremento gradual de la concentración de esta gonadotrofina alcanzando el pico hacia las 12 h posteriores a su administración subcutánea, disuelta en PVP, para luego descender lentamente y logrando mantener durante igual lapso de tiempo el mismo rango de concentración que el tratamiento de dosis múltiples. En el trabajo citado, la utilización del retardante fue importante pues la administración de la FSH en solución salina produjo un aumento drástico de esta hormona exógena en sangre alcanzando niveles marcadamente altos para luego descender abruptamente, manteniendo sólo durante un breve período el mismo rango de concentración que el tratamiento convencional.

En cuanto los resultados prácticos, los estudios iniciales realizados por Smith y col. (1973), quienes emplearon este polímero para limitar las inyecciones de FSH con la finalidad de lograr pariciones múltiples en vacas de carne, demostraron que el PVP es necesario para prolongar la acción aún cuando se utilicen concentraciones bajas de FSH.

Posteriormente, varios estudios en vacas (Yamamoto y col., 1992, 1993, 1994, 1995; Takedomi y col., 1993, 1995; Suzuki y col., 1994; Satoh y col., 1996; Sugano y Shinogi, 1999) han tenido por finalidad superovular mediante una inyección única de FSH disuelta en PVP. Los resultados obtenidos relativos a la respuesta ovárica y a la cantidad y calidad embrionaria han sido en general comparables con aquellos resultantes de la sobreestimulación convencional. Incluso, Yamamoto y col. (1994) lograron una tasa mayor de embriones

transferibles a partir de la administración de FSH en PVP, posiblemente en relación a las menores condiciones de estrés de las hembras.

El empleo de este vehículo para la administración de FSH en una inyección única ha sido probado también en conejos, encontrándose una mayor tasa ovulatoria y más embriones (Kanayama y col., 1994).

La cantidad de estudios sobre este protocolo realizados en la especie ovina es marcadamente inferior a los mencionados para bovinos y además con resultados contradictorios, probablemente en función de las condiciones experimentales. De este modo, los factores que podrían influir sobre la respuesta al tratamiento con FSH en PVP pueden estar no relacionados con el tratamiento hormonal en sí (como ser el genotipo o raza ovina) o bien ser inherentes al propio tratamiento hormonal como el peso molecular de la droga (PVP) empleada en la formulación del vehículo, la concentración del PVP en la solución-vehículo para la administración de la FSH, la vía de administración (subcutánea vs. intramuscular) y el momento de la inyección de la FSH en PVP.

Los estudios de Dattena y col. (1994) en ovejas de raza Sarda y los realizados por D'Alessandro y col. (2001) en ovejas de raza Leccese permitieron obtener una respuesta superovulatoria mediante una única inyección i.m. de FSHp disuelta en PVP comparable a la lograda a partir de tratamientos más convencionales. Estos hallazgos se contradicen con los resultados no satisfactorios reportados por Lajous y col. (1997) en ovejas de raza Romanov, quienes obtuvieron una respuesta ovárica menor tras la administración de FSHp en una única inyección en PVP en comparación con su administración en un régimen de dosis múltiples. Incluso, estos autores no hallaron diferencias en la respuesta ovárica tras estimular con una inyección única de FSH disuelta en vehículo PVP o en salina. Las discrepancias en la bibliografía podrían atribuirse al papel del genotipo sobre la respuesta a los tratamientos de estimulación ovárica (D'Alessandro y col., 2001)

Con respecto a los factores inherentes al protocolo, un primer experimento realizado por D'Alessandro y col. (2001) en ovejas de raza Gentile di Puglia

demostró la ineficacia del tratamiento con FSHp administrada en una única inyección i.m. 48 h antes de retirar los dispositivos sincronizadores, empleando diferentes formulaciones de la solución vehículo (peso molecular del PVP de 10.000 o 40.000 y concentración del PVP en la solución de 15% o 30%). Sólo un 40% de las ovejas que recibieron PVP en su mayor peso molecular y concentración lograron al menos 3 cuerpos lúteos, en tanto que ninguna de las ovejas de los otros grupos resultaron superovuladas. La formulación de la solución al 30% de PVP, independientemente de su peso molecular, dio como resultado una mejor sincronización de los celos y una menor incidencia de regresión de los cuerpos lúteos. Estos resultados muestran que la mayor concentración del polímero lograría una mejor estabilización de las moléculas de la gonadotropina, lo que influiría positivamente sobre los eventos involucrados en la incidencia del celo y la luteinización de los cuerpos lúteos. Sin embargo, aún cuando la respuesta fuese positiva, la tasa ovulatoria alcanzada en el grupo que logró estos mejores resultados, fue muy inferior a la obtenida a partir de la estimulación con FSH repartida en 6 dosis decrecientes. Estos mismos autores (D'Alessandro y col., 2001), en un segundo experimento con ovejas de raza Leccese, evaluaron la eficacia de una única inyección i.m. de FSHp en PVP (peso molecular 40.000; concentración del 30%) a las 24 h previas a la retirada de las esponjas sincronizadoras, logrando una respuesta similar a la del grupo control que recibió 4 inyecciones decrecientes de la gonadotropina. A partir de esta información preliminar, los autores (D'Alessandro y col., 2001) evaluaron en ovejas de raza Leccese la respuesta a una única inyección de FSHp en PVP (peso molecular de 10.000) en diferentes momentos (48 h vs. 24 h previas a la remoción de las esponjas) y vías (i.m. vs. s.c.) de administración. La inyección de FSHp en PVP 48 horas antes de la retirada de la esponja resultó inefectiva tanto por la vía i.m. como por la s.c., posiblemente debido a los niveles elevados en circulación de esta gonadotropina en forma anticipada con respecto a los eventos fisiológicos que regulan la tasa ovulatoria. Como ha sido demostrado por Driancourt y col. (1985), el reclutamiento folicular ocurre en la oveja después de la luteólisis. La administración de la FSH en coincidencia con la luteólisis inducida (48 h antes de retirar las esponjas) produciría una incapacidad del vehículo para

mantener una actividad suficiente de FSH que permitiera sostener el crecimiento folicular, aún cuando se optara por una vía más lenta de administración, como lo es la inyección s.c. Contrariamente, se obtuvieron resultados satisfactorios si el tratamiento se llevaba a cabo 24 h más tarde, siempre que se recurriera a la vía i.m. de inyección. Bajo estas condiciones, la respuesta lograda en términos de presentación de los celos, porcentaje de superovulación, tasa ovulatoria, estructuras recuperadas y embriones transferibles, logró igualar a la de los tratamientos más convencionales (FSHp repartida en 6 o 4 dosis decrecientes).

### **2.2.2.2.3. Combinación con eCG**

La mayor parte de los protocolos basados en el co-tratamiento de FSH y eCG recurren a la inyección de la FSH repartida en dosis múltiples y de la eCG en única inyección (Ryan y col., 1984, 1991; Jabbour y Evans, 1991a; Naqvi y Gulyani, 1998, 1999).

La administración de FSH en salina en una única inyección conjuntamente con una dosis baja a moderada de eCG (entre 200 y 800 UI), ha sido probada por algunos investigadores bajo la hipótesis de que el aporte de la eCG permitiría sostener la estimulación folicular iniciada por la FSH debido a su larga duración en la circulación, sin producir los efectos deletéreos reportados cuando es inyectada como única fuente hormonal en una dosis elevada.

El estudio de Okada y col. (1999) señala la importancia de utilizar una dosis mínima efectiva de eCG para acompañar la estimulación de la FSH administrada en única inyección. Según dicha fuente sólo a partir de 200 UI eCG es posible obtener respuesta superovulatoria.

El protocolo simple combinado ha sido estudiado en algunas razas ovinas, tales como Merino (Maxwell y Wilson, 1989), cruza Dorset (Fukui y col., 1998; Okada y col., 1999, 2000), South-Down (Fukui y col., 1998; Okada y col., 1999, 2000), Sufflok (Fukui y col., 1998; Watanabe y col., 1998a; Okada y col., 1999, 2000), Sarda (Ledda y col., 1992; Dattena y col., 1994; Leoni y col., 2001), Rasa

Aragonesa (Ledda y col., 1992) y Corriedale (Yamada y col., 1996), lográndose resultados dispares y poniendo de manifiesto la influencia del factor racial.

La aplicación de este protocolo sencillo en razas de baja tasa ovulatoria, tales como Merino (Maxwell y Wilson, 1989), Sarda y Rasa Aragonesa (Ledda y col., 1992), se asoció con una elevada estimulación ovárica, de manera que la tasa de ovulación fue claramente más alta que la obtenida habitualmente con FSHp administrada en forma convencional. En el efecto positivo ejercido sobre el ovario por la acción combinada de las dos hormonas pudo haber influido la inclusión de GnRH en el protocolo. El estudio de Ledda y col. (1992) remarca las bajas tasas de fertilización logradas en los genotipos Sarda y Rasa Aragonesa, pero especialmente en esta última, en contraposición con lo observado en ovejas Merino por Maxwell y Wilson (1989), probablemente debido a diferencias entre razas sobre la sensibilidad a la acción de las dos gonadotrofinas juntas.

El estudio realizado por Watanabe y col. (1998a) en la raza Sufflok demostró que la estimulación con el protocolo simple combinado produce, en aquellas ovejas que desarrollan una fase luteal funcional, respuesta ovárica (cantidad de cuerpos lúteos y de folículos anovulatorios) y calidad embrionaria similares a las del tratamiento de FSHp en dosis múltiples. La tasa de fertilización fue significativamente superior en el tratamiento combinado, en contraposición con otra referencia (Yamada y col., 1996). Sin embargo, la mitad de las hembras que recibieron el tratamiento combinado sufrieron regresión prematura de sus cuerpos lúteos, lo que no ocurrió en aquellas estimuladas en forma convencional. En la segunda parte del experimento (Watanabe y col., 1998b) el perfil hormonal de las ovejas permitió corroborar un nivel de secreción de estradiol similar para ambos tratamientos en cuanto a la existencia de un pico único y a su duración, si bien el régimen combinado produjo niveles de estradiol al pico mucho más elevados. Tras el pico preovulatorio, las concentraciones de estradiol disminuyeron rápidamente a niveles basales en ambos grupos. Las ovejas con regresión de sus estructuras luteales tuvieron perfiles hormonales normales, registrándose únicamente la caída de la progesterona a partir del día 4. La baja incidencia de folículos persistentes pudo deberse al hecho de incluir la

administración de GnRH, lo que, junto con la inseminación artificial en el momento preciso, podrían haber contribuido a lograr una alta tasa de fertilización (Watanabe y col., 1998a). El descenso del estradiol inmediatamente después del pico preovulatorio también se relacionaría con la inyección de GnRH y su capacidad de inducir la ovulación en la población folicular (Watanabe y col., 1998b). Otros estudios contemporáneos (Fukui y col., 1998; Okada y col., 1999) refieren una baja tasa de ovejas de esta misma raza con cuerpos lúteos regresados.

Los estudios de Fukui y col. (1998) y de Okada y col. (1999) en ovejas South-Down estimuladas con el protocolo simple combinado mostraron una respuesta negativa. Dichos autores, al evaluar la viabilidad de este protocolo sencillo en diferentes genotipos, observaron problemas de diversa naturaleza, como una muy alta incidencia del fenómeno de regresión luteal (71,4%; Fukui y col., 1998), hiperestimulación ovárica (Okada y col., 1999) y tasa ovulatoria reducida en las ovejas South-Down con cuerpos lúteos normales (Fukui y col., 1998).

Un estudio realizado en ovejas de raza Corriedale (Yamada y col., 1996) obtuvo resultados similares al estimular mediante 500 UI eCG y 20 mg FSHp en una única inyección o repartida en seis dosis. La mejor respuesta se lograría al inyectar ambas hormonas a las 48 h y no a las 58 h antes de la retirada de las esponjas.. Hay que comentar algunos aspectos de este trabajo. El bajo tamaño muestral utilizado (sólo 5 hembras por grupo), la inclusión en el protocolo de una inyección de GnRH, lo cual condicionó el desencademanamiento del pico de LH y pudo haber influido sobre los perfiles de estradiol y sobre las tasas de fertilización por su conocido efecto en la población folicular; finalmente, el tratamiento simplificado no fue comparado con el protocolo más convencional de superovulación en ovinos (administración de FSH en dosis múltiples sin la inclusión de eCG).

Además del factor racial, la edad (nulíparas vs. multíparas) y la estación del año (primavera vs. otoño) también han demostrado influir sobre la respuesta al tratamiento básicamente mediante diferencias en la proporción de hembras que

desarrollan cuerpos lúteos regresados (Fukui y col., 1998). Según estos autores, la condición de nulípara y/o la estimulación llevada a cabo durante el otoño se vincularían con una mayor incidencia de este fenómeno. La hipótesis de que los aspectos nutricionales explicarían en parte dicho comportamiento ha sido asimismo sugerida (Fukui y col., 1998).

### **2.2.3. Alteraciones endócrinas de la superovulación**

La superovulación es un proceso que altera las funciones endócrina y ovárica independientemente de las preparaciones y los protocolos de administración (Veiga-Lopez y col., 2005). Se describen a continuación sus efectos sobre la secreción de hormona luteinizante, estradiol y progesterona.

#### **2.2.3.1. Hormona Luteinizante**

La presencia de ovejas que no responden a los tratamientos puede alcanzar hasta el 20-30% (Gonzalez-Bulnes y col., 2000, 2003). Se ha observado que algunos folículos, si bien logran crecer hasta llegar al tamaño preovulatorio en respuesta a las gonadotrofinas exógenas, no llegan a ovular. En ciertos tratamientos, la incidencia de estos folículos anovulatorios puede ascender al 50% del total de los folículos preovulatorios (Gonzalez-Bulnes y col., 2000). Sus causas principales corresponderían a alteraciones en el estado folicular al inicio del tratamiento superovulatorio y/o de su crecimiento. De esta forma, es posible que folículos que ya hayan iniciado su proceso de atresia puedan ser rescatados a través de un estímulo de su crecimiento, aunque tanto su capacidad para ovular como la competencia de desarrollo de sus ovocitos estarían claramente comprometidas (Rubianes y col., 1997).

Fisiológicamente, estos fallos de ovulación serían atribuidos a alteraciones en el patrón de secreción de LH tales como la inhibición o la ausencia completa del pico preovulatorio de LH (Jabbour y Evans, 1991a; Gonzalez-Bulnes y col.,

2000; 2002b). La disminución o supresión de los pulsos endógenos de LH podría prevenir la acumulación de demasiada bioactividad LH en circulación, reduciéndola a un mínimo requerido para el desarrollo folicular. El estudio de Gonzalez-Bulnes y col. (2002b) describe, mediante observaciones por ultrasonografía, el desarrollo folicular pero no el pico preovulatorio de LH ni la ovulación en algunas ovejas estimuladas con FSHo. El crecimiento folicular, menor y diferente de las ovejas que respondieron, sugiere que la ausencia de la descarga de LH podría ser atribuída a deficiencias en el desarrollo y en la capacidad esteroideogénica de sus folículos preovulatorios. Otra alteración que se ha observado es la existencia de concentraciones altas de LH por un período prolongado antes de la aparición del pico preovulatorio (Dobson y col., 1997). Sin embargo, aún cuando el patrón de secreción de LH no estuviese alterado, podría no haber respuesta a la acción de la LH debido a la desensibilización de los receptores foliculares de LH (Lopez-Diaz y Bosu, 1992).

El momento de la ovulación podría ser alterado por las gonadotropinas administradas. Esta información sería de interés debido a que aquellas hembras que presentan picos de LH inusualmente tempranos o tardíos o incluso la ausencia del pico, producen significativamente menos embriones. Como consecuencia de la falta de sincronización entre la ovulación y la inseminación (Ryan y col., 1991), puede estar comprometida la fertilización. Otros investigadores observaron que las tasas de recuperación (González-Bulnes y col., 2002b) y de viabilidad (Mitchell y col., 2002) aumentaban con el incremento del intervalo al pico de LH, probablemente debido al mayor tiempo que disponen los ovocitos para completar su maduración citoplasmática (D'Occhio y col., 1999).

#### **2.2.3.2. Estradiol**

La superovulación aumenta la producción de estradiol preovulatorio (Jabbour y Evans, 1991a; Driancourt y Fry, 1992; Murray y col., 1994), aunque los valores concretos estarían relacionados con la gonadotropina empleada. Esta mayor concentración plasmática de estradiol puede ser el resultado de la mayor



cantidad de folículos secretando esta hormona, pero también puede deberse a la proliferación de las células de la granulosa y/o a la estimulación directa de la esteroidogénesis folicular. Inicialmente, el experimento de Moor y col. (1985) basado en el cultivo de folículos provenientes de ovejas estimuladas con eCG o FSH, encontró que la eCG inducía un notable incremento de la secreción de estradiol. Posteriormente, el estudio de Driancourt y Fry (1992) demostró que los folículos individuales obtenidos a partir de animales tratados con eCG, si bien tienen similar cantidad de células de la granulosa, secretan más estradiol en cultivo que aquellos provenientes de ovejas no tratadas, lo que sugiere que el aumento de la esteroidogénesis folicular contribuye a las concentraciones plasmáticas elevadas de este esteroide. Bajo acción de la eCG, se promovería la conversión de colesterol en progesterona y/o la conversión de progestágenos en andrógenos, mecanismos estimulados por la bioactividad LH de la eCG. La mayor producción de andrógenos representaría una reserva importante de precursores para la síntesis de estradiol, con lo cual las concentraciones plasmáticas de estradiol son elevadas en animales tratados con eCG. Siguiendo con el estudio de Driancourt y Fry (1992), los folículos procedentes de animales estimulados con FSH poseen menos células de la granulosa y producen individualmente menos estradiol en cultivo con respecto a aquellos procedentes de animales no estimulados. Por lo tanto, el incremento menos marcado en la concentración plasmática de estradiol detectado en ovejas superovuladas con FSH se debería a la mayor cantidad de folículos pero no a un aumento de la actividad esteroidogénica. En concordancia, el estudio realizado en ovejas Merino por Jabbour y Evans (1991a) refiere unos niveles de estradiol preovulatorio por folículo notablemente superiores (el doble) en ovejas tratadas con eCG en relación a las que recibieron el protocolo con FSH. Mediante muestreos hormonales muy frecuentes (a intervalos de diez minutos), otros autores (Murray y col., 1994) también refieren dicho incremento en la tasa de secreción de estradiol en ovejas estimuladas incluso con una dosis baja de eCG (no superovulatoria) en comparación con ovejas controles.

El patrón de secreción hormonal descrito por Jabbour y Evans (1991a) se caracterizó además por la presentación más temprana del pico de estradiol

cuando las ovejas son estimuladas mediante eCG en lugar de FSH. A pesar de esta diferencia, los investigadores no encontraron modificaciones en el inicio del celo ni en el intervalo al pico de LH en ovejas estimuladas mediante eCG, FSH o co-tratadas, sugiriendo que el tiempo en alcanzar el valor umbral de estradiol requerido para desencadenar la conducta de celo y el pico preovulatorio de LH podría ser independiente del protocolo superovulatorio adoptado.

El pico preovulatorio de estradiol dura menos de 24 h y rápidamente disminuye (McNatty, 1981). El estudio de Murray y col. (1994) informa una rápida caída de la secreción de estradiol tras el pico preovulatorio en ovejas controles, siendo ésta más tranquila en tanto que se halla más demorada en ovejas tratadas con eCG aún con una dosis considerada no superovulatoria. El mantenimiento de concentraciones altas alrededor o después de la ovulación induce desórdenes que podrían afectar a la fertilización y al desarrollo embrionario. Un estudio reciente focalizado sobre la población de folículos anovulatorios (Veiga-Lopez y col., 2005) señala que la mayoría de estos folículos muestran signos de alteraciones funcionales, ya sea inmadurez o atresia, como lo indica su bajo contenido en estradiol; sin embargo, algunos de ellos son altamente estrogénicos, de modo que su permanencia tras la ovulación se asocia con fallos de fertilización. La presencia de folículos anovulatorios y su cantidad no afectó a la fertilización, si bien la sola presencia de un folículo altamente estrogénico fue capaz de interferir en los resultados. La larga vida media que presenta la eCG podría influir en la problemática del desarrollo de folículos tras la ovulación, haciendo que el estradiol permanezca elevado por más tiempo o que se presenten picos secundarios de este esteroide tras el pico preovulatorio (Jabbour y Evans, 1991a; Rubianes y col., 1995; Chagas e Silva y col., 2003).

### **2.2.3.3. Progesterona**

Los niveles de progesterona en el momento del celo podrían ser alterados por las gonadotropinas administradas durante los tratamientos superovulatorios. El experimento de Moor y col. (1985) basado en el cultivo de folículos

procedentes de ovejas estimuladas con eGC o FSH mostró una mayor secreción de progesterona, expresada por mg de tejido, en aquéllos expuestos a eCG. El estudio de Samartzi y col (1995a) informó que si bien no existe una correlación significativa entre los niveles de progesterona al celo y la tasa ovulatoria, se registra un mayor número de cuerpos lúteos en aquellas ovejas que al principio del celo presentan niveles bajos de esta hormona. En forma similar, Sharma y col. (1993) señalan diferencias en la respuesta superovulatoria y en la recuperación de embriones entre ovejas con niveles normales y desviados (altos) de progesterona al inicio del celo. Las altas concentraciones de P4 al celo han sido atribuidas a fenómenos de luteólisis incompleta (Lindsell y col., 1986), luteinización de algunos folículos (Booth y col., 1975) u ovulaciones prematuras (Sharma y col., 1993).

La superovulación aumenta el número de cuerpos lúteos como consecuencia de la mayor tasa ovulatoria, y por lo tanto la mayor concentración plasmática de progesterona durante la fase luteal puede ser el resultado de la mayor cantidad de cuerpos lúteos secretores, del aumento del tejido luteal o de la estimulación directa de la esteroidogénesis. Distintos autores demuestran un aumento progresivo en la concentración plasmática de progesterona durante la fase luteal del ciclo ante dosis crecientes de eCG, en paralelo al aumento de la tasa ovulatoria (Oyedipe y col., 1989; Samatzi y col., 1995a). Esto se debería no sólo al incremento del número de cuerpos lúteos en forma dosis-dependiente, sino además posiblemente a la alteración de la función del propio cuerpo lúteo, como así se observa al expresar la concentración de esta hormona por cada cuerpo lúteo presente en el ovario (Samatzi y col., 1995a). Tal alteración sería el resultado del aumento del diámetro luteal y/o la estimulación de la síntesis de progesterona por las células luteales pequeñas bajo acción de la LH (Hild-Petito y col., 1987). Un estudio (Amiridis y col., 2002) realizado en ovejas de raza Chios mostró unos mayores niveles de progesterona a medida que aumentaba la cantidad de cuerpos lúteos hasta su estabilización en ovejas que tienen una elevada tasa ovulatoria. Es probable que los cuerpos lúteos consecutivos a una alta tasa ovulatoria tengan una actividad esteroidogénica limitada o una masa total similar a la resultante de una tasa ovulatoria menor (Amiridis y col., 2002).

Por el contrario, la estimulación mediante FSH no alteraría la función del cuerpo lúteo, de modo que el incremento de la concentración de progesterona en la circulación se vincularía a la mayor tasa ovulatoria. Un estudio reciente (Grazul-Bilska y col., 2007) refiere una producción de progesterona, expresada por gramo de tejido luteal, similar entre ovejas no superovuladas y superovuladas con FSH, lo cual sugiere que la estimulación con FSH no alteraría la función del cuerpo lúteo.

Cierta proporción de las ovejas inducidas a la superovulación suele desarrollar una fase luteal inadecuada, con la producción de progesterona por pocos días. De acuerdo a Schiewe y col. (1990), el patrón de secreción de la progesterona describe una elevación transitoria hacia el día 3 post-ovulación, seguida por su descenso hasta alcanzar niveles basales entre los días 4 y 5. Este fracaso de la luteinización ha sido observado con posterioridad en otros experimentos (Rubianes y col., 1996; Villanueva y col., 2000; Forcada y col., 2006). A pesar de que la causa exacta de la regresión luteal prematura no ha sido determinada hasta el momento, diversas investigaciones sugieren que podría deberse a la incapacidad del cuerpo lúteo para adquirir su funcionalidad y/o al desencadenamiento prematuro del mecanismo luteolítico. Armstrong y col. (1982) han señalado que los cuerpos lúteos regresados se relacionarían con una excesiva estimulación folicular, de modo que el desarrollo folicular acelerado produciría la ovulación de los folículos antes de que sus células de la granulosa adquirieran la madurez requerida para su luteinización adecuada en respuesta al pico preovulatorio de LH. En este sentido, Rubianes y col. (1996) detectaron un incremento en los niveles de progesterona al inicio del celo en ovejas con regresión luteal. Asimismo, Armstrong y col. (1982) sugirieron que es posible que el desarrollo tras la ovulación de folículos productores de estradiol genere un ambiente hiperestrogénico capaz de iniciar la luteólisis. Posteriormente, el estudio realizado por Jabbour y Evans (1991a) confirmó la incidencia de picos secundarios de estradiol tras el pico preovulatorio de LH en ovejas superovuladas que desarrollan cuerpos lúteos defectuosos. De esta forma, el estradiol segregado por los folículos produciría la aparición anticipada de receptores para oxitocina y por lo tanto, el desencadenamiento adelantado de la secreción pulsátil de  $\text{PGF}_{2\alpha}$

(Garverick y col., 1992). Incluso, Carson y col. (1981) sostienen que incluso los folículos pequeños (menos de 0,2 mm de diámetro) considerados como no estrogénicos que se desarrollan después de la ovulación, producen cantidades pequeñas de estradiol que sin embargo pueden ser suficientes para condicionar en el útero la síntesis de receptores para oxitocina. Un trabajo más reciente (Okada y col., 2000) mostró un menor incremento en los niveles de progesterona y en promedio mayores niveles de estradiol en ovejas con cuerpos lúteos anómalos, lo que indicaría que la progesterona segregada sería insuficiente para inhibir el desarrollo folicular. En base a estas apreciaciones, tales autores concluyen que la presencia de cuerpos lúteos anómalos se debería a la hipoplasia luteal por luteinización inadecuada con la formación de un cuerpo lúteo incompleto de vida más corta, y no debido a la regresión prematura de una estructura completamente funcional por acción de la prostaglandina u otros factores.

Varios son los factores que influyen sobre la magnitud de este fracaso luteal. La inducción a la superovulación tras un tratamiento de sincronización de celos a base de prostaglandinas ha sido asociada a una mayor incidencia de regresión luteal (Trounson y col., 1976; Schiewe y col., 1991). Según ha sido sugerido por Forcada y col. (2000, 2006), la tasa de regresión podría ser mayor durante el anestro estacional que en plena estación de cría incluso en ovinos explotados en bajas latitudes. Sin embargo, en algunos ensayos realizados bajo condiciones de pastoreo (Jabbour y col., 1991; Ryan y col., 1991) se ha encontrado una mayor incidencia de este fenómeno durante el otoño en comparación con la primavera, probablemente atribuido a diferencias en la calidad de los pastos. La influencia del componente nutricional ha sido sugerida en base a los menores niveles de glucosa plasmática detectados en ovejas con regresión de sus cuerpos lúteos (Ryan y col., 1991) y a la respuesta lograda a partir de la suplementación con lupino (Jabbour y col., 1991). Del mismo modo, las diferencias en la magnitud de las tasas de regresión entre nulíparas y multíparas (Fukui y col., 1998) podrían ser explicadas en parte por el estado nutricional. También es posible que el estrés desencadenado por diversos factores

ambientales desempeñe un papel importante sobre la incidencia de fallos en la funcionalidad de los cuerpos lúteos (Forcada y col., 2000; Okada y col., 2000).

Desde el punto de vista práctico, la regresión prematura del cuerpo lúteo limita la posibilidad de obtención de embriones viables. Se ha encontrado que el número de embriones recuperados clasificados como transferibles está relacionado con la presencia de cuerpos lúteos normales, que producen niveles de progesterona plasmática correspondientes a una fase luteínica funcional (Cerbón, 1995; Saharrea, 1995). Por el contrario, la regresión luteal se asocia a rendimientos pobres, ya que en estas hembras la recolección de embriones sería reducida o nula (Schiewe y col., 1990; Cerbón, 1995; Rosas, 1995; Rubianes y col., 1996) y además en ellas estaría incrementado el porcentaje de embriones con procesos degenerativos (Saharrea, 1995).

#### **2.2.4. Factores que afectan la superovulación**

La respuesta a los protocolos de estimulación ovárica es afectada por factores intrínsecos y extrínsecos.

Entre los intrínsecos, es decir aquellos inherentes al animal, ha sido mencionada la **raza** como un factor prioritario. A los efectos de ilustrar la existencia de variaciones raciales, es de destacar la aportación de Torrès y col. (1987), quienes trabajando bajo las mismas condiciones en tres diferentes razas, Préalpes, Lacaune y Romanov x Préalpes, obtuvieron una respuesta ovárica superior en ovejas cruce Romanov x Préalpes, genotipo referido como más prolífico. Sin embargo, las diferencias parecen ser menos marcadas entre razas no prolíficas (Picazo y col., 1996). Por su parte, Maurer (1988) demostró asimismo que la raza de las hembras donadoras tiene un efecto marcado sobre la respuesta superovulatoria. Según Bindon y col. (1986) las razas más prolíficas serían especialmente más sensibles a los protocolos que incluyen eCG. Globalmente, la bibliografía muestra grandes variaciones en la respuesta superovulatoria al utilizar razas ovinas distintas bajo similares condiciones de trabajo. Incluso, protocolos que

han resultado satisfactorios para algunas razas no se han mostrado efectivos cuando son aplicados en otras. Esta problemática parece agudizarse en los tratamientos superovulatorios simplificados, como se detalló previamente en el punto **2.2.2. Simplificación de los protocolos de administración de FSH**, del presente capítulo.

La influencia de la **edad** sobre la respuesta superovulatoria está determinada por el hecho de que la tasa ovulatoria natural y espontánea está asimismo relacionada con ella (Theriez y col., 1971). Si bien es posible lograr respuesta superovulatoria en hembras prepúberes debido a que sus folículos son sensibles a las gonadotrofinas (Driancourt y col., 1990b), la tasa ovulatoria es menor en comparación con las hembras adultas (Driancourt y Avdi, 1993). Estas diferencias siguen manteniéndose una vez alcanzada la pubertad, como así lo demuestran varios trabajos. Un estudio realizado en ovejas Scottish Blackface (Bari y col., 2001), mostró una mayor respuesta superovulatoria y un mayor número de embriones recuperados a partir de las ovejas maduras en comparación con las borregas. Chagas e Silva y col. (2003), trabajando en la raza portuguesa Saloia, señalaron una mayor tasa ovulatoria en ovejas multíparas en comparación con primíparas y nulíparas. Por su parte, Forcada y col. (2000), utilizando ovejas prolíficas de la raza Rasa Aragonesa al final de su vida productiva (edad avanzada), encontraron una depresión en el porcentaje de hembras ovuladas y en la cantidad de estructuras recuperadas y fertilizadas en comparación con las típicamente observadas en animales más jóvenes. En contraposición con la mayoría de los resultados reportados en la literatura, Lopes y col. (2006), trabajando con una raza brasilera de alta prolificidad, logran una muy buena respuesta en borregas, probablemente debido a una menor exposición a las enfermedades.

El número de folículos es muy variable entre animales de una misma raza, pero parece ser un carácter bastante repetible, como así sugiere el estudio reciente de Mossa y col. (2007). El efecto del **individuo** es también analizado por Cordeiro y col. (2003), quienes informan la repetición de la falta de respuesta al tratamiento hormonal en ovejas sometidas a dos superovulaciones consecutivas.

En otro trabajo realizado a lo largo de varios años sobre las mismas ovejas, se observó una repetibilidad significativa en la tasa ovulatoria y en la cantidad de embriones recuperados por donante (Bari y col., 2001), sobre todo en la primera. Estos autores destacaron que la tasa ovulatoria es el determinante más importante del número de embriones, de modo que existe una relación estrecha entre estos dos caracteres. Sin embargo, debido a que la recuperación embrionaria depende de otros factores adicionales a la tasa ovulatoria e independientes del animal (por ejemplo la eficiencia en la propia recuperación e incluso en la búsqueda de los embriones), la influencia del ambiente sobre la cantidad de embriones logrados por oveja es mayor que la que corresponde a la tasa ovulatoria.

La respuesta de las ovejas a los tratamientos superovulatorios se halla asimismo influenciada por las **estructuras** (folículos y cuerpos lúteos) **presentes en los ovarios** al inicio del régimen de gonadotrofinas. Se ha encontrado que la tasa ovulatoria se relaciona positivamente con la cantidad de folículos pequeños (2 a 3 mm) que existen en el momento de aplicar la primera dosis de FSH (Gonzalez-Bulnes y col., 2000, 2002b; Veiga-Lopez y col., 2005). Por el contrario, la tasa ovulatoria es afectada negativamente por la presencia de un folículo grande dominante ( $\geq 6$  mm) en protocolos con inyecciones únicas de eCG (Rubianes y col., 1995) o FSH (Lopez-Sebastian y col., 1999), posiblemente por reducir la sensibilidad a las gonadotrofinas de los folículos menores. Sin embargo, en los regímenes de inyecciones múltiples de FSHo la tasa ovulatoria no parece estar afectada por la presencia de un folículo dominante, aunque se lograrían menos embriones viables (Gonzalez-Bulnes y col., 2002b). El estudio reciente de Veiga-Lopez y col. (2005) destaca que la presencia de un folículo dominante en el momento de la primera dosis de FSHo afecta el tamaño de la población folicular que responde al tratamiento; así, la ovulación proviene de folículos de 3 a 5 mm y de 2 a 3 mm en ausencia y presencia de folículo dominante, respectivamente. Como resultado de la ovulación de los folículos más pequeños (2 mm), la viabilidad embrionaria se vería reducida a expensas de procesos degenerativos (Veiga-Lopez y col., 2005). La presencia de un cuerpo lúteo al inicio de la estimulación ejercería un efecto positivo dual sobre la viabilidad embrionaria, *per*



se y por interacción con el folículo dominante. Se ha observado que la existencia de cuerpo lúteo atenuaría la degeneración de los embriones procedentes de la estimulación de folículos de 2 mm en presencia de folículo dominante, siempre que sean recuperados del útero y no de oviducto, lo cual resalta la influencia del cuerpo lúteo sobre el ambiente uterino (Veiga-Lopez y col., 2005).

La **historia superovulatoria**, es decir si las hembras han sido previamente incluidas en los programas como donantes y la cantidad de tratamientos que han recibido, representa un factor importante en el rendimiento, como así lo avalan distintas publicaciones (Al-Kamali y col., 1985; Fuki y col., 1985; McKelvey y col., 1986; Torres y Sevellec, 1987; Gulyani y Naqvi, 1994; Forcada y col., 2000). Al problema de depresión en la respuesta por refractariedad, debería sumarse la limitante que representa la formación de adherencias tras las sucesivas laparotomías. De esta forma, el abordaje por laparotomía con exteriorización del tracto reproductivo frecuentemente conduce a la formación post-operativa de adhesiones en útero, oviductos y ovarios, con efectos negativos sobre la tasa de recuperación (Torres y Sevellec, 1987).

Diversos autores señalan **variaciones estacionales** en la respuesta superovulatoria en ovejas de diferentes razas explotadas en latitudes altas (Gherardi y Lindsay, 1980; Torres y col., 1987; Mufti y col., 1997; Naqvi y col., 2001). Dado que los mecanismos que controlan el número de folículos maduros secretores de estrógenos se hallan activos durante el anestro (Webb y col., 1992), las variaciones estacionales obtenidas en la tasa ovulatoria y en la respuesta a los tratamientos estarían asociadas a diferencias estacionales en la sensibilidad de los ovarios a las gonadotrofinas exógenas (Gherardi y Lindsay, 1980). Sin embargo, esta influencia estacional estaría relacionada con la raza y/o la localización del rebaño, pues no se ha hallado un efecto significativo de la época del año sobre la respuesta superovulatoria en ovejas localizadas en zonas mediterráneas. De esta forma, estudios realizados en la raza Chios en Grecia empleando eCG no detectan variaciones en la respuesta superovulatoria ni en la recuperación embrionaria entre ovejas ciclando y en anestro (Samartzi y col., 1995b). Tampoco se han observado variaciones estacionales (otoño vs. primavera) en la tasa ovulatoria de ovejas

donantes de la raza portuguesa Saloia estimuladas con eCG o FSHo (Chagas e Silva y col., 2003). Sin embargo, estos autores destacan el efecto negativo de la eCG sobre los folículos persistentes y la recuperación embrionaria más pronunciado en el otoño que durante la primavera, sugiriendo una mayor sensibilidad a la eCG durante el otoño. Mitchell y col. (2002), trabajando con ovejas inglesas durante plena estación o en la transición al anestro, no encontraron diferencias en la cantidad de cuerpos lúteos tras superovular con FSHo, pero sí influencias estacionales sobre la fertilización. Un estudio reciente (Bettencourt y col., 2008) en ovejas Merino Negro Portuguesa estimuladas con FSHo, encontró una menor tasa de embriones congelables durante la primavera atribuida a una mayor proporción de folículos pequeños que, si bien logran ovular, producen ovocitos menos competentes que generan embriones de menor calidad. Los resultados de los ensayos desarrollados en India sugieren que la respuesta superovulatoria estaría influenciada por la estación en ovejas tratadas con FSH, pero no en tratamientos que combinan FSH y eCG (Naqvi y col., 2001).

El **manejo de la alimentación** de las ovejas en programas de superovulación influye asimismo sobre los resultados. Un estudio reciente (Kakar y col., 2005) destaca que las condiciones nutricionales necesarias para maximizar la tasa ovulatoria (aumento del plano nutricional) difieren de aquellas requeridas para mejorar la calidad embrionaria (plano nutricional relativamente bajo, al menos inmediatamente después de la ovulación). Lozano y col. (2003) señalan que dietas altas suministradas antes de la ovulación tienen efectos adversos sobre la calidad de los ovocitos. El peso vivo y la condición corporal relacionados con el estado nutricional también tendrían influencia sobre la incidencia de regresión luteal prematura. La mayor tasa de regresión luteal hallada durante el otoño en comparación con la primavera en algunos ensayos sobre base pastoril ha sido atribuida a la menor calidad de las pasturas durante la estación de otoño (Jabbour y col., 1991; Ryan y col., 1991). Finalmente, el menor desarrollo de las hembras nulíparas en comparación con las que ya han parido previamente podría explicar el mayor impacto del fenómeno de regresión luteal registrado en las primeras (Fukui y col., 1998).

Los factores extrínsecos comprenden los relativos a los protocolos de estimulación. Como se desarrolló anteriormente en el presente capítulo (puntos **2.2.1.2. El tratamiento de estimulación ovárica - 2.2.1.2.1. Gonadotropina Coriónica Equina (eCG) - 2.2.1.2.2. Hormona Folículo Estimulante (FSH) - 2.2.2. Simplificación de los protocolos de administración de FSH**), la bibliografía abunda en la influencia del tipo, fuente, dosis, vía de inyección y momento de administración del tratamiento hormonal sobre la respuesta lograda.

### III. OBJETIVOS

La superovulación permite la multiplicación de hembras superiores a tasas mayores que las naturales. Aunque las mismas se han utilizado en las diferentes especies de interés zootécnico, han logrado su mayor difusión en el bovino.

En ovinos ha sido realizada mediante diferentes fuentes hormonales, siendo las más utilizadas la eCG (gonadotrofina del suero de yegua preñada) y la FSH (hormona folículo estimulante). La eCG tiene las ventajas de su bajo costo y sencilla administración (en única inyección) debido a su larga vida media, pero acarrea una menor eficiencia (Martemucci y col., 1995; Blanco y col., 2003; Chagas e Silva y col., 2003). Para superar este inconveniente se planteó el empleo de FSH. Las fuentes de FSH provienen principalmente de las especies porcina y ovina y difieren en su contenido en LH. Debido a su vida media corta, la FSH debe ser inyectada en un régimen de dosis múltiples, generalmente decrecientes por su contaminación con LH. Estos protocolos pueden resultar estresantes para los animales, laboriosos y acarrear errores en la dosificación y en los tiempos de inyección. La alternativa de utilizar dosis constantes ha dado resultados contradictorios según el grado de contaminación con LH de las preparaciones (Torrès y col., 1987; Bunch y col., 2000; Gonzalez-Bulnes y col., 2000, 2002b; Bari y col., 2001; Lymberopoulos y col., 2001; Berlinguer y col., 2004; Bettencourt y col., 2008). Con el objetivo de administrar la FSH en una única inyección se ha propuesto el empleo de vehículos retardantes, entre ellos el polivinilpirrolidona (PVP). Sin embargo, los estudios en la especie ovina son escasos y contradictorios (Dattena y col., 1994; Lajous y col., 1997; D'Alessandro y col., 2001). La administración de FSH en salina en única inyección junto con una dosis baja de eCG ha sido estudiada en algunas razas (Maxwell y Wilson, 1989; Ledda y col., 1992; Dattena y col., 1994; Yamada y col., 1996; Fukui y col., 1998; Watanabe y col., 1998a; Okada y col., 1999, 2000; Leoni y col., 2001), con resultados dispares. La fuente de FSH testada en protocolos simplificados proviene mayoritariamente de la especie porcina. Sin embargo, se ha encontrado un descenso de la respuesta ovárica a partir de la estimulación con FSH

heteróloga repetidamente en las mismas ovejas (Al-Kamali y col., 1985). Otro aspecto a destacar es que los protocolos habituales de superovulación mediante FSH resultan muy costosos. Por lo tanto, es interesante investigar la posibilidad de reducir costes sin mermas significativas en los rendimientos. Diversos factores tienen influencia en la respuesta superovulatoria en las ovejas; entre ellos figuran la raza, la estación del año, la edad y los relacionados al tipo, fuente, dosis y modo de administración del tratamiento hormonal utilizado para inducirla.

La explotación ovina ha representado históricamente un capítulo importante dentro de las producciones agropecuarias de Argentina. Pese a que en las últimas décadas el sector ovino perdió interés, la situación actual se vislumbra muy propicia para su reactivación. La raza Corriedale es explotada para carne y lana, especialmente en Sudamérica. En Argentina representa casi el 38% del censo total, se distribuye en toda la superficie territorial y es explotada en forma extensiva. A pesar de su potencial, el ovino ha permanecido relegado en materia de aplicación tecnológica, siendo escasos los trabajos sobre superovulación realizados en esta u otras razas en nuestro medio. De este modo, no se han llevado a cabo estudios para el desarrollo de protocolos sencillos de estimulación apropiados para estos rebaños.

Por lo tanto, el objetivo general del presente trabajo ha sido simplificar los tratamientos superovulatorios en ovejas Corriedale dentro de la estación de cría. En concreto, se proponen los siguientes objetivos:

- Evaluación de la respuesta de ovejas Corriedale a diferentes tratamientos superovulatorios en base a FSH ovina.
- Evaluación de la posibilidad de utilizar protocolos simplificados de superovulación en ovejas Corriedale a base de FSH ovina y en su caso de eCG. Se pretende con ello optimizar el coste de las técnicas MOET en la citada raza.

- Identificación de los perfiles hormonales de los protocolos simplificados en relación a los de los tradicionales de varias aplicaciones, en particular de la liberación de LH antes de la ovulación.

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. LOCALIZACIÓN DEL ENSAYO**

La etapa experimental comprendió la ejecución de diferentes experimentos, los cuales fueron realizados durante tres años consecutivos.

El Experimento 1 se llevó a cabo durante los años 2003 y 2004 en un establecimiento particular situado en la localidad de Olavarría, provincia de Buenos Aires, y en la Reserva Ovina N°8 perteneciente al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) situada en la localidad de Balcarce, provincia de Buenos Aires.

El Experimento 2 se desarrolló durante los años 2004 y 2005, en la Reserva Ovina N°8 perteneciente al INTA situada en la localidad de Balcarce, provincia de Buenos Aires.

Geográficamente, la localidad de Olavarría se encuentra ubicada a 36° 51' de latitud Sur y a 60° 13' de longitud Oeste, a unos 165 metros sobre el nivel del mar. La temperatura promedio anual es de 14,2°C y la precipitación pluvial anual promedio es de 927 mm. La localidad de Balcarce se sitúa a 37° 45' de latitud Sur y a 58° 18' de longitud Oeste, a unos 130 metros sobre el nivel del mar. La temperatura promedio anual es de 13,7°C y la precipitación pluvial anual promedio es de 845 mm.

En todos los ensayos, las condiciones de manejo y alimentación fueron similares.

### **4.2. ANIMALES EXPERIMENTALES**

En los experimentos se utilizaron ovejas adultas (3 a 6 años de edad) pertenecientes a la raza Corriedale. Al momento de los ensayos tuvieron un peso

corporal promedio de 50 kg y una condición corporal superior a 3 (en una escala de 1 a 5; Russel, 1991). Las ovejas no habían sido sometidas previamente a tratamientos de superovulación y transferencia embrionaria.

Los ensayos fueron realizados dentro de la estación reproductiva indicada para la raza en la zona de explotación, específicamente entre mediados de marzo y fines de mayo (otoño).

Los animales fueron manejados en forma conjunta en lotes de dimensiones reducidas. La alimentación estuvo basada en el pastoreo de praderas consistentes en una mezcla de *Lolium perenne* (Raygrass perenne) y *Trifolium repens* (Trébol Blanco). Además, durante el período de labores más intensivas requeridas en los experimentos, los animales recibieron una dieta suplementaria de heno de alfalfa (*Medicago sativa*). El consumo de agua fue *ad-libitum*.

### **4.3. TRATAMIENTOS SUPEROVULATORIOS**

Los celos de las ovejas fueron sincronizados mediante esponjas intravaginales conteniendo 60 mg de acetato de medroxiprogesterona, que permanecieron 14 días en vagina.

Las ovejas fueron asignadas al azar a los grupos experimentales que se detallan a continuación.

#### **4.3.1. Experimento 1**

Su objetivo fue evaluar diferentes protocolos de superovulación en base a FSH ovina (FSHo) sólo o en combinación con eCG.

Grupo A1 (FSHo+eCG) (n=13): 176 NIH-FSH-S1 unidades NIADDK-oFSH-17 (Ovagen, ICPbio, Nueva Zelanda) disueltas en solución salina fueron administradas en una única inyección i.m. 48h antes de la remoción de las



esponjas. Al mismo tiempo de la inyección de FSHo, se administraron 500 UI de eCG (Folligon, Intervet) por vía i.m.

Grupo B1 (FSHo\_4di) (n=12): 176 NIH-FSH-S1 unidades NIADDK-oFSH-17 fueron disueltas en solución salina y repartidas en 4 dosis i.m. comenzando con la primer inyección a las 24 h antes de la remoción de las esponjas, y a intervalos de 12 h. Se utilizó un protocolo de dosis iguales.

Grupo C1 (FSHo/PVP) (n=13): 176 NIH-FSH-S1 unidades NIADDK-oFSH-17 disueltas en una solución 30% de polyvinylpyrrolidona (PVP; Sigma-Aldrich Química S.A., Buenos Aires, Argentina; peso molecular: 40.000) fueron administradas en una única inyección i.m. a las 24 h previas al retiro de las esponjas sincronizadoras. A tal fin, la hormona fue disuelta en un escaso volumen de solución salina y luego mezclada en una solución de PVP para lograr una concentración final en la solución a inyectar del 30% de PVP.

Grupo D1 (FSHo\_6di) (n=14): 176 NIH-FSH-S1 unidades NIADDK-oFSH-17 fueron administradas por vía i.m. en vehículo salino, repartidas en 6 dosis de concentraciones iguales, a intervalos de 12 h, comenzando 48 h antes de finalizar el tratamiento de sincronización de los celos.

Grupo E1 (FSHo3/4\_4di+eCG) (n=7): 132 NIH-FSH-S1 unidades NIADDK-oFSH-17, disueltas en solución salina, fueron administradas en 4 inyecciones i.m. comenzando a las 24 h antes de la remoción de las esponjas y a intervalos de 12 h. Se utilizó un protocolo de dosis iguales. Conjuntamente con la primera inyección de FSHo, se administraron 500 UI de eCG por vía i.m.

Grupo F1 (FSHo3/4/PVP+eCG) (n=7): 132 NIH-FSH-S1 unidades NIADDK-oFSH-17, fueron administradas en vehículo PVP en una única inyección i.m., 24 h antes de la remoción de las esponjas. Al mismo tiempo de la inyección de FSHo en PVP, se administraron 500 UI de eCG i.m.

### 4.3.2. Experimento 2

Fue diseñado sobre la base de la información preliminar obtenida a partir del Experimento 1. El protocolo simplificado que obtuvo el mejor desempeño en el Experimento 1 (Grupo A1) fue seleccionado (Grupo A2) y comparado con el mismo protocolo, pero usando una dosis de FSH ovina reducida (Grupo B2), y con el protocolo más convencional de administración de FSH (en dosis múltiples decrecientes) (Grupo C2).

Los grupos experimentales fueron los siguientes:

Grupo A2 (FSHo+eCG) (n=16): 176 NIH-FSH-S1 unidades NIADDK-oFSH-17 fueron administradas en solución salina en una única inyección i.m. 48h antes de la remoción de las esponjas. Al mismo tiempo de la inyección de FSHo, se administraron 500 UI de eCG por vía i.m.

Grupo B2 (FSHo3/4+eCG) (n=14): 132 NIH-FSH-S1 unidades NIADDK-oFSH-17 fueron disueltas en solución salina y administradas por vía i.m. en una única inyección 48h antes del retiro de las esponjas. Conjuntamente se administraron 500 UI de eCG por vía i.m.

Grupo C2 (FSHo\_8dd) (n=17): 176 NIH-FSH-S1 unidades NIADDK-oFSH-17 fueron administradas por vía i.m., en vehículo salino, repartidas en 8 dosis de concentraciones decrecientes (35,2 unidades x 2 y 17,6 unidades x 6) a intervalos de 12 h, comenzando 72 h antes de finalizar el tratamiento de sincronización de los celos.

### 4.4. SERVICIOS Y DETECCIÓN DE LOS CELOS

Tras la retirada de las esponjas, las ovejas fueron expuestas a los moruecos en una proporción de 1:10 aproximadamente. Los moruecos fueron provistos de arneses marcadores a los efectos de verificar la presentación de los

celos mediante la visualización de las marcas que dejan en las ovejas al realizar las montas.

La detección de los celos se realizó a intervalos regulares de 6 h, desde la retirada de las esponjas y durante un periodo de tiempo de 96 h. Aquellas hembras que resultaron marcadas, eran apartadas y expuestas en pequeños lotes ante otros moruecos. Los servicios se realizaron al momento de la detección de los celos y se repitieron 12 y 24 horas después. Posteriormente, las ovejas permanecieron en otros lotes con un macho por cada 5 ovejas durante dos días adicionales.

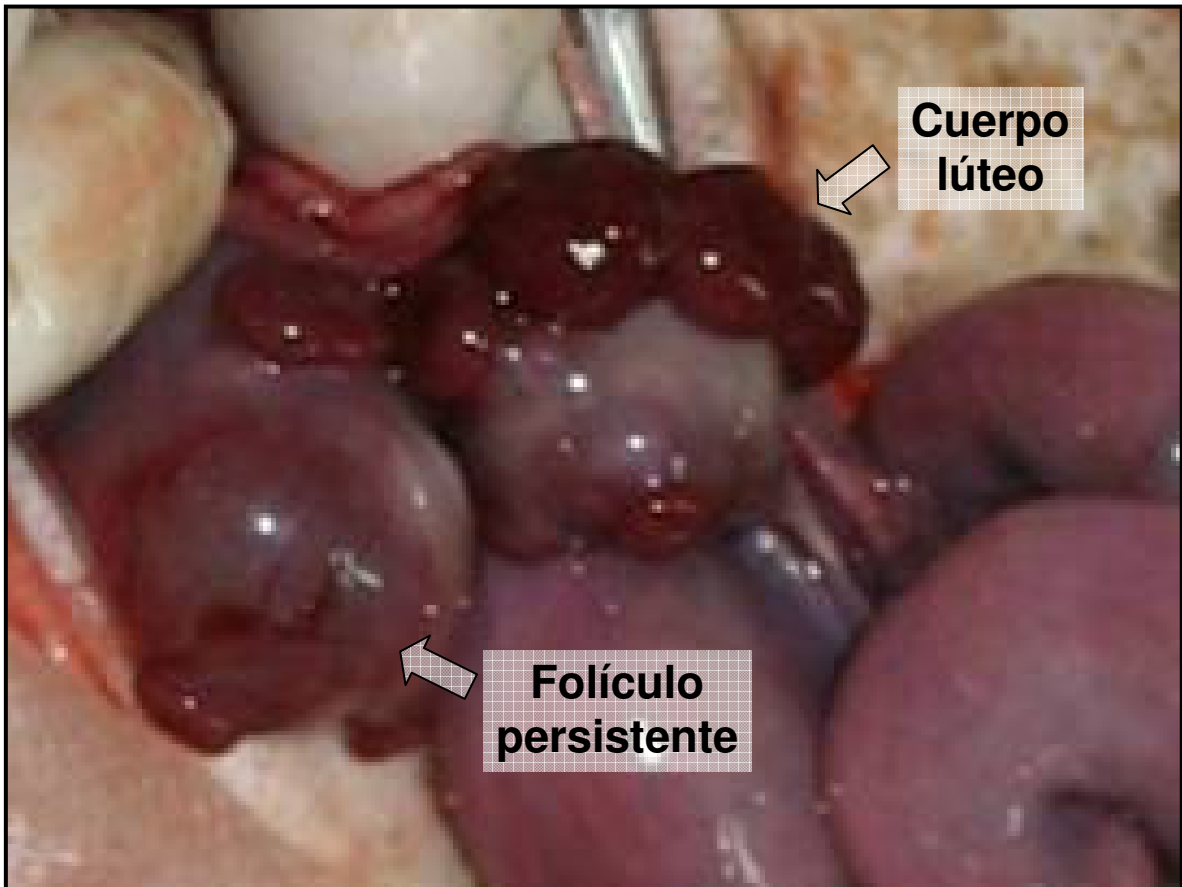
#### **4.5. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA OVÁRICA**

Seis días después de los celos las ovejas fueron sometidas a laparotomías. Para ello, fueron anestesiadas i.m. con 1 ml de xilacina 2% y 4 ml de clorhidrato de Ketamina.

Una laparotomía ventral inguinal fue practicada para proceder a la exteriorización de los ovarios con la finalidad de determinar el número de cuerpos lúteos funcionales, cuerpos lúteos en regresión (definidos como cuerpos lúteos avasculares, pálidos y con un diámetro inferior a 3 mm; D'Alessandro y col., 1996) y folículos persistentes (folículos anovulatorios con un diámetro mínimo de 5 mm). En la Figura 5 se observan las estructuras ováricas.

Aquellas ovejas que presentaron al menos 1 cuerpo lúteo fueron consideradas ovuladas, en tanto que las que presentaron al menos 3 cuerpos lúteos fueron consideradas superovuladas.

**Figura 5:** Estructuras ováricas.



#### **4.6. RECUPERACIÓN Y EVALUACIÓN EMBRIONARIA**

Posteriormente, se procedió a la recuperación de las estructuras. Se insertó un catéter de polietileno de 2 mm de diámetro (Tom-cat) en el lumen uterino unos 1,5 cm desde la unión útero-tubal y una sonda pediátrica (Folley) en la base del cuerno con la finalidad de proceder al lavado del mismo.

El medio de lavado fue introducido desde la unión útero tubal hacia la base del cuerno uterino. El medio empleado para la recuperación de los embriones consistió en buffer fosforado salino (PBS) con 1% suero bovino y 1% antibióticos (100 UI/ml penicilina y 50 UI/ml sulfato de estreptomicina) a una temperatura de 37°C. Cada cuerno fue lavado con 30 ml de medio (Figura 6).

**Figura 6:** Recuperación de los embriones mediante laparotomía.



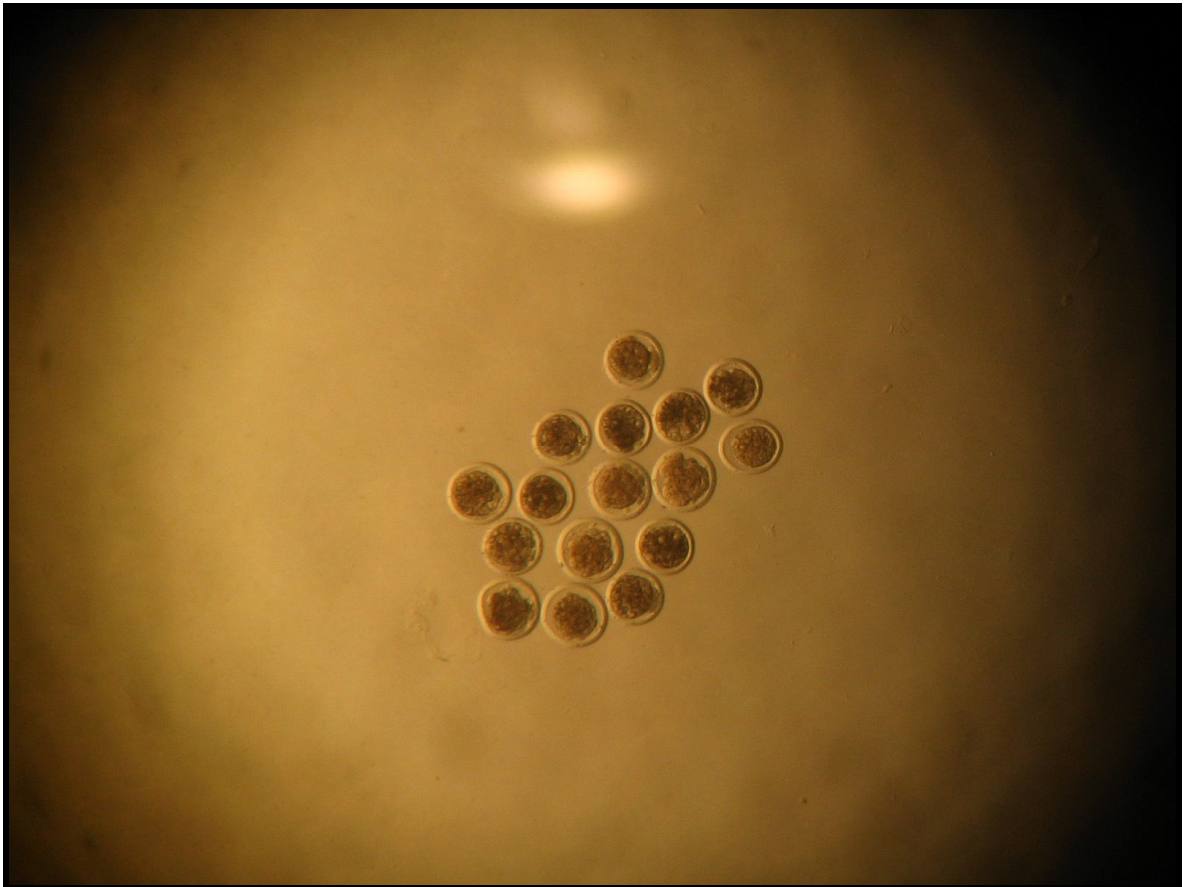
El lavado de cada cuerno de cada hembra fue recuperado en placas de petri previamente reticuladas y observado bajo lupa estereoscópica para proceder a la búsqueda de las estructuras recuperadas (Figura 7). Las estructuras identificadas fueron lavadas en PBS suplementado con 10% suero bovino y 1% antibióticos y mantenidas en este medio durante su evaluación.

Se realizó una clasificación teniendo en consideración las siguientes categorías: ovocitos no fertilizados y embriones, tomando la división (presencia de al menos 2 células) como evidencia de fertilización.

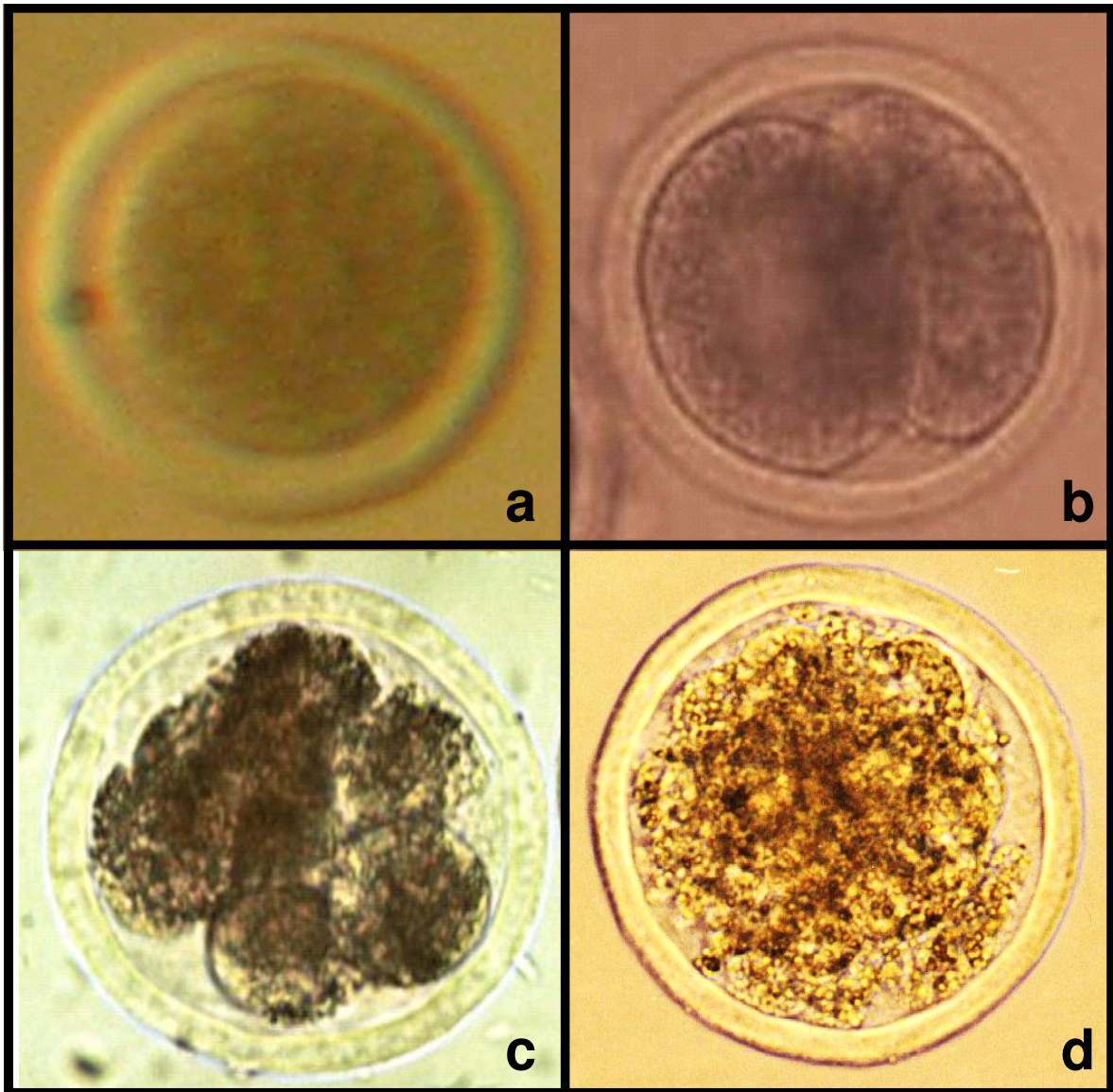
Los embriones fueron observados a mayor aumento (100X) y evaluados de acuerdo a su estadio del desarrollo en relación al celo y a su apariencia morfológica (Winterberger-Torres y Sevellec, 1987; detallado en el ANEXO I). Finalmente, fueron clasificados en embriones “no viables” (retardados o de

calidad pobre; Figura 8) y “viables” (embriones de excelente o buena calidad; Figura 9) (detallado en el ANEXO II).

**Figura 7:** Búsqueda de los embriones bajo microscopio.

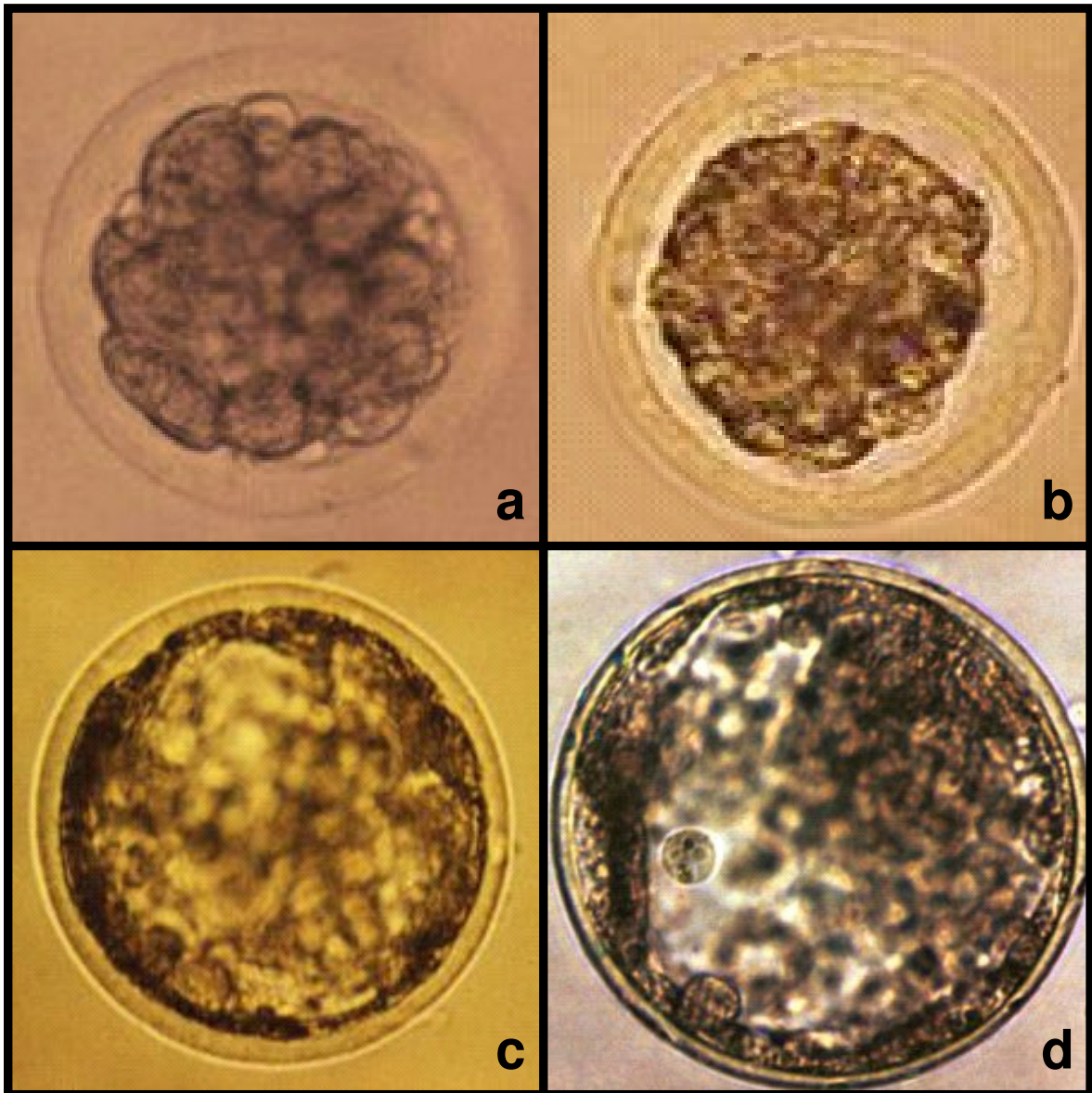


**Figura 8:** Embriones no viables.



- (a) Ovocito no fertilizado
- (b) Embrión de 2 células
- (c) y (d) Embriones degenerados

**Figura 9:** Embriones viables.



- (a) Mórula
- (b) Mórula compacta
- (c) Blastocisto
- (d) Blastocisto expandido



## 4.7. ANÁLISIS HORMONALES

### 4.7.1. Análisis de LH

Los análisis de LH fueron realizados en un total de 80 ovejas elegidas al azar y pertenecientes a los diferentes grupos experimentales (A1: n=11; B1: n=10; C1: n=10; D1: n=10; E1: n=7; F1: n=7; A2: n=10; B2: n=6; C2: n=9).

A los efectos de determinar los niveles de LH en las ovejas, se tomaron muestras de sangre de vena yugular a intervalos regulares de 6 h a partir de la retirada de las esponjas y durante un lapso de hasta 96 h, dependiendo de la presentación de los celos. En el caso de los tratamientos que continuaron durante este período con la estimulación mediante FSH, las extracciones de sangre se realizaron siempre inmediatamente antes de las inyecciones hormonales. La sangre fue centrifugada y el plasma separado y conservado a -20°C hasta su análisis.

Los análisis de LH fueron realizados en el Laboratorio del grupo de investigación de “Fisiología de la Reproducción Animal” del Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Universidad de Zaragoza, España.

Las concentraciones plasmáticas de LH fueron determinadas mediante el test inmunoenzimático de tipo ELISA sandwich, de acuerdo a la metodología validada previamente (Valares y col., 2006). Se utilizaron placas de polivinilo de 96 pocillos sensibilizadas mediante anticuerpo de captura empleado en el desarrollo de ensayos de ELISA para LH en varias especies, entre ellas ovinos (Spearow y Trost, 1987). Los pocillos fueron recubiertos con 100 µl de anticuerpo monoclonal de ratón (0,8 µg 518B7 antiLH/ml en PBS) e incubados toda la noche a temperatura ambiente. El anticuerpo no unido fue eliminado mediante lavados repetidos en PBS. Luego, las placas fueron cubiertas con 300 µl por pocillo de solución bloqueante, incubadas durante 3 h a temperatura ambiente, lavadas tres veces con PBS y mantenidas a 5°C hasta la realización de los análisis.

A partir del standard de LH (NIDDK-oLH-I-4) liofilizado se realizaron diluciones en solución de dilución para proveer las concentraciones para los diferentes puntos de la curva de calibración: 0, 1, 5 y 10 ng/ml.

Tanto los standards como las muestras (100  $\mu$ l) fueron añadidos a los pocillos por duplicado e incubados durante 2 h a 37°C. Tras 3 lavados con solución de lavado, se añadieron 100  $\mu$ l por pocillo del segundo anticuerpo anti-LH enzima-conjugado en buffer (dilución 1:5000). Dicho anticuerpo fue obtenido por inmunización de conejos mediante inyecciones subcutáneas de 250  $\mu$ g de LH ovina (NIDDK, oLH-26; AFP 5551B), purificación del antisuero mediante una pequeña columna de proteína G y finalmente conjugado con peroxidasa.

Después de su incubación durante 30 min a temperatura ambiente, las placas fueron lavadas 3 veces, se adicionó 100  $\mu$ l por pocillo de cromógeno tetrametyl benzidina (TMB; Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España) y se incubaron nuevamente durante 30 min a temperatura ambiente.

Finalmente, con el propósito de detener la conversión enzimática del sustrato, se agregó 50  $\mu$ l 0,5 mol/l de ácido sulfúrico.

La densidad óptica de cada pocillo fue medida dentro de los 15 min a 450 nm mediante un lector microELISA (Labsystem, Multiskan MS Reader, Finlandia).

Aquellas muestras que excedieron los 10 ng/ml de LH fueron diluídas y analizadas nuevamente.

Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron 8,2% y 11,7%, respectivamente. La sensibilidad del ensayo fue de 0,05 ng/ml.

Se definió al pico de LH como aquél correspondiente a la concentración máxima de LH alcanzada y se determinaron el intervalo de tiempo y la magnitud del citado pico.

#### 4.7.2. Análisis de progesterona

A los efectos de determinar las concentraciones de P4, se tomaron muestras de sangre de vena yugular en dos momentos, en la detección del celo y en el momento de la recuperación de embriones inmediatamente antes de practicar las laparotomías. La sangre fue recogida y procesada de acuerdo al detalle descrito previamente para LH.

Los análisis de progesterona fueron realizados en el Servicio de Radioisótopos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, España.

Para la determinación de progesterona se utilizó la técnica de RIA en fase sólida basada en tubos recubiertos con anticuerpo de conejo anti-progesterona, progesterona marcada con  $^{125}\text{I}$  y antisuero de ratón (DPC, Los Angeles, USA). La sensibilidad del ensayo fue de 0,05 ng/ml y los coeficientes de variación intra e interensayo fueron 11,1% y 8,2%, respectivamente.

#### 4.8. ANÁLISIS DE LOS DATOS

Para cada grupo experimental, se consideraron los siguientes indicadores:

- Intervalo de tiempo desde la retirada de las esponjas hasta la presentación de los celos (horas).
- Intervalo de tiempo desde la retirada de las esponjas hasta el pico de LH (horas).
- Intervalo de tiempo entre el inicio del celo y el pico de LH (horas).
- Magnitud del pico de LH (ng/ml).
- Concentración de P4 al momento del celo (ng/ml).

- Porcentaje de ovejas ovuladas (presencia de al menos 1 cuerpo lúteo funcional) (%).
- Porcentaje de ovejas superovuladas (presencia de al menos 3 cuerpos lúteos funcionales) (%).
- Porcentaje de ovejas con cuerpos lúteos regresados (%).
- Número de cuerpos lúteos funcionales.
- Número de folículos persistentes.
- Concentraciones de P4 total y P4 producida por cuerpo lúteo al momento de la colecta embrionaria (ng/ml).
- Tasa de recuperación (porcentaje de estructuras recuperadas - ovocitos no fertilizados y embriones - en relación a la cantidad de cuerpos lúteos) (%).
- Número de estructuras recuperadas (ovocitos no fertilizados y embriones).
- Tasa de fertilización (porcentaje de embriones en relación a la cantidad total de estructuras recuperadas) (%).
- Número de embriones recuperados.
- Tasa de viabilidad (porcentaje de embriones clasificados como viables con respecto a la colecta total) (%).
- Número de embriones viables o transferibles.

Se compararon los siguientes tratamientos:

- Diseño 1 (Experimento 1): Grupos A1 (176 unidades de FSHo en única inyección junto con 500 UI eCG), B1 (176 unidades de FSHo repartida en cuatro dosis iguales) y C1 (176 unidades de FSHo en única inyección en vehículo PVP).

- Diseño 2 (Experimento 1): Grupos B1 (176 unidades de FSHo repartida en cuatro dosis iguales) y D1 (132 unidades de FSHo repartida en cuatro dosis iguales y 500 UI eCG).
- Diseño 3 (Experimento 1): Grupos B1 (176 unidades de FSHo repartida en cuatro dosis iguales) y E1 (176 unidades de FSHo repartida en seis dosis iguales).
- Diseño 4 (Experimento 1): Grupos C1 (176 unidades de FSHo en única inyección en vehículo PVP) y F1 (132 unidades de FSHo en única inyección en vehículo PVP y 500 UI eCG).
- Diseño 5 (Experimento 2): Grupos A2 (176 unidades de FSHo en única inyección junto con 500 UI eCG), B2 (132 unidades de FSHo en única inyección junto con 500 UI eCG) y C2 (176 unidades de FSHo repartida en ocho dosis decrecientes).

Los datos correspondientes a las tasas de recuperación, de fertilización y de viabilidad fueron expresados como porcentajes calculados por grupo.

Los datos expresados como porcentajes (ovejas en celo, ovuladas, superovuladas, tasas de recuperación, de fertilización y de viabilidad) fueron analizados mediante test de Chi-cuadrado o Exacto de Fisher, según correspondiera. En caso de significación ( $P < 0,10$ ), se realizaron comparaciones múltiples empleando el criterio de Bonferroni.

Fueron analizadas por Análisis de Varianza las siguientes variables: intervalo al celo, al pico de LH, entre el celo y el pico de LH; concentración de LH al pico preovulatorio, de P4 al celo y a las laparotomías; número de cuerpos lúteos, de folículos persistentes, de estructuras recuperadas, de embriones y de embriones viables. Se trabajó con dos niveles de significación ( $P < 0,05$  y  $P < 0,10$ ) y en aquellos casos donde se detectaron diferencias estadísticas, se realizaron pruebas de comparaciones múltiples (Least Squares Means). Para el análisis de los datos, se contempló el efecto de los tratamientos hormonales, de los ensayos y sus interacciones.

Se analizó la relación entre el momento del inicio del celo y del pico preovulatorio de LH mediante correlación de Pearson, analizándose todos los datos en su conjunto. Los análisis de la relación entre el inicio del celo o el pico preovulatorio de LH y la respuesta ovárica fueron realizados mediante el test de correlación de Pearson. Para ello se analizaron conjuntamente los datos pertenecientes a los tratamientos superovulatorios que incluyeron eCG (grupos A1, E1, F1, A2 y B2) por un lado, y por otro lado aquellos correspondientes a los tratamientos que no incluyeron eCG (grupos B1, C1, D1 y C2).

Todos los análisis fueron realizados mediante el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System, 1999). En los análisis estadísticos se tuvieron en cuenta dos niveles de significación:  $P < 0,05$  y  $P < 0,10$ .

## V. RESULTADOS

### 5.1. EXPERIMENTO 1

En las Tablas 1a y 1b se exponen los resultados obtenidos en ovejas tratadas con 176 unidades de FSHo, administradas en única inyección junto con 500 UI de eCG (Grupo A1), repartidas en cuatro dosis iguales (Grupo B1) o en única inyección en vehículo PVP (Grupo C1).

Las variaciones de las concentraciones periovulatorias de LH (a partir del retiro de las esponjas sincronizadoras y durante un lapso de 72 h) para los grupos A1, B1 y C1, se presentan en la Figura 10.

Todas las ovejas exhibieron signos de celo y presentaron pico preovulatorio de LH en respuesta a los tratamientos (Tabla 1a). En una oveja perteneciente al Grupo C1, se detectó un patrón atípico de secreción de LH, pues el pico preovulatorio (21,8ng/ml), que apareció a las 36 h de la retirada de la esponja, fue seguido por un segundo pico de LH de menor magnitud (8,3 ng/ml) 12 h después (Figura 20a). En el momento de la recuperación de embriones, esta oveja presentó todos sus cuerpos lúteos regresados.

El inicio del celo y el pico de LH tuvieron lugar significativamente más temprano ( $P < 0,05$ ) en aquellas ovejas tratadas mediante el protocolo simplificado de FSHo y eCG en comparación con las estimuladas con FSHo repartida en cuatro dosis iguales o en única inyección en vehículo retardante (Tabla 1a y Figura 10).

Cabe destacar que en los análisis de varianza para estas dos últimas variables se registró interacción tratamiento x ensayo ( $P = 0,05$  y  $P = 0,02$ , respectivamente). De este modo, si bien el tratamiento que incluyó eCG (Grupo A1) presentó intervalos similares desde la retirada de las esponjas al celo y al pico de LH en los dos ensayos distintos (Ensayo 1:  $27,0 \pm 3,4$  h y  $28,0 \pm 2,0$  h; Ensayo 2:  $24,0 \pm 2,6$  h y  $27,6 \pm 2,4$  h), los mismos fueron diferentes entre los ensayos

para los grupos B1 (Ensayo 1:  $44,6 \pm 1,8$  h y  $49,7 \pm 1,7$  h; Ensayo 2:  $33,6 \pm 1,5$  h y  $42,0 \pm 3,5$  h) y C1 (Ensayo 1:  $50,0 \pm 5,0$  h y  $61,2 \pm 8,1$  h; Ensayo 2:  $32,6 \pm 1,8$  h y  $38,4 \pm 2,4$  h) (Tabla 1a). Estas diferencias en la presentación del pico de LH para los grupos B1 y C1 en los dos ensayos se muestran en la Figura 11.

El intervalo de tiempo transcurrido entre el momento de la detección del celo y el pico de LH tendió ( $P < 0,10$ ) a ser más corto en A1 que en C1. La concentración plasmática de P4 al momento de la detección del celo fue estadísticamente mayor ( $P < 0,05$ ) en el Grupo A1 que en los otros dos (B1 y C1) (Tabla 1a).

La observación de los ovarios en el momento de la recuperación embrionaria permitió registrar la presencia de al menos un cuerpo lúteo funcional en casi la totalidad de las ovejas tratadas (Tabla 1a). En este sentido, sólo una oveja perteneciente al Grupo C1 presentó todos sus cuerpos lúteos (en total 12) regresados. Esta apreciación se basó en la apariencia de las estructuras luteales (cuerpos lúteos avasculares, pálidos y con un diámetro inferior a 3 mm) y posteriormente se confirmó con la baja concentración de P4 en plasma en el momento de la colecta (en total  $0,21$  ng/ml). El porcentaje de recuperación de esta oveja fue bajo ( $41,7\%$ ), obteniéndose 3 embriones.

La incidencia de superovulación (presencia de al menos 3 cuerpos lúteos funcionales) difirió significativamente entre los dos protocolos más simplificados ( $100\%$  y  $58,3\%$  en A1 y C1, respectivamente;  $P < 0,05$ ) (Tabla 1a).

La tasa ovulatoria (número de cuerpos lúteos) resultó significativamente mayor ( $P < 0,05$ ) en A1 ( $13,8 \pm 1,9$ ) que en B1 ( $6,2 \pm 1,1$ ) o C1 ( $4,8 \pm 1,0$ ) (Tabla 1b). Para esta variable se detectó a su vez un efecto ensayo ( $P < 0,05$ ) aunque sin interacción tratamiento x ensayo (Grupo A1: Ensayo 1:  $9,8 \pm 2,7$  y Ensayo 2:  $17,3 \pm 2,1$ ; Grupo B1: Ensayo 1:  $4,4 \pm 1,1$  y Ensayo 2:  $8,8 \pm 1,6$ ; Grupo C1: Ensayo 1:  $2,8 \pm 1,0$  y Ensayo 2:  $6,7 \pm 1,5$ ). El número medio de folículos persistentes fue independiente de los tratamientos ( $P > 0,10$ ) (Tabla 1b).

La cantidad de progesterona expresada por cuerpo lúteo en el momento de la recuperación embrionaria no fue diferente entre los grupos experimentales, de



manera que la concentración total de dicha hormona fue más elevada para el tratamiento A1 debido a su mayor tasa ovulatoria ( $P < 0,05$ ) (Tabla 1b).

En la Tabla 1b se presentan los resultados de la producción de embriones. La tasa de recuperación (estructuras recuperadas en relación al número de cuerpos lúteos) fue independiente de los tratamientos. La estimulación mediante FSHo en una única inyección junto con eCG (A1) tendió ( $P = 0,06$ ) a producir más embriones ( $5,4 \pm 1,6$ ) que el protocolo de 4 dosis iguales de FSHo (Grupo B1:  $1,4 \pm 0,4$  embriones), resultando intermedia la cantidad de embriones logrados a partir del tratamiento mediante una única inyección de FSHo en PVP (Grupo C1:  $2,9 \pm 1,0$  embriones) (Tabla 1b). Sin embargo, este último grupo presentó una tasa de fertilización del 89,7%, significativamente ( $P < 0,05$ ) superior a los otros dos grupos (64,2% y 45,9% para A1 y B1, respectivamente). En forma similar, la tasa de viabilidad fue significativamente ( $P < 0,05$ ) mayor en el Grupo C1 (76,9% en comparación con 53,2% en A1 y 40,5% en B1). Finalmente, la eficacia general de estos tratamientos superovulatorios, expresada a través de la cantidad de embriones viables obtenidos, tendió ( $P = 0,08$ ) a depender del tratamiento. El protocolo simplificado evaluado en el Grupo A1 resultó ser el más eficiente ( $4,5 \pm 1,3$  embriones viables por oveja ovulada), especialmente en comparación con B1 ( $1,2 \pm 0,4$  embriones viables).

Los resultados logrados mediante la alternativa de prolongar el período de estimulación mediante la administración de FSHo repartida en 6 dosis iguales (Grupo D1) en lugar de 4 (Grupo B1), se muestran en las Tablas 2a y 2b y en la Figura 12.

Tal como se muestra en las Figuras 20b y 20c de presentación de los casos atípicos, en el Grupo D1 se detectaron fallos en dos ovejas. Una oveja (Figura 20b) no manifestó signos de celo y presentó un pico preovulatorio de LH de muy baja concentración (4,1 ng/ml) y muy retardado (a las 78 h siguientes al retiro de la esponja sincronizadora), aunque sin embargo suficiente para producir ovulación (1 cuerpo lúteo). Otra oveja (Figura 20c) del mismo grupo no ovuló, quedando en forma persistente su folículo, a pesar de manifestar celo y presentar pico de LH.

La estimulación mediante 6 dosis iguales de FSHo, si bien no logró aumentar la tasa ovulatoria, se tradujo en superiores ( $P<0,05$ ) tasas de recuperación (65,4% vs. 49,3%), de fertilización (82,3% vs. 45,9%) y de viabilidad (72,5% vs. 40,5%) respecto al protocolo de 4 aplicaciones, y por lo tanto en una mayor ( $P<0,05$ ) cantidad de embriones transferibles ( $3,1 \pm 0,7$  vs.  $1,2 \pm 0,4$ ) (Tabla 2b).

La opción de incluir eCG en los protocolos de FSHo administrada en 4 dosis iguales (Grupo E1) o en única inyección en PVP (Grupo F1), arrojó los resultados que se presentan en las Tablas 3a, 3b y 4a, 4b y en las Figuras 13 y 14, respectivamente.

La administración de eCG, ya sea en el protocolo de FSHo repartida en 4 dosis (Grupo E1, Tabla 3a y Figura 13) o en el de FSHo administrada en vehículo retardante (Grupo F1, Tabla 4a y Figura 14) acortó ( $P<0,05$ ) los intervalos desde el retiro de las esponjas al inicio de los celos y al pico de LH (B1:  $40,0 \pm 2,0$  y  $47,4 \pm 1,9$  h vs. E1:  $25,7 \pm 2,5$  y  $25,7 \pm 1,7$  h; C1:  $40,6 \pm 3,5$  y  $49,8 \pm 5,5$  h vs. F1:  $22,3 \pm 1,7$  y  $48,3 \pm 4,1$  h). Asimismo, la secreción de progesterona por cuerpo lúteo fue mayor en los tratamientos que combinaron FSHo y eCG (Tabla 3b; E1:  $2,8 \pm 0,2$  vs. B1:  $1,4 \pm 0,2$  ng/ml;  $P<0,05$  y Tabla 4b, F1:  $3,0 \pm 0,7$  vs. C1:  $1,7 \pm 0,2$  ng/ml;  $P<0,10$ ).

La inclusión de eCG al protocolo de 4 dosis iguales de FSHo (E1) condujo además a mayores ( $P<0,05$ ) tasas de fertilización (78,3% vs. 45,9%) y de viabilidad (73,9% vs. 40,5%). A pesar de duplicar la cantidad de embriones transferibles con respecto al Grupo B1 si eCG ( $2,8 \pm 1,7$  vs.  $1,2 \pm 0,4$ ), las diferencias no fueron significativas (Tabla 3b).

La administración de eCG en el momento de la inyección de FSHo en solución de PVP (F1) logró superar el bajo porcentaje de ovejas con respuesta superovulatoria (registro de al menos 3 cuerpos lúteos) del grupo C1 (100% vs. 58,3%; Tabla 4a) aumentando por consiguiente la tasa ovulatoria (F1:  $9,4 \pm 1,4$  y C1:  $4,8 \pm 1,0$  cuerpos lúteos; Tabla 4b). Sin embargo, su menor ( $P<0,05$ ) tasa de recuperación (F1: 53% vs. C1: 68,4%) contribuyó a que finalmente la producción de embriones considerados como viables, no aumentase (F1:  $3,0 \pm 0,9$  y C1:  $2,5 \pm 0,9$ ;  $P>0,10$ ) (Tabla 4b).

**Tabla 1a:** Experimento 1. Presentación del celo y niveles hormonales en ovejas Corriedale tratadas con 176 unidades NIH-FSH-S1 de FSHo, administradas en una única inyección junto con 500 UI eCG (Grupo A1), repartidas en cuatro dosis iguales (Grupo B1) o en única inyección en vehículo PVP (Grupo C1)

Grupo	FSHo+eCG (A1)	FSHo_4di (B1)	FSHo/PVP (C1)
Ovejas en celo (%)	13/13 (100)	12/12 (100)	13/13 (100)
Intervalo al celo (h) *	25,4 ± 2,0 <sup>B</sup>	40,0 ± 2,0 <sup>A</sup>	40,6 ± 3,5 <sup>A</sup>
- Ensayo 1	27,0 ± 3,4 <sup>bA</sup>	44,6 ± 1,8 <sup>aA</sup>	50,0 ± 5,0 <sup>aA</sup>
- Ensayo 2	24,0 ± 2,6 <sup>bA</sup>	33,6 ± 1,5 <sup>aB</sup>	32,6 ± 1,8 <sup>aB</sup>
Intervalo al pico de LH (h) *	27,8 ± 1,5 <sup>B</sup>	47,4 ± 1,9 <sup>A</sup>	49,8 ± 5,5 <sup>A</sup>
- Ensayo 1	28,0 ± 2,0 <sup>bA</sup>	49,7 ± 1,7 <sup>aA</sup>	61,2 ± 8,1 <sup>aA</sup>
- Ensayo 2	27,6 ± 2,4 <sup>bA</sup>	42,0 ± 3,5 <sup>aB</sup>	38,4 ± 2,4 <sup>aB</sup>
Intervalo celo–pico LH (h) *	2,7 ± 1,2 <sup>b</sup>	6,6 ± 1,1 <sup>ab</sup>	7,8 ± 2,4 <sup>a</sup>
Pico de LH (ng/ml) *	14,4 ± 0,9	15,3 ± 1,1	13,9 ± 1,5
P4 al celo (ng/ml) *	0,26 ± 0,04 <sup>A</sup>	0,12 ± 0,02 <sup>B</sup>	0,12 ± 0,03 <sup>B</sup>
Ovejas ovuladas (%) <sup>1</sup>	13/13 (100)	12/12 (100)	12/13 (92,3)
Ovejas superovuladas (%) <sup>2</sup>	13/13 (100) <sup>A</sup>	10/12 (83,3) <sup>AB</sup>	7/12 (58,3) <sup>B</sup>

\* Los valores representan el promedio ± SEM.

<sup>1</sup> Ovejas con al menos un cuerpo lúteo funcional.

<sup>2</sup> Ovejas con al menos tres cuerpos lúteos funcionales.

Superíndices diferentes dentro de una misma fila indican diferencias significativas: P<0,10 (letras minúsculas) o P<0,05 (letras mayúsculas).

Letras diferentes dentro de una misma fila (letras minúsculas) o dentro de una misma columna (letras mayúsculas) indican diferencias significativas (P<0,05).

**Tabla 1b:** Experimento 1. Respuesta ovárica y producción de embriones en ovejas Corriedale tratadas con 176 unidades NIH-FSH-S1 de FSHo, administradas en una única inyección junto con 500 UI eCG (Grupo A1), repartidas en cuatro dosis iguales (Grupo B1) o en única inyección en vehículo PVP (Grupo C1)

Grupo	FSHo+eCG (A1)	FSHo_4di (B1)	FSHo/PVP (C1)
Tasa ovulatoria *	13,8 ± 1,9 <sup>A</sup>	6,2 ± 1,1 <sup>B</sup>	4,8 ± 1,0 <sup>B</sup>
- Ensayo 1	9,8 ± 2,7 aB	4,4 ± 1,1 bB	2,8 ± 1,0 bB
- Ensayo 2	17,3 ± 2,1 aA	8,8 ± 1,6 bA	6,7 ± 1,5 bA
Folículos persistentes *	0,9 ± 0,3	1,2 ± 0,4	1,0 ± 0,3
P4 a la cirugía (ng/ml) <sup>*,3</sup>	17,7 ± 3,6 <sup>A</sup>	8,1 ± 2,0 <sup>B</sup>	7,6 ± 1,6 <sup>B</sup>
P4/cuerpo lúteo a la cirugía (ng/ml) <sup>*,3</sup>	1,5 ± 0,2	1,4 ± 0,2	1,7 ± 0,2
Tasa de recuperación (%) <sup>3</sup>	109/180 (60,6)	37/75 (49,3)	39/57 (68,4)
Estructuras recuperadas <sup>*,3</sup>	8,4 ± 1,4 <sup>A</sup>	3,1 ± 1,1 <sup>B</sup>	3,2 ± 1,1 <sup>B</sup>
- Ensayo 1	5,8 ± 2,5 aB	1,1 ± 0,5 bB	1,5 ± 1,0 bB
- Ensayo 2	10,6 ± 1,1 aA	5,8 ± 2,2 bA	5,0 ± 1,9 bA
Tasa de fertilización (%) <sup>3</sup>	70/109 (64,2) <sup>B</sup>	17/37 (45,9) <sup>B</sup>	35/39 (89,7) <sup>A</sup>
Embriones <sup>*,3</sup>	5,4 ± 1,6 <sup>a</sup>	1,4 ± 0,4 <sup>b</sup>	2,9 ± 1,0 <sup>ab</sup>
Tasa de viabilidad (%) <sup>3,4</sup>	58/109 (53,2) <sup>B</sup>	15/37 (40,5) <sup>B</sup>	30/39 (76,9) <sup>A</sup>
Embriones viables <sup>*,3</sup>	4,5 ± 1,3 <sup>a</sup>	1,2 ± 0,4 <sup>b</sup>	2,5 ± 0,9 <sup>ab</sup>

\* Los valores representan el promedio ± SEM.

<sup>3</sup> Corresponden a ovejas que manifestaron celo y presentaron al menos un cuerpo lúteo funcional al momento de la recuperación embrionaria.

<sup>4</sup> Calculados a partir de todas las estructuras recuperadas (ovocitos y embriones).

Superíndices diferentes dentro de una misma fila indican diferencias significativas: P<0,10 (letras minúsculas) o P<0,05 (letras mayúsculas). Letras diferentes dentro de una misma fila (letras minúsculas) o dentro de una misma columna (letras mayúsculas) indican diferencias significativas (P<0,05).

**Tabla 2a:** Experimento 1. Presentación del celo y niveles hormonales en ovejas Corriedale tratadas con 176 unidades NIH-FSH-S1 de FSHo repartidas en cuatro (Grupo B1) o seis (Grupo D1) dosis iguales

Grupo	FSHo_4di (B1)	FSHo_6di (D1)
Ovejas en celo (%)	12/12 (100)	13/14 (92,8)
Intervalo al celo (h) *	40,0 ± 2,0	36,9 ± 2,4
Intervalo al pico de LH (h) *	47,4 ± 1,9	42,0 ± 3,3
Intervalo celo–pico LH (h) *	6,6 ± 1,1	3,6 ± 1,8
Pico de LH (ng/ml) *	15,3 ± 1,1	15,8 ± 1,0
P4 al celo (ng/ml) *	0,12 ± 0,02	0,11 ± 0,02
Ovejas ovuladas (%) <sup>1</sup>	12/12 (100)	12/13 (92,3)
Ovejas superovuladas (%) <sup>2</sup>	10/12 (83,3)	9/12 (75,0)

\* Los valores representan el promedio ± SEM.

<sup>1</sup> Ovejas con al menos un cuerpo lúteo funcional.

<sup>2</sup> Ovejas con al menos tres cuerpos lúteos funcionales.

**Tabla 2b:** Experimento 1. Respuesta ovárica y producción de embriones en ovejas Corriedale tratadas con 176 unidades NIH-FSH-S1 de FSHo repartidas en cuatro (Grupo B1) o seis (Grupo D1) dosis iguales

Grupo	FSHo_4di (B1)	FSHo_6di (D1)
Tasa ovulatoria *	6,2 ± 1,1	6,5 ± 0,9
Folículos persistentes *	1,2 ± 0,4	1,5 ± 0,5
P4 a la cirugía (ng/ml) <sup>*,3</sup>	8,1 ± 2,0	10,4 ± 2,1
P4/cuerpo lúteo a la cirugía (ng/ml) <sup>*,3</sup>	1,4 ± 0,2	1,7 ± 0,2
Tasa de recuperación (%) <sup>3</sup>	37/75 (49,3) <sup>B</sup>	51/78 (65,4) <sup>A</sup>
Estructuras recuperadas <sup>*,3</sup>	3,1 ± 1,1	4,2 ± 0,9
Tasa de fertilización (%) <sup>3</sup>	17/37 (45,9) <sup>B</sup>	42/51 (82,3) <sup>A</sup>
Embriones <sup>*,3</sup>	1,4 ± 0,4 <sup>B</sup>	3,5 ± 0,8 <sup>A</sup>
Tasa de viabilidad (%) <sup>3,4</sup>	15/37 (40,5) <sup>B</sup>	37/51 (72,5) <sup>A</sup>
Embriones viables <sup>*,3</sup>	1,2 ± 0,4 <sup>B</sup>	3,1 ± 0,7 <sup>A</sup>

\* Los valores representan el promedio ± SEM.

<sup>3</sup> Corresponden a ovejas que manifestaron celo y presentaron al menos un cuerpo lúteo funcional al momento de la recuperación embrionaria.

<sup>4</sup> Calculados a partir de todas las estructuras recuperadas (ovocitos y embriones).

Superíndices diferentes dentro de una misma fila indican diferencias significativas: P<0,05 (letras mayúsculas).

**Tabla 3a:** Experimento 1. Presentación del celo y niveles hormonales en ovejas Corriedale tratadas con 176 unidades NIH-FSH-S1 de FSHo, administradas en cuatro dosis iguales (Grupo B1) o con 132 unidades, administradas en cuatro dosis iguales y 500 UI eCG (Grupo E1)

Grupo	FSHo_4di (B1)	FSHo3/4_4di+eCG (E1)
Ovejas en celo (%)	12/12 (100)	7/7 (100)
Intervalo al celo (h) *	40,0 ± 2,0 <sup>A</sup>	25,7 ± 2,5 <sup>B</sup>
Intervalo al pico de LH (h) *	47,4 ± 1,9 <sup>A</sup>	25,7 ± 1,7 <sup>B</sup>
Intervalo celo–pico LH (h) *	6,6 ± 1,1 <sup>A</sup>	0,0 ± 1,8 <sup>B</sup>
Pico de LH (ng/ml) *	15,3 ± 1,1	17,4 ± 1,4
P4 al celo (ng/ml) *	0,12 ± 0,02	0,14 ± 0,02
Ovejas ovuladas (%) <sup>1</sup>	12/12 (100)	7/7 (100)
Ovejas superovuladas (%) <sup>2</sup>	10/12 (83,3)	7/7 (100)

\* Los valores representan el promedio ± SEM.

<sup>1</sup> Ovejas con al menos un cuerpo lúteo funcional.

<sup>2</sup> Ovejas con al menos tres cuerpos lúteos funcionales.

Superíndices diferentes dentro de una misma fila indican diferencias significativas: P<0,05 (letras mayúsculas).

**Tabla 3b:** Experimento 1. Respuesta ovárica y producción de embriones en ovejas Corriedale tratadas con 176 unidades NIH-FSH-S1 de FSHo, administradas en cuatro dosis iguales (Grupo B1) o con 132 unidades, administradas en cuatro dosis iguales y 500 UI eCG (Grupo E1)

Grupo	FSHo_4di (B1)	FSHo3/4_4di+eCG (E1)
Tasa ovulatoria *	6,2 ± 1,1	7,1 ± 1,2
Folículos persistentes *	1,2 ± 0,4	1,1 ± 0,4
P4 a la cirugía (ng/ml) <sup>*,3</sup>	8,1 ± 2,0 <sup>B</sup>	18,9 ± 3,3 <sup>A</sup>
P4/cuerpo lúteo a la cirugía (ng/ml) <sup>*,3</sup>	1,4 ± 0,2 <sup>B</sup>	2,8 ± 0,2 <sup>A</sup>
Tasa de recuperación (%) <sup>3</sup>	37/75 (49,3)	23/38 (60,5)
Estructuras recuperadas <sup>*,3</sup>	3,1 ± 1,1	3,8 ± 1,6
Tasa de fertilización (%) <sup>3</sup>	17/37 (45,9) <sup>B</sup>	18/23 (78,3) <sup>A</sup>
Embriones <sup>*,3</sup>	1,4 ± 0,4	3,0 ± 1,7
Tasa de viabilidad (%) <sup>3,4</sup>	15/37 (40,5) <sup>B</sup>	17/23 (73,9) <sup>A</sup>
Embriones viables <sup>*,3</sup>	1,2 ± 0,4	2,8 ± 1,7

\* Los valores representan el promedio ± SEM.

<sup>3</sup> Corresponden a ovejas que manifestaron celo y presentaron al menos un cuerpo lúteo funcional al momento de la recuperación embrionaria.

<sup>4</sup> Calculados a partir de todas las estructuras recuperadas (ovocitos y embriones).

Superíndices diferentes dentro de una misma fila indican diferencias significativas: P<0,05 (letras mayúsculas).



**Tabla 4a:** Experimento 1. Presentación del celo y niveles hormonales en ovejas Corriedale tratadas con 176 unidades NIH-FSH-S1 de FSHo en única inyección en vehículo PVP (Grupo C1) o con 132 unidades en única inyección en vehículo PVP y 500 UI eCG (Grupo F1)

Grupo	FSHo/PVP (C1)	FSHo3/4/PVP+eCG (F1)
Ovejas en celo (%)	13/13 (100)	7/7 (100)
Intervalo al celo (h) *	40,6 ± 3,5 <sup>A</sup>	22,3 ± 1,7 <sup>B</sup>
Intervalo al pico de LH (h) *	49,8 ± 5,5 <sup>A</sup>	28,3 ± 4,1 <sup>B</sup>
Intervalo celo–pico LH (h) *	7,8 ± 2,4	6,0 ± 2,6
Pico de LH (ng/ml) *	13,9 ± 1,5	14,6 ± 2,4
P4 al celo (ng/ml) *	0,12 ± 0,03	0,11 ± 0,01
Ovejas ovuladas (%) <sup>1</sup>	12/13 (92,3)	7/7 (100)
Ovejas superovuladas (%) <sup>2</sup>	7/12 (58,3) <sup>B</sup>	7/7 (100) <sup>A</sup>

\* Los valores representan el promedio ± SEM.

<sup>1</sup> Ovejas con al menos un cuerpo lúteo funcional.

<sup>2</sup> Ovejas con al menos tres cuerpos lúteos funcionales.

Superíndices diferentes dentro de una misma fila indican diferencias significativas:  $P < 0,05$  (letras mayúsculas).

**Tabla 4b:** Experimento 1. Respuesta ovárica y producción de embriones en ovejas Corriedale tratadas con 176 unidades NIH-FSH-S1 de FSHo en única inyección en vehículo PVP (Grupo C1) o con 132 unidades en única inyección en vehículo PVP y 500 UI eCG (Grupo F1)

Grupo	FSHo/PVP (C1)	FSHo3/4/PVP+eCG (F1)
Tasa ovulatoria *	4,8 ± 1,0 <sup>B</sup>	9,4 ± 1,4 <sup>A</sup>
Folículos persistentes *	1,0 ± 0,3 <sup>b</sup>	2,7 ± 1,1 <sup>a</sup>
P4 a la cirugía (ng/ml) <sup>*,3</sup>	7,6 ± 1,6 <sup>B</sup>	22,9 ± 3,6 <sup>A</sup>
P4/cuerpo lúteo a la cirugía (ng/ml) <sup>*,3</sup>	1,7 ± 0,2 <sup>b</sup>	3,0 ± 0,7 <sup>a</sup>
Tasa de recuperación (%) <sup>3</sup>	39/57 (68,4) <sup>A</sup>	35/66 (53,0) <sup>B</sup>
Estructuras recuperadas <sup>*,3</sup>	3,2 ± 1,1	5,0 ± 1,3
Tasa de fertilización (%) <sup>3</sup>	35/39 (89,7)	29/35 (82,8)
Embriones <sup>*,3</sup>	2,9 ± 1,0	4,1 ± 1,4
Tasa de viabilidad (%) <sup>3,4</sup>	30/39 (76,9)	21/35 (60,0)
Embriones viables <sup>*,3</sup>	2,5 ± 0,9	3,0 ± 0,9

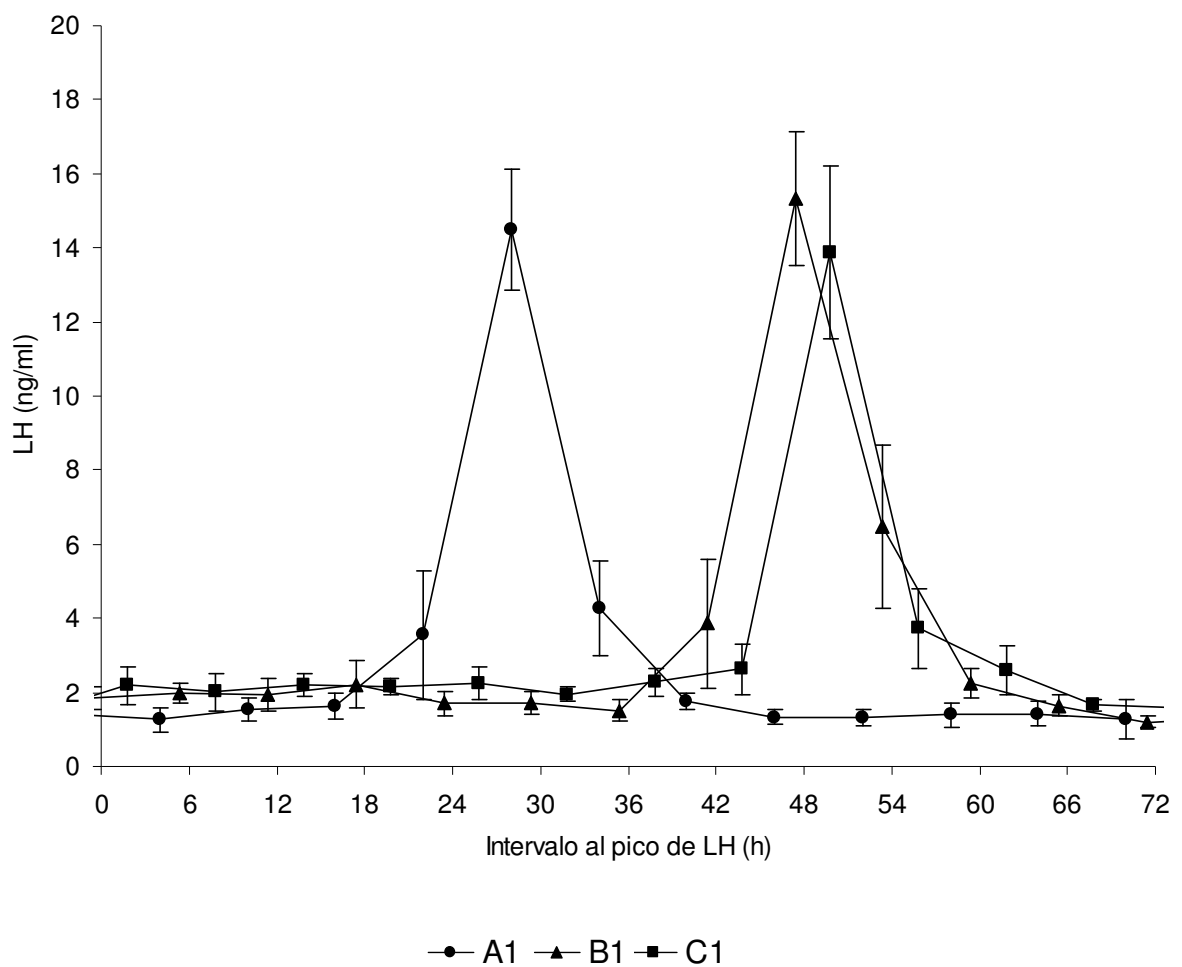
\* Los valores representan el promedio ± SEM.

<sup>3</sup> Corresponden a ovejas que manifestaron celo y presentaron al menos un cuerpo lúteo funcional al momento de la recuperación embrionaria.

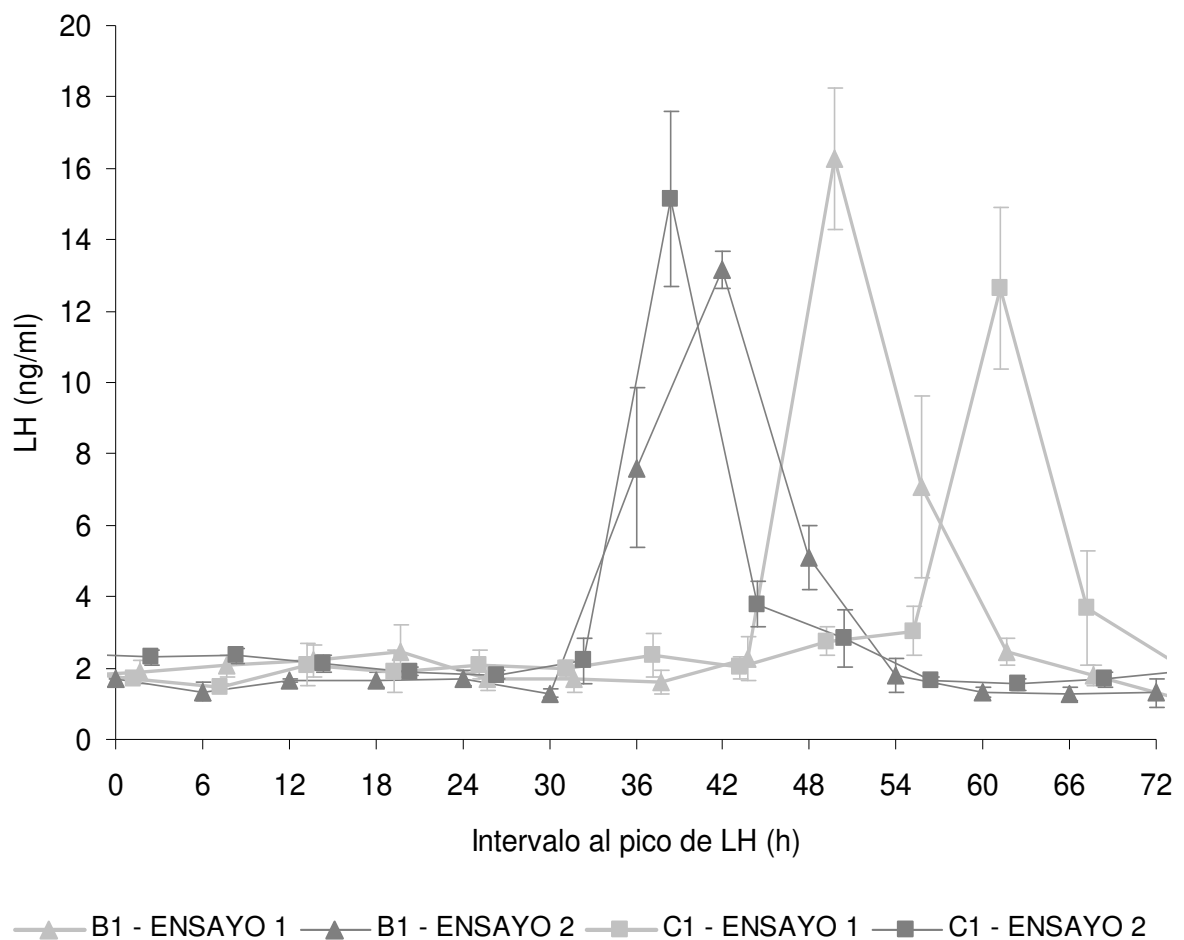
<sup>4</sup> Calculados a partir de todas las estructuras recuperadas (ovocitos y embriones).

Superíndices diferentes dentro de una misma fila indican diferencias significativas: P<0,10 (letras minúsculas) o P<0,05 (letras mayúsculas).

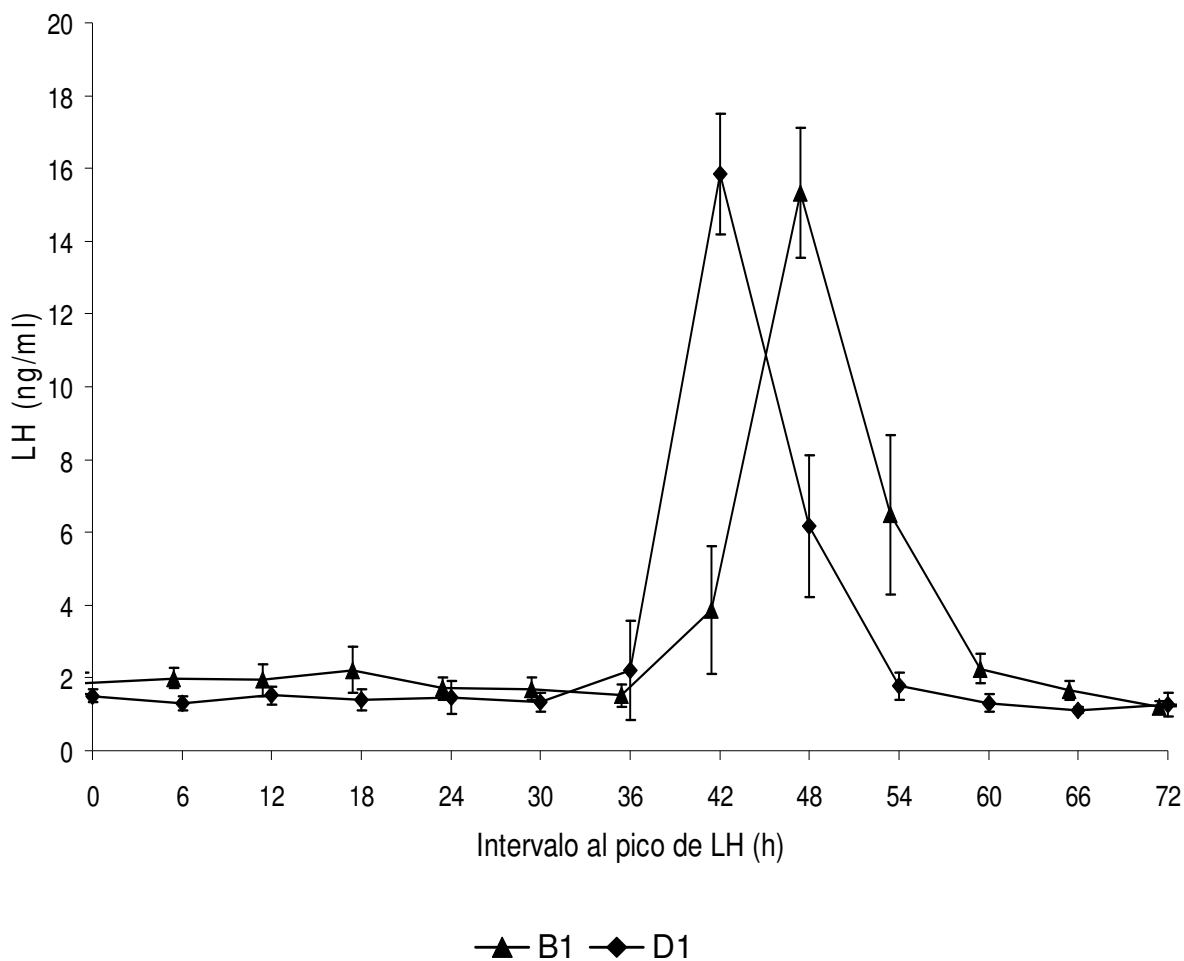
**Figura 10:** Concentraciones plasmáticas periovulatorias de LH (ng/ml) en ovejas Corriedale tratadas con 176 unidades NIH-FSH-S1 de FSHo, administradas en una única inyección junto con 500 UI eCG (Grupo A1; n=11), repartidas en cuatro dosis iguales (Grupo B1; n=10) o en única inyección en vehículo PVP (Grupo C1; n=10). Se presenta el promedio  $\pm$  DS para los datos normalizados alrededor del pico de LH. Cada pico normalizado fue posicionado en el intervalo promedio transcurrido entre el retiro de las esponjas y el pico de LH.



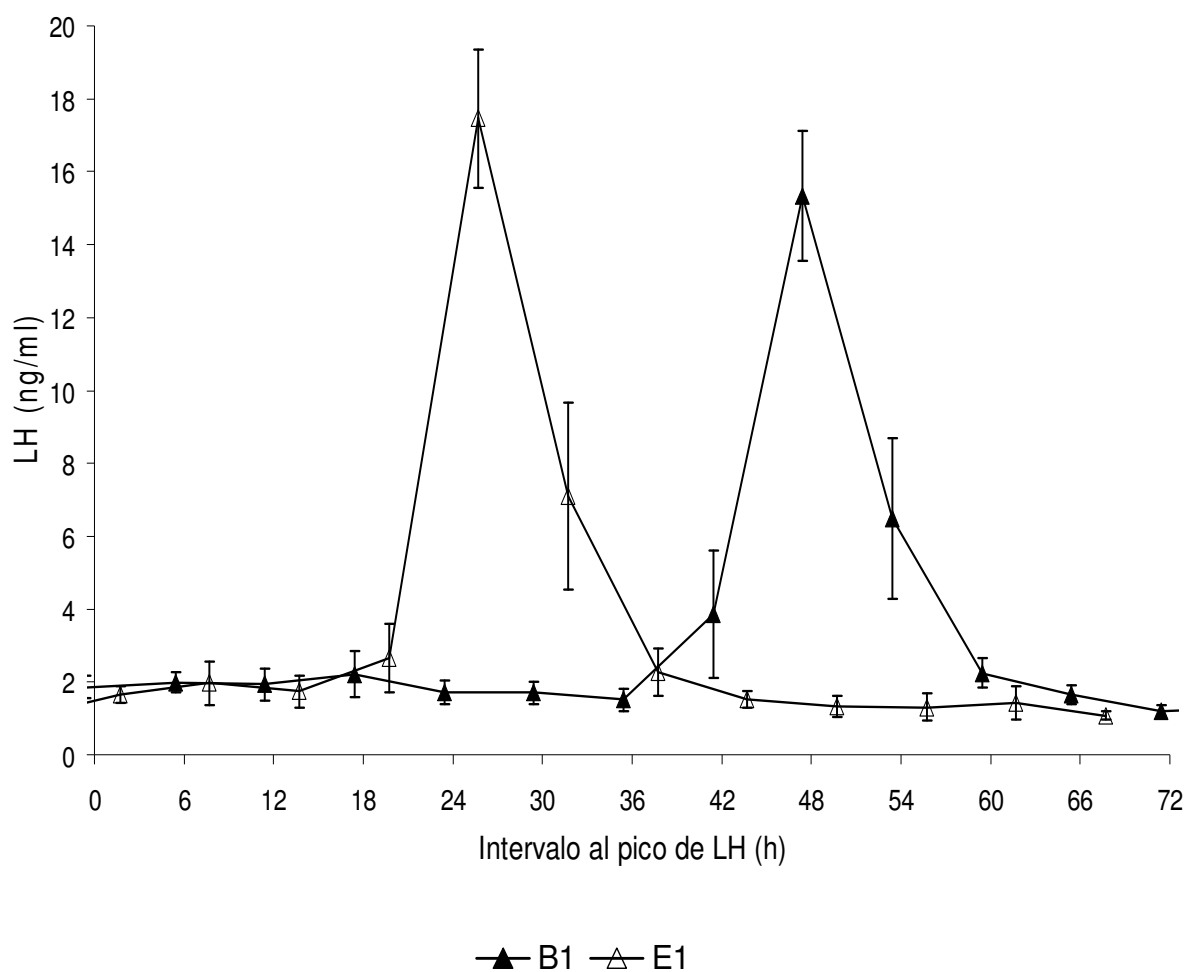
**Figura 11:** Concentraciones plasmáticas periovulatorias de LH (ng/ml) en ovejas Corriedale tratadas con 176 unidades NIH-FSH-S1 de FSHo repartidas en cuatro dosis iguales (Grupo B1; n=10) o en única inyección en vehículo PVP (Grupo C1; n=10). Se grafican las curvas para los dos ensayos en los que se emplearon estos protocolos. Se presenta el promedio  $\pm$  DS para los datos normalizados alrededor del pico de LH. Cada pico normalizado fue posicionado en el intervalo promedio transcurrido entre el retiro de las esponjas y el pico de LH.



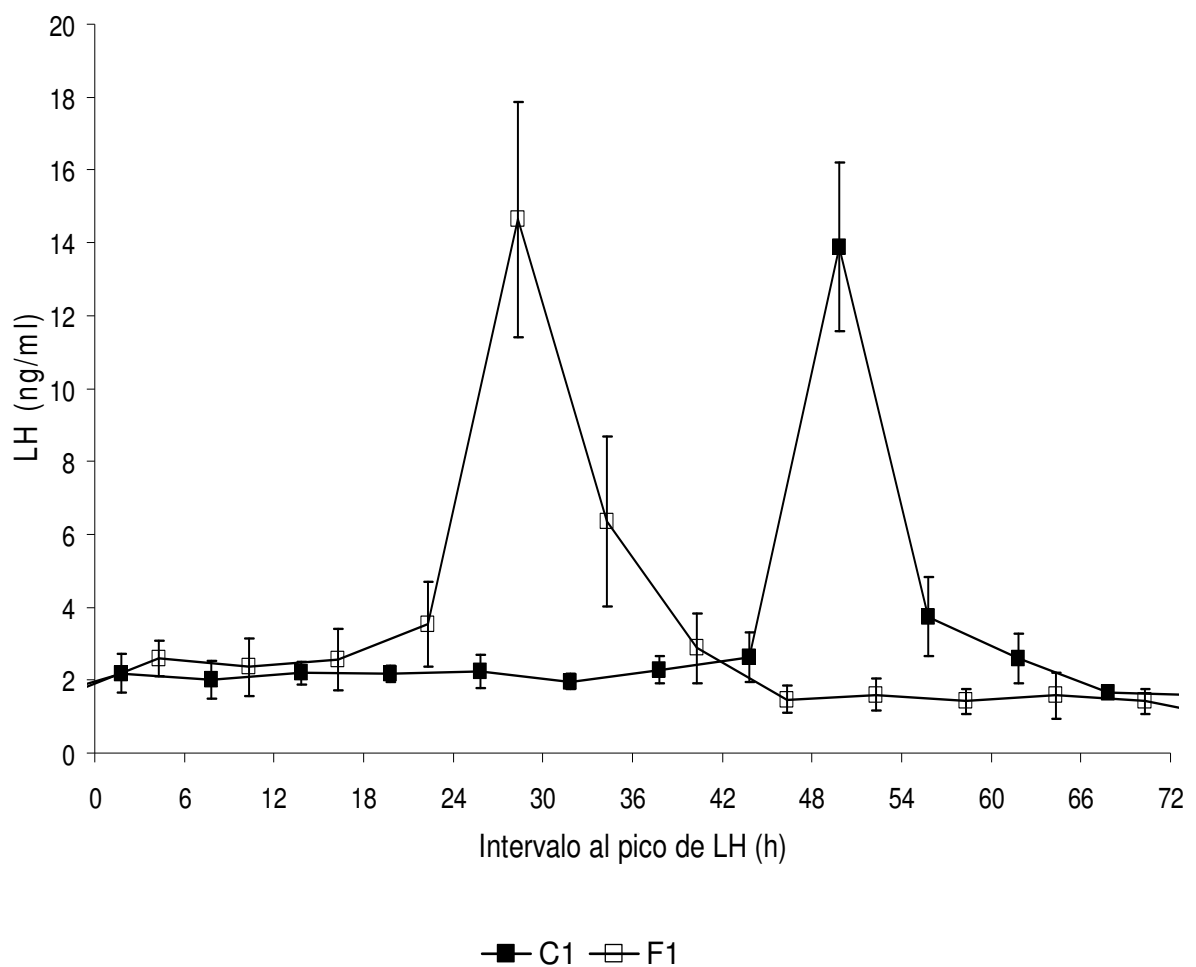
**Figura 12:** Concentraciones plasmáticas periovulatorias de LH (ng/ml) en ovejas Corriedale tratadas con 176 unidades NIH-FSH-S1 de FSHo repartidas en cuatro (Grupo B1; n=10) o seis dosis iguales (Grupo D1; n=10). Se presenta el promedio  $\pm$  DS para los datos normalizados alrededor del pico de LH. Cada pico normalizado fue posicionado en el intervalo promedio transcurrido entre el retiro de las esponjas y el pico de LH.



**Figura 13:** Concentraciones plasmáticas periovulatorias de LH (ng/ml) en ovejas Corriedale tratadas con 176 unidades NIH-FSH-S1 de FSHo administradas en cuatro dosis iguales (Grupo B1; n=10) o con 132 unidades administradas en cuatro dosis iguales y 500 UI eCG (Grupo E1; n=7). Se presenta el promedio  $\pm$  DS para los datos normalizados alrededor del pico de LH. Cada pico normalizado fue posicionado en el intervalo promedio transcurrido entre el retiro de las esponjas y el pico de LH.



**Figura 14:** Concentraciones plasmáticas periovulatorias de LH (ng/ml) en ovejas Corriedale tratadas con 176 unidades NIH-FSH-S1 de FSHo en única inyección en vehículo PVP (Grupo C1; n=10) o con 132 unidades en única inyección en vehículo PVP y 500 UI eCG (Grupo F1; n=7). Se presenta el promedio  $\pm$  DS para los datos normalizados alrededor del pico de LH. Cada pico normalizado fue posicionado en el intervalo promedio transcurrido entre el retiro de las esponjas y el pico de LH.



## 5.2. EXPERIMENTO 2

En las Tablas 5a y 5b se presentan los resultados logrados en ovejas tratadas con 176 (Grupo A2) o 132 (Grupo B2) unidades de FSHo, administradas en única inyección junto con 500 UI de eCG o con 176 unidades repartidas en ocho dosis de concentraciones decrecientes (Grupo C2).

Las fluctuaciones de las concentraciones periovulatorias de LH (durante un lapso de 72 h a partir de finalizar el tratamiento de sincronización) para los grupos A2, B2 y C2, se presentan en la Figura 15.

El protocolo convencional (Grupo C2) retrasó significativamente ( $P < 0,05$ ) el inicio de los celos ( $30,4 \pm 1,7$  h) y el pico de LH ( $33,3 \pm 2,5$  h) en comparación con los regímenes simplificados basados en la combinación de FSHo y eCG (A2:  $22,0 \pm 1,4$  y  $24,6 \pm 2,4$  h; B2:  $20,1 \pm 1,0$  y  $19,0 \pm 1,8$  h) (Tabla 5a y Figura 15).

Sólo una oveja, perteneciente al Grupo A2, presentó un celo silente, caracterizado por la ausencia de signos externos de celo (en la práctica, esta oveja no resultó marcada por los machos) pero con presencia de ovulación, como así lo demuestran su patrón de secreción de LH (con pico preovulatorio que aconteció tempranamente, a las 12 h de finalizado el tratamiento de sincronización de los celos) y el recuento de 11 cuerpos lúteos (Figura 20d).

Todas las ovejas ovularon y establecieron una función luteal eficaz a excepción de una oveja del Grupo B2, que presentó todos sus cuerpos lúteos regresados, fenómeno evidenciado por su morfología (6 cuerpos lúteos pequeños, pálidos y sin vascularización) y su funcionalidad (concentración total de P4 en el momento de la recuperación embrionaria de sólo 0,64 ng/ml) (Figura 20e). En esta oveja se detectó un pico de LH temprano (a las 18 h posteriores al retiro de la esponja) incluso unas 6 h antes que manifestara su celo. No se recuperó ninguna estructura (ovocitos ni embriones) tras proceder al lavado de sus cuernos uterinos.



Los tres protocolos dieron lugar a una alta incidencia de respuesta superovulatoria (casi 100%; Tabla 5a). Las tasas ovulatorias (cantidad de estructuras luteales) fueron elevadas, sin registrarse diferencias entre los tratamientos (Tabla 5b). El protocolo convencional evidenció una menor cantidad de folículos persistentes ( $0,3 \pm 0,2$ ), siendo significativa ( $P < 0,10$ ) su diferencia con el Grupo A2 ( $1,3 \pm 0,5$ ) (Tabla 5b).

La concentración plasmática de progesterona por cuerpo lúteo fue significativamente inferior ( $P < 0,05$ ) en el tratamiento convencional de FSHo en 8 dosis decrecientes en comparación con los otros dos tratamientos (Tabla 5b). Sin embargo, cabe aclarar que la concentración media de esta hormona para el Grupo C2 fue similar a las mostradas en el Experimento 1 por los grupos que no incluyeron eCG (B1, C1 y D1) y por el mismo grupo que se repitió en el Experimento 2 (A1).

La tasa de recuperación fue significativamente ( $P < 0,05$ ) mayor en el tratamiento de dosis múltiples (Grupo C2: 72,5%) que en los protocolos simplificados que combinaron FSHo y eCG (A2: 57,3% y B2: 56,7%). Sin embargo, la cantidad de estructuras recuperadas fue similar entre los tres regímenes superovulatorios (Tabla 5b). Las tasas de fertilización difirieron estadísticamente ( $P < 0,05$ ) entre los tres tratamientos (A2: 54,2%; B2: 81,6% y C2: 93,9%), y las ovejas estimuladas mediante el protocolo convencional de dosis múltiples tendieron ( $P = 0,07$ ) a producir más embriones fertilizados ( $7,3 \pm 1,0$ ) que aquellas pertenecientes a los otros grupos ( $4,3 \pm 1,1$  y  $4,8 \pm 0,8$  embriones para A2 y B2) (Tabla 5b). La tasa de viabilidad estuvo influenciada ( $P < 0,05$ ) por el tratamiento, siendo menor ( $P < 0,05$ ) en las ovejas sometidas al protocolo simplificado que utilizó la dosis alta de FSHo (42,4%) en comparación con aquellas de los grupos B2 (68,4%) y C2 (71,2%) (Tabla 5b). Finalmente, la eficiencia determinada a partir del cómputo de embriones viables, fue independiente de los tratamientos superovulatorios ( $3,3 \pm 1,0$ ;  $4,0 \pm 0,8$  y  $5,5 \pm 0,8$  embriones viables para los grupos A2, B2 y C2, respectivamente; (Tabla 5b).

Se registró una correlación positiva significativa entre el inicio del celo y el pico de LH ( $<0,0001$ ;  $P=0,91$ ). Los análisis de las relaciones entre el inicio de los celos o el pico de LH y la respuesta ovárica para los grupos que no incluyeron eCG en sus protocolos de estimulación hormonal (grupos B1, C1, D1 y C2), demostraron que la presentación del celo y del pico de LH tuvieron lugar más tempranamente en aquellas ovejas que presentaron una mayor cantidad de cuerpos lúteos (Figuras 17 y 19, respectivamente;  $P<0,05$ ). Sin embargo, no existió correlación entre estas variables para los grupos que combinaron la administración de FSHo con eCG (grupos A1, E1, F1, A2 y B2) (Figuras 16 y 18, respectivamente).

**Tabla 5a:** Experimento 2. Presentación del celo y niveles hormonales en ovejas Corriedale tratadas con 176 (Grupo A2) o 132 (Grupo B2) unidades NIH-FSH-S1 de FSHo y 500 UI eCG en única inyección, o con 176 unidades en ocho dosis decrecientes (Grupo C2)

Grupo	FSHo+eCG (A2)	FSHo3/4+eCG (B2)	FSHo_8dd (C2)
Ovejas en celo (%)	15/16 (93,8)	14/14 (100)	17/17 (100)
Intervalo al celo (h) *	22,0 ± 1,4 <sup>B</sup>	20,1 ± 1,0 <sup>B</sup>	30,4 ± 1,7 <sup>A</sup>
Intervalo al pico de LH (h) *	24,6 ± 2,4 <sup>B</sup>	19,0 ± 1,8 <sup>B</sup>	33,3 ± 2,5 <sup>A</sup>
Intervalo celo–pico LH (h) *	5,3 ± 1,2	3,0 ± 1,3	2,7 ± 1,0
Pico de LH (ng/ml) *	13,8 ± 0,9	16,1 ± 0,9	14,6 ± 1,0
P4 al celo (ng/ml) *	0,36 ± 0,06	0,29 ± 0,07	0,22 ± 0,04
Ovejas ovuladas (%) <sup>1</sup>	15/15 (100)	13/14 (92,8)	17/17 (100)
Ovejas superovuladas (%) <sup>2</sup>	15/15 (100)	13/13 (100)	16/17 (94,1)

\* Los valores representan el promedio ± SEM.

<sup>1</sup> Ovejas con al menos un cuerpo lúteo funcional.

<sup>2</sup> Ovejas con al menos tres cuerpos lúteos funcionales.

Superíndices diferentes dentro de una misma fila indican diferencias significativas:  $P < 0,05$  (letras mayúsculas).

**Tabla 5b:** Experimento 2. Respuesta ovárica y producción de embriones en ovejas Corriedale tratadas con 176 (Grupo A2) o 132 (Grupo B2) unidades NIH-FSH-S1 de FSHo y 500 UI eCG en única inyección, o con 176 unidades en ocho dosis decrecientes (Grupo C2)

Grupo	FSHo+eCG (A2)	FSHo3/4+eCG (B2)	FSHo_8dd (C2)
Tasa ovulatoria *	13,7 ± 1,7	10,3 ± 1,3	10,7 ± 0,9
Folículos persistentes *	1,3 ± 0,5 <sup>a</sup>	1,0 ± 0,3 <sup>ab</sup>	0,3 ± 0,2 <sup>b</sup>
P4 a la cirugía (ng/ml) <sup>*,3</sup>	31,6 ± 8,7 <sup>A</sup>	27,0 ± 2,6 <sup>A</sup>	16,4 ± 1,8 <sup>B</sup>
P4/cuerpo lúteo a la cirugía (ng/ml) <sup>*,3</sup>	2,3 ± 0,4 <sup>A</sup>	2,8 ± 0,3 <sup>A</sup>	1,5 ± 0,1 <sup>B</sup>
Tasa de recuperación (%) <sup>3</sup>	118/206 (57,3) <sup>B</sup>	76/134 (56,7) <sup>B</sup>	132/182 (72,5) <sup>A</sup>
Estructuras recuperadas <sup>*,3</sup>	7,9 ± 1,2	5,8 ± 0,7	7,8 ± 0,8
Tasa de fertilización (%) <sup>3</sup>	64/118 (54,2) <sup>C</sup>	62/76 (81,6) <sup>B</sup>	124/132 (93,9) <sup>A</sup>
Embriones <sup>*,3</sup>	4,3 ± 1,1 <sup>b</sup>	4,8 ± 0,8 <sup>b</sup>	7,3 ± 1,0 <sup>a</sup>
Tasa de viabilidad (%) <sup>3,4</sup>	50/118 (42,4) <sup>B</sup>	52/76 (68,4) <sup>A</sup>	94/132 (71,2) <sup>A</sup>
Embriones viables <sup>*,3</sup>	3,3 ± 1,0	4,0 ± 0,8	5,5 ± 0,8

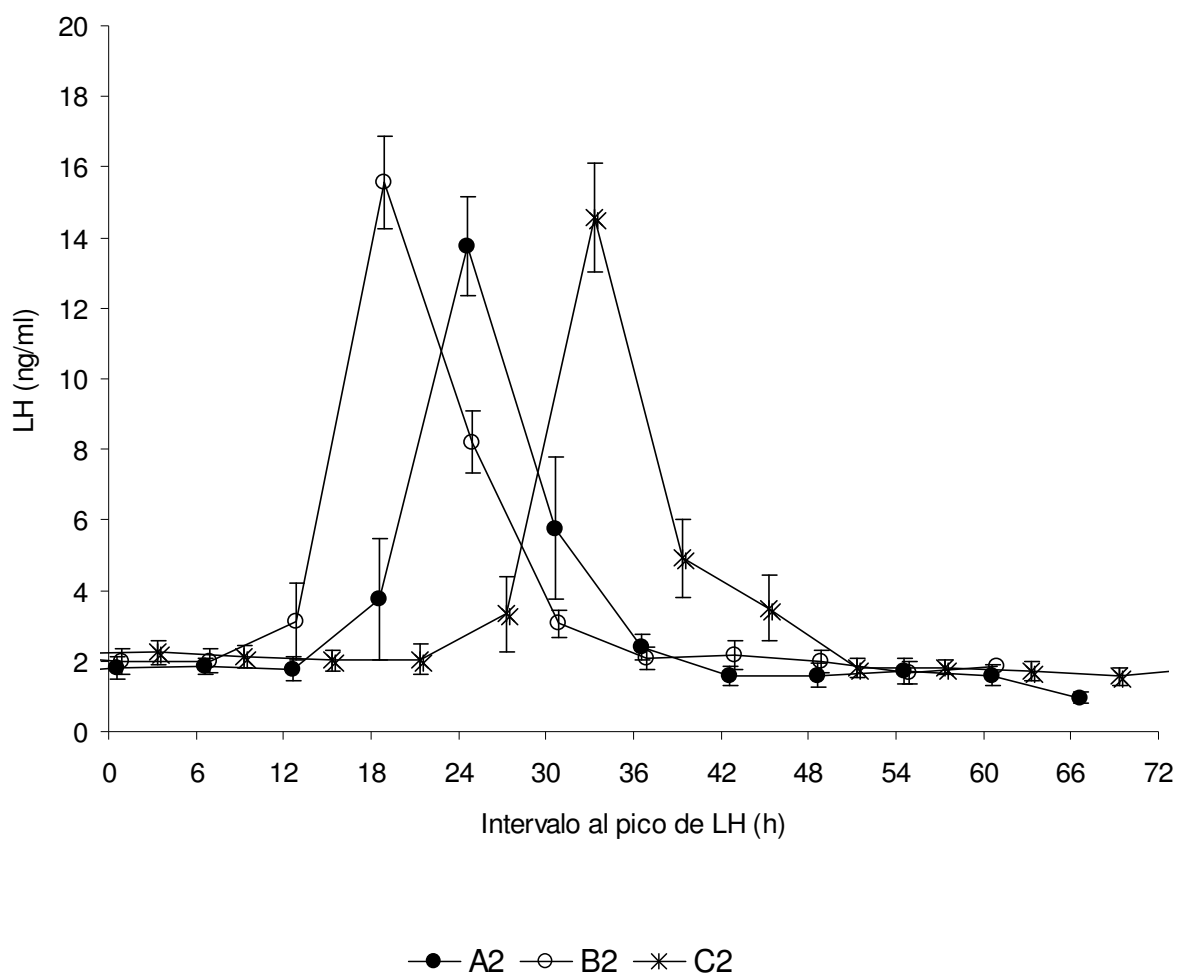
\* Los valores representan el promedio ± SEM.

<sup>3</sup> Corresponden a ovejas que manifestaron celo y presentaron al menos un cuerpo lúteo funcional al momento de la recuperación embrionaria.

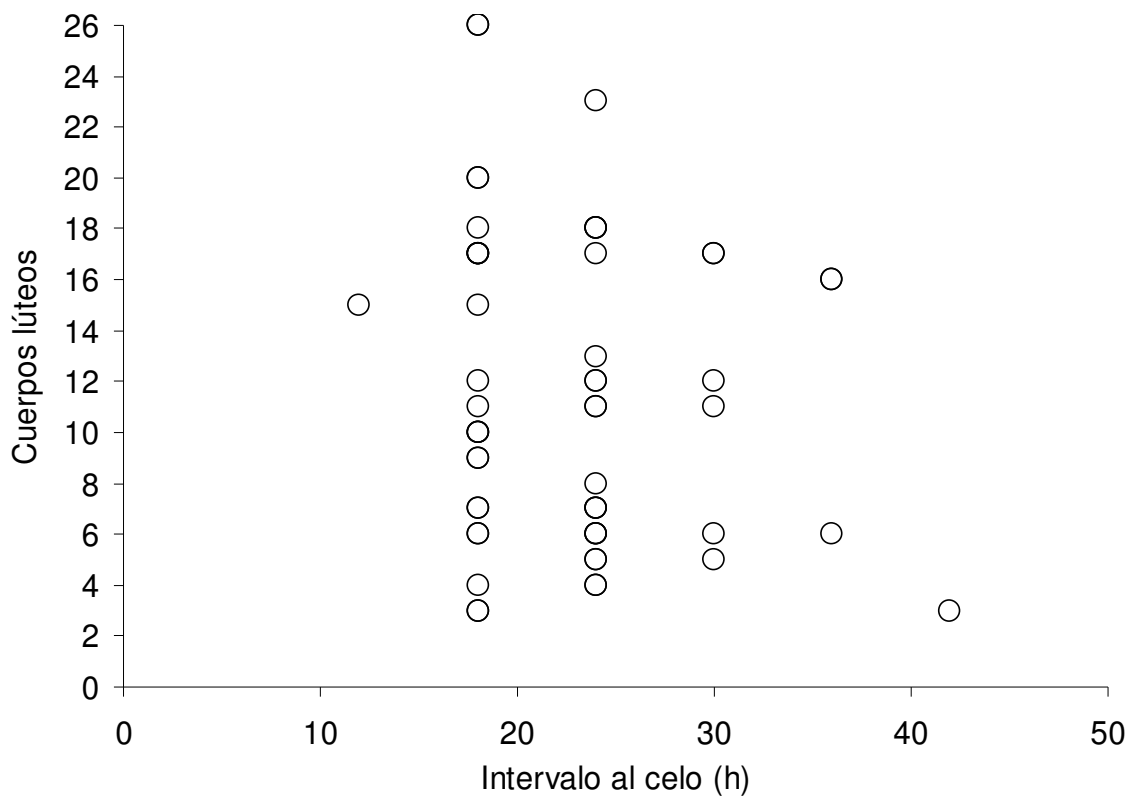
<sup>4</sup> Calculados a partir de todas las estructuras recuperadas (ovocitos y embriones).

Superíndices diferentes dentro de una misma fila indican diferencias significativas: P<0,10 (letras minúsculas) o P<0,05 (letras mayúsculas).

**Figura 15:** Concentraciones plasmáticas periovulatorias de LH (ng/ml) en ovejas Corriedale tratadas con 176 (Grupo A2; n=10) o 132 (Grupo B2; n=6) unidades NIH-FSH-S1 de FSHo y 500 UI eCG en única inyección, o con 176 unidades en ocho dosis decrecientes (Grupo C2; n=9). Se presenta el promedio  $\pm$  DS para los datos normalizados alrededor del pico de LH. Cada pico normalizado fue posicionado en el intervalo promedio transcurrido entre el retiro de las esponjas y el pico de LH.

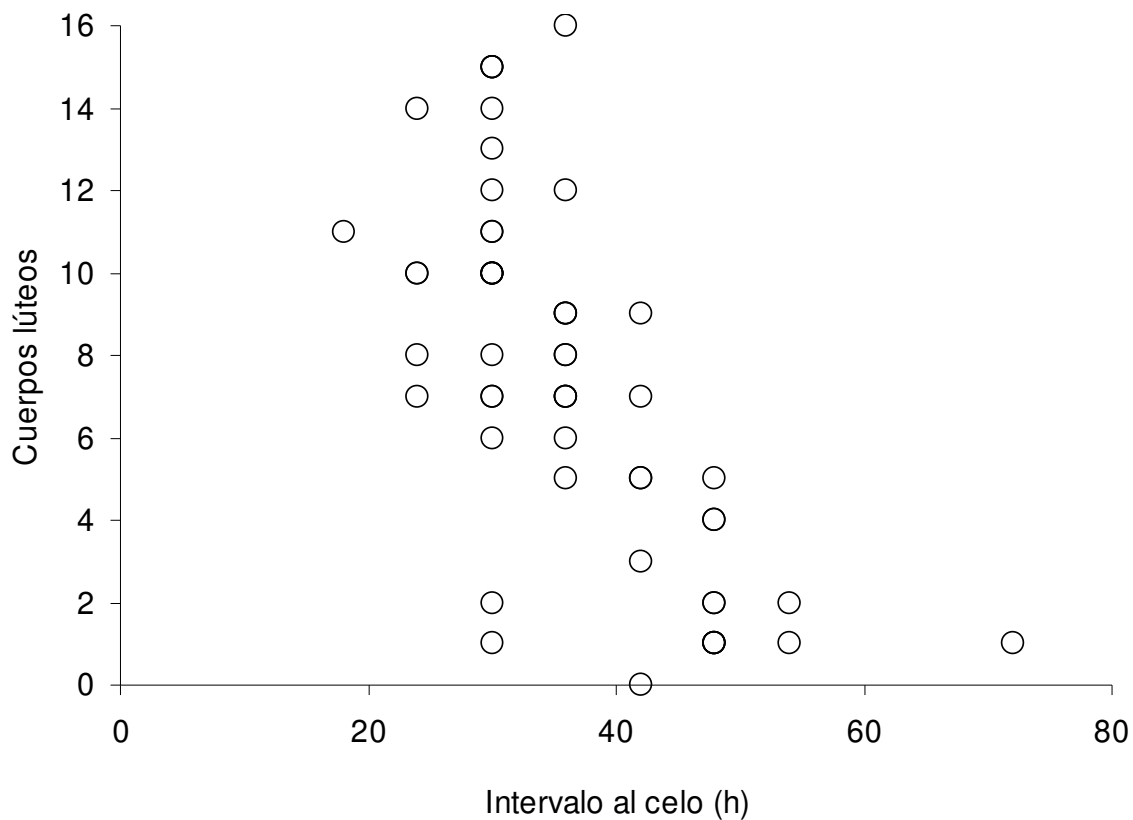


**Figura 16:** Relación entre el intervalo al celo y la tasa ovulatoria en ovejas Corriedale estimuladas mediante tratamientos hormonales que incluyen eCG (Grupos A1, E1, F1, A2 y B2).



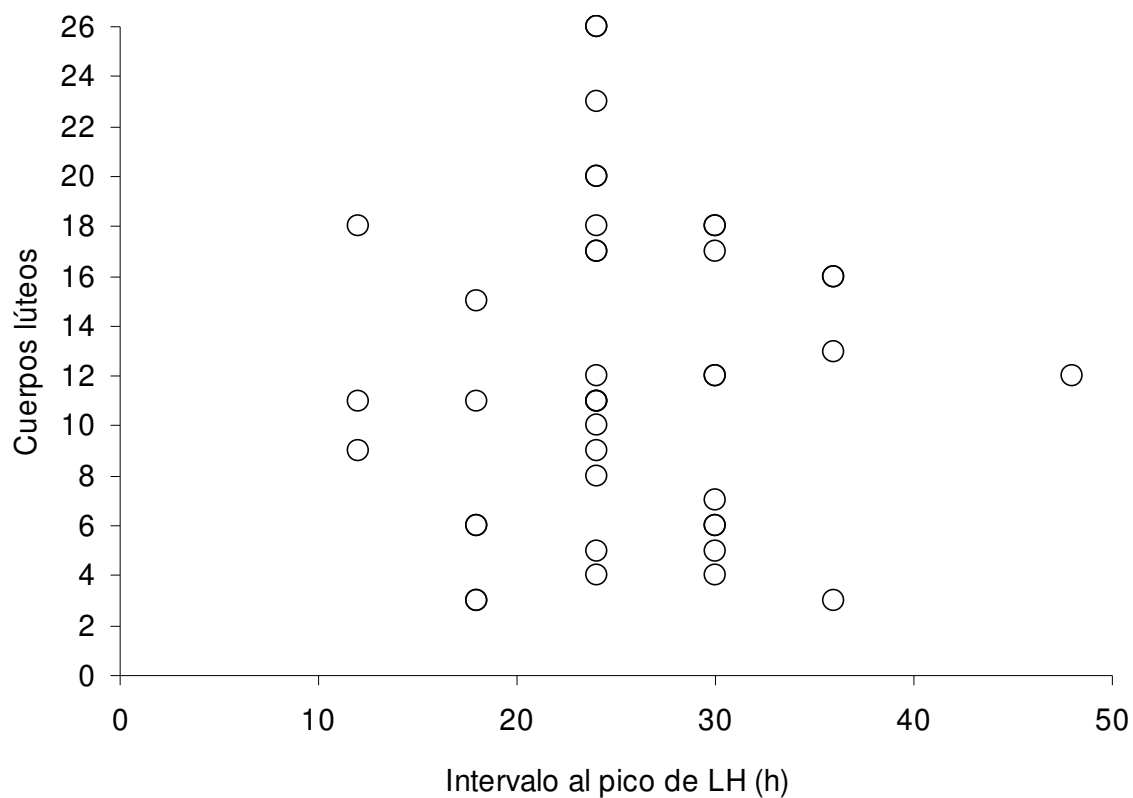
Coeficiente de correlación (Pearson): - 0,15640 (P=0,2497)

**Figura 17:** Relación entre el intervalo al celo y la tasa ovulatoria en ovejas Corriedale estimuladas mediante tratamientos hormonales que no incluyen eCG (Grupos B1, C1, D1 y C2).



Coeficiente de correlación (Pearson): - 0,67792 (P<0,0001)

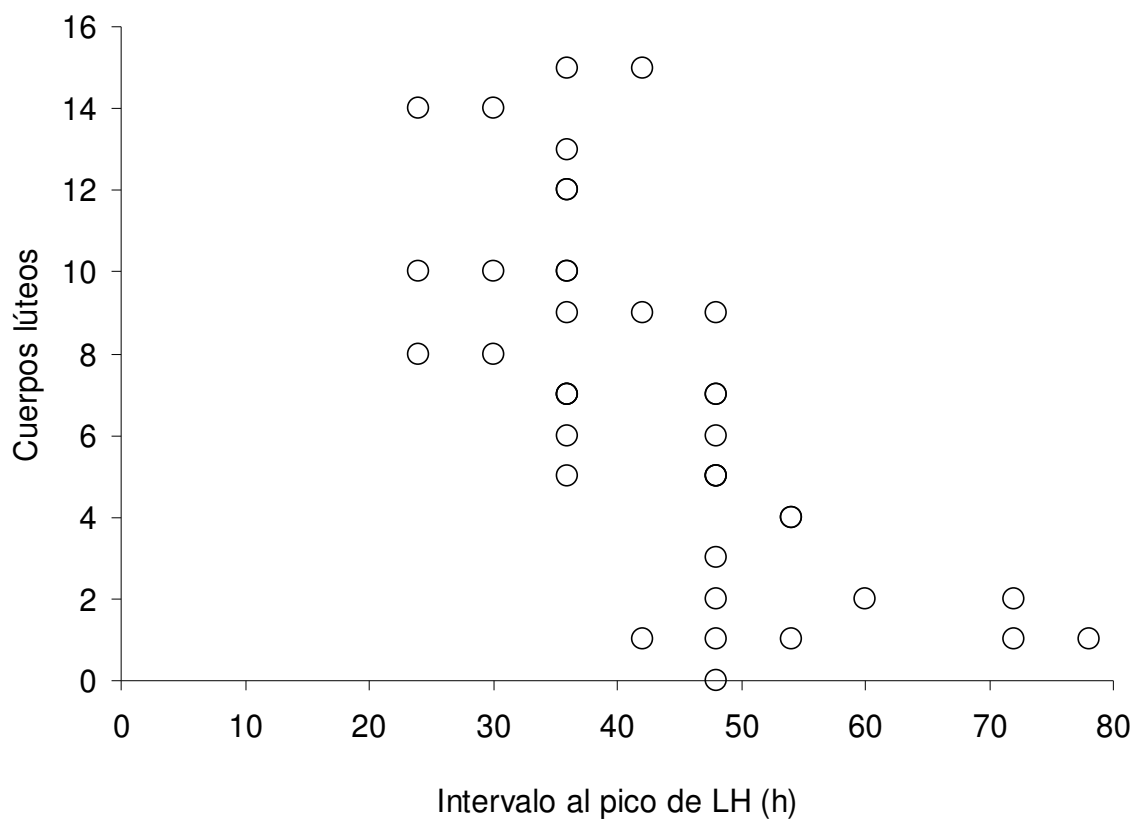
**Figura 18:** Relación entre el intervalo al pico de LH y la tasa ovulatoria en ovejas Corriedale estimuladas mediante tratamientos hormonales que incluyen eCG (Grupos A1, E1, F1, A2 y B2).



Coeficiente de correlación (Pearson): 0,02739 (P=0,8650)

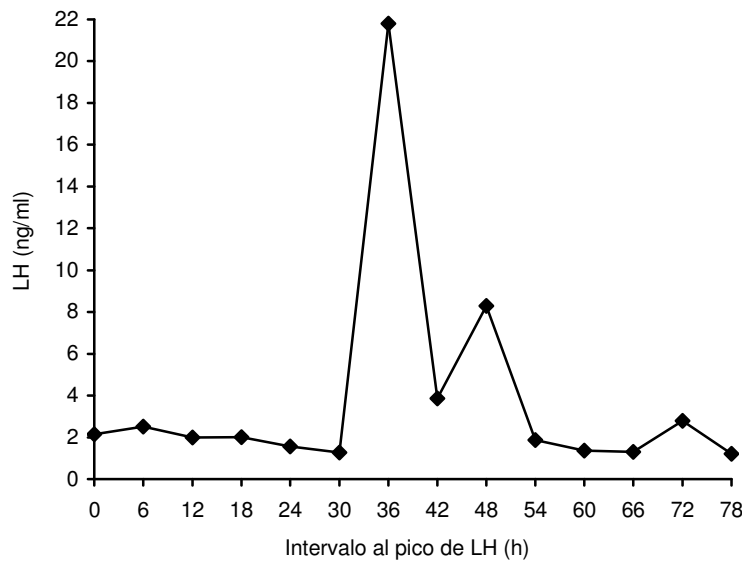


**Figura 19:** Relación entre el intervalo al pico de LH y la tasa ovulatoria en ovejas Corriedale estimuladas mediante tratamientos hormonales que no incluyen eCG (Grupos B1, C1, D1 y C2).



Coefficiente de correlación (Pearson): - 0,69259 (P<0,0001)

**Figuras 20a, 20b, 20c, 20d, 20e:** Presentación de los casos atípicos.



Intervalo al celo: 30 h

Pico de LH: 36 h

Segundo pico de LH: 48h

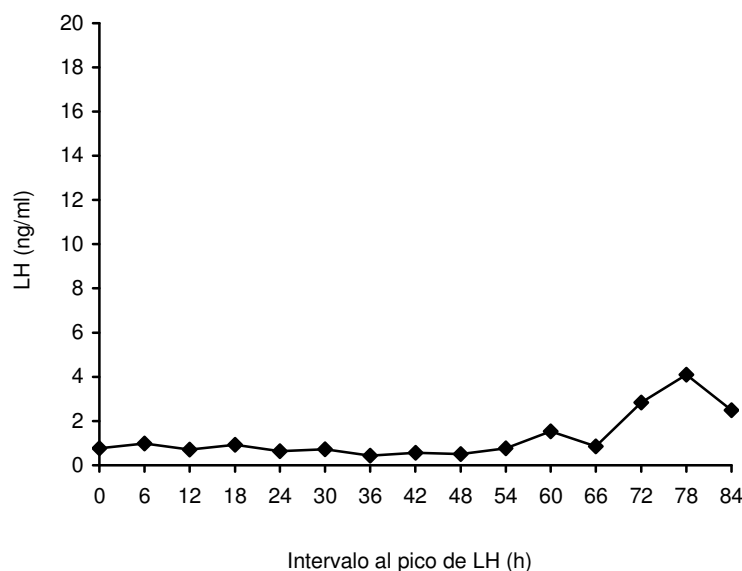
P4 al celo: < 0,100 ng/ml

Cuerpos lúteos: 12, todos regresados

Folículos persistentes: 0

P4 al día 6: 0,206 ng/ml

**Figura 20a:** Caso de una oveja perteneciente al Grupo C1.



Sin signos de celo

Pico de LH: 78 h (de muy baja concentración)

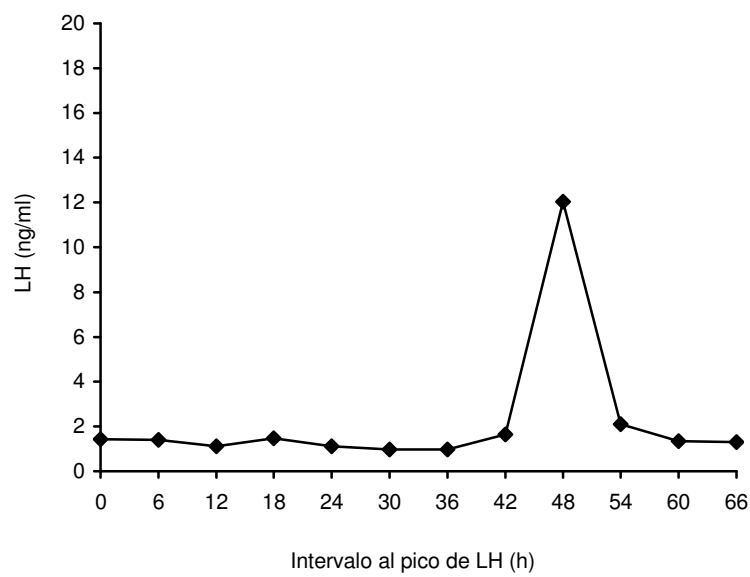
P4 al retiro de las esponjas: < 0,100 ng/ml

Cuerpos lúteos: 1

Folículos persistentes: 0

P4 al día 6: 1,170 ng/ml

**Figura 20b:** Caso de una oveja perteneciente al Grupo D1.



Intervalo al celo: 42 h

Pico de LH: 48 h

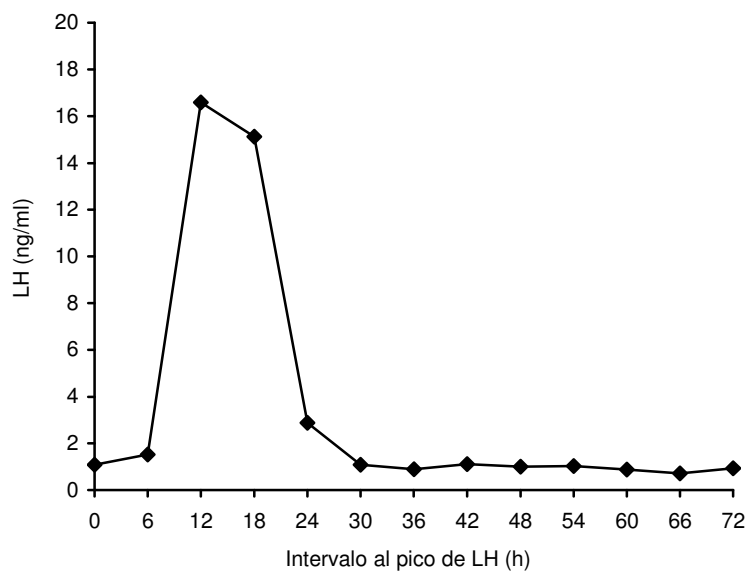
P4 al celo: < 0,100 ng/ml

Cuerpos lúteos: 0

Folículos persistentes: 1

P4 al día 6: 0,350 ng/ml

**Figura 20c:** Caso de una oveja perteneciente al Grupo D1.



Sin signos de celo

Pico de LH: 12 h

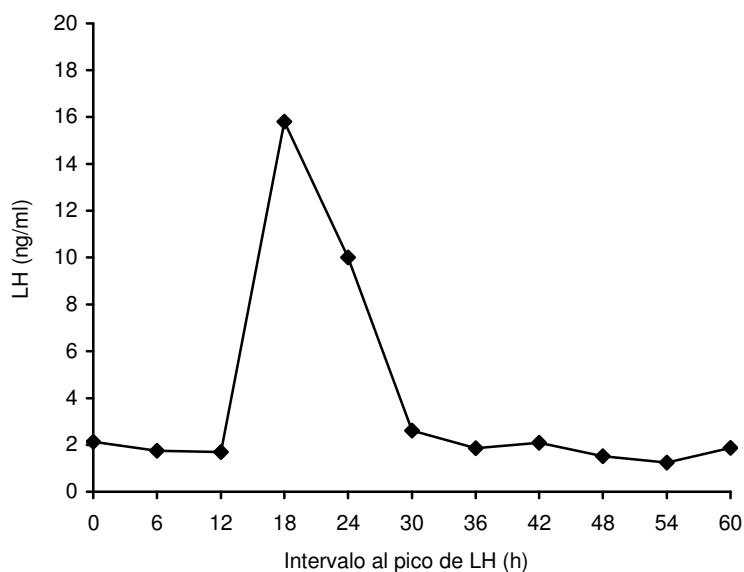
P4 al retiro de las esponjas: no medido

Cuerpos lúteos: 11

Folículos persistentes: 2

P4 al día 6: 39,249 ng/ml

**Figura 20d:** Caso de una oveja perteneciente al Grupo A2.



Intervalo al celo: 24 h

Pico de LH: 18 h

P4 al celo: 0,190 ng/ml

Cuerpos lúteos: 6, todos regresados

Folículos persistentes: 1

P4 al día 6: 0,640 ng/ml

**Figura 20e:** Caso de una oveja perteneciente al Grupo B2.

## VI. DISCUSIÓN

### 6.1. PRESENTACIÓN DEL CELO Y PICO DE LH

El estudio de la presentación de los celos y del pico de LH en ovejas inducidas a la superovulación resulta de utilidad para brindar información que permita planificar adecuadamente el período de cubriciones o incluso el momento más adecuado para IA en su caso. Ante la carencia de información al respecto para protocolos de superovulación en hembras de raza Corriedale, se adoptó en este estudio la monta natural controlada, recurriendo a la detección previa de los celos y a las montas repetidas para asegurar la fertilización. A partir de la información generada, en ensayos futuros se podría utilizar la IA intrauterina por laparoscopia, que debe ser practicada en el momento apropiado para lograr resultados satisfactorios.

Los resultados obtenidos en los experimentos demuestran claramente que la adición de eCG a los protocolos de estimulación mediante FSHo produce la anticipación del inicio de los celos y del pico preovulatorio de LH. De igual forma, Naqvi y Gulyani (1999) mostraron el adelantamiento en la presentación de los celos en ovejas sometidas al citado tratamiento combinado. Sin embargo, otros autores no observaron variaciones en los intervalos al celo (Jabbour y Evans, 1991a; Dattena y col., 1994; Leoni y col., 2001) y al pico de LH (Jabbour y Evans, 1991a) entre ovejas superovuladas mediante FSH sólo o combinada con eCG. Estas diferencias observadas en el agrupamiento de los celos y de los picos de LH en el presente estudio sugieren la necesidad de realizar una programación diferencial de las cubriciones (ya sean naturales o por IA) de acuerdo al tipo de protocolo de superovulación empleado. De este modo, las ovejas Corriedale cuya estimulación hormonal no incluya la administración de eCG deberían ser inseminadas más tardíamente que aquellas en cuya estimulación se incluya eCG. Asimismo, estas diferencias entre los protocolos que incluyen o no eCG deberían ser tenidas en cuenta para la programación de la sincronización entre las

donantes y las receptoras cuando la finalidad sea proceder a la transferencia directa (es decir en fresco) de los embriones recuperados. Si bien la diferencia en el tiempo de sincronización del celo entre donantes y receptoras puede ser de hasta 1 día (Rowson y Moor, 1966), la eficiencia de la transferencia embrionaria aumenta en la medida que existe una mayor sincronización. En este sentido, diversos informes indican que la mayor supervivencia embrionaria se logra cuando se transfieren embriones a receptoras que presentan celo no más de 12 h antes o después que la donante (Moore y Shelton, 1964; Aké López y col., 2003).

La presentación del celo y del pico de LH fue menos variable en los tratamientos que incluyeron eCG independientemente de sus respectivas tasas ovulatorias. Por el contrario, en los protocolos que no incluyeron eCG, la mayor variación observada en la presentación del celo y del pico de LH pareció asociarse a las distintas tasas ovulatorias registradas no sólo en los diferentes tratamientos de estimulación, sino además entre los distintos ensayos llevados a cabo para un mismo tratamiento. La relación entre la aparición temprana del celo o del pico de LH y la mayor respuesta ovárica observada en los protocolos que no incluyeron eCG, ha sido ya mostrada con anterioridad (D'Alessandro y col., 1996; Gonzalez-Bulnes y col., 2002b) y estaría relacionada con el cambio de la retroacción negativa a positiva entre el estradiol y la LH ante el incremento en la secreción de estradiol a partir del mayor número de folículos grandes antrales durante la fase folicular (Baird, 1983). Contrariamente, el estudio reciente de Veiga-Lopez y col. (2006a) no encontró relación alguna entre el intervalo al celo o al pico de LH y la tasa ovulatoria en ovejas de raza Manchega estimuladas mediante FSHo repartida en 8 dosis decrecientes. Entre todos los tratamientos, la estimulación con FSHo en vehículo retardante (Grupo C1) registró la mayor variación en la aparición del pico de LH, con una diferencia de hasta 42 h entre ovejas. Cognie y col., (2003) señalaron que la diferencia en la presentación del pico de LH entre hembras sometidas a un mismo protocolo pueden ser de hasta 40 h. Esta dispersión en el pico de LH hallada principalmente en el Grupo C1, sumado al hecho de que el intervalo entre la primera y la última ovulación en una misma oveja puede ascender a 6-12 h (Cognie y col., 2003), podría limitar la

implementación de la inseminación artificial a tiempo fijo en un programa de MOET.

En el presente estudio y a pesar de que el tiempo transcurrido entre el inicio de los celos y el pico de LH pudo haber diferido entre algunos grupos, la presentación de los celos fue bien seguida por el pico de LH en todos los tratamientos con excepción del Grupo E1 (FSHo repartida en 4 dosis más eCG), donde el intervalo promedio al celo coincidió con el lapso promedio transcurrido al pico de LH. Promediando entre los tratamientos, el intervalo celo-LH, de aproximadamente 5 h, fue similar al reportado por Jabbour y Evans (1991a), pero inferior al de otras publicaciones, que refieren intervalos de tiempo mayores (Jabbour y col., 1991; McEvoy y col., 1996; Gonzalez-Bulnes y col., 2002b). En concordancia con un estudio reciente (Veiga-Lopez y col., 2006a), aquellas ovejas que manifestaron celo más tempranamente, tuvieron antes el pico de LH.

## **6.2. FUNCIONALIDAD LUTEAL**

La superovulación requiere la administración de gonadotrofinas en forma semejante al patrón de secreción de la FSH endógena y por un lapso de tiempo suficiente para estimular el desarrollo folicular extra. Ya se ha señalado previamente que diversos estudios han mostrado que una cierta proporción de las ovejas inducidas a la superovulación desarrolla una fase luteal inadecuada, con la producción de progesterona únicamente durante unos pocos días (Schiewe y col., 1990; Rubianes y col., 1996; Villanueva y col., 2000; Forcada y col., 2006). La incidencia de esta alteración podría ser mayor cuando se emplean protocolos de estimulación muy simplificados. En este sentido, Riesenber y col. (2001) ya mostraron una alta incidencia de cuerpos lúteos anómalos en ovejas estimuladas mediante una única inyección de FSH en solución salina sin el co-tratamiento con eCG. En el presente estudio, la proporción de ovejas que exhibieron dicha función luteal inadecuada fue mínima, ya que sólo se observó dicha alteración en dos ovejas. La adición de una dosis baja de eCG a la FSHo administrada en vehículo

salino en una única inyección (Grupos A1, A2 y B2) sería importante para sostener la estimulación folicular iniciada por la FSH y así evitar las alteraciones referidas por Riesenbergh y col. (2001). Estos resultados confirman los hallazgos de Yamada y col. (1996) en la misma raza y los de Maxwell y Wilson (1989) en otra raza emparentada (Merino). Sin embargo, discrepan de las altas tasas de regresión informadas por varios autores en genotipos más distantes (Fukui y col., 1998; Watanabe y col., 1998a; Okada y col., 1999, 2000). Estas diferencias estarían en concordancia con la hipótesis que sostiene la influencia del efecto racial sobre la regresión luteal (Fukui y col., 1998; Okada y col., 2000). De igual forma, la baja incidencia de cuerpos lúteos regresados en el grupo FSHo/PVP (Grupo C1) confirma los hallazgos previos (D'Alessandro y col., 2001) y sugiere que este polímero permitiría la absorción lenta de la FSH inyectada, dando como consecuencia unos niveles de FSH en sangre más prolongados. Este hecho influiría positivamente sobre la calidad de los folículos y permitiría una luteinización adecuada de los cuerpos lúteos de las ovejas de la raza Corriedale.

Algunos autores han encontrado un incremento de la tasa de regresión atribuida a la menor calidad de los pastos en la estación de otoño que afectaría el estado nutricional del rebaño explotado bajo condiciones de pastoreo (Jabbour y col., 1991; Ryan y col., 1991). Los pastos destinados a la alimentación de las ovejas en el presente ensayo, y habituales en la alimentación de los rebaños en la región pampeana, fueron del ciclo O-I-P (otoño-invierno-primavera), y se caracterizan por tener una buena producción de forraje en cantidad y calidad durante el otoño. Además, los ciclos productivos más difundidos en los sistemas de explotación ovina del país y aplicados en los animales experimentales del presente estudio, son ciclos no acelerados basados en un intervalo entre partos de un año, de modo que las ovejas suelen tener una buena recuperación de su estado corporal en el momento de las cubriciones, que tienen lugar durante el otoño y la lactancia durante la primavera. Estas condiciones imperantes en el estudio pudieron haber contribuido en parte a la baja incidencia de fases luteales anómalas. No obstante, existen en el país otras regiones de crianza de esta raza donde las condiciones de alimentación son más marginales, situación que podría influir sobre los resultados.



Otro aspecto a considerar sería el estrés que pudieron padecer las ovejas debido a las condiciones requeridas para la ejecución del ensayo, es decir la movilización del rebaño, habituado a un manejo extensivo durante el resto del año, para cumplir con las actividades de inyección de las hormonas, detección de los celos, cubriciones y extracciones de sangre. Sin embargo y a pesar de estas condiciones, la incidencia de regresión luteal fue mínima. Por el contrario, algunos autores han atribuido, entre otros factores, al estrés asociado a las situaciones experimentales como causa de fallos de luteinización (Forcada y col., 2000; Okada y col., 2000). En vacas, Dobson y Smith (1995) han informado asimismo de fallos de ovulación en situaciones de cría con varios factores estresantes, sugiriendo que la incidencia de hipoplasia luteal estaría fuertemente asociada a factores ambientales.

En coincidencia con la descripción de patrones hormonales anómalos (Armstrong y col., 1982), en una (Grupo C1) de las dos ovejas que exhibieron regresión luteal, el pico preovulatorio de LH fue seguido por un pico secundario de LH de menor magnitud 12 h después. En la otra oveja (Grupo B2) se detectó la anticipación del pico de LH unas 6 h con respecto al inicio del celo. Es posible, sin embargo, que esta oveja hubiera sido marcada por los carneros una vez hubiera ya iniciado su periodo de celo. En este supuesto comportamiento pudo haber influido la preferencia de los carneros por otras hembras en celo y/o el propio comportamiento sexual particular de esta oveja (no observado). En ninguna de ellas se detectaron niveles altos de progesterona al momento del inicio del celo, como ha sido sugerido por Rubianes y col. (1996). En ambas ovejas el fenómeno de regresión luteal abarcó a la totalidad de los cuerpos lúteos presentes en los dos ovarios, lo cual coincide con Schiewe y col. (1990) pero difiere con otros investigadores (Cerbón, 1995; Rosas y col., 1995; Villanueva y col., 2000; Lopes y col., 2006) que señalan la coexistencia de cuerpos lúteos normales y regresados. Estas discrepancias podrían deberse a que los cuerpos lúteos que se consideran normales, en realidad ya iniciaron el proceso luteolítico, lo que no es posible distinguir únicamente por sus características morfológicas, sino que además debieran conocerse los niveles de progesterona y/o las características histológicas de las estructuras. En el presente estudio, la apreciación se basó no

sólo en la apariencia morfológica (cuerpos lúteos avasculares, pálidos y con un diámetro inferior a 3 mm), sino que posteriormente se confirmó con la baja concentración de P4 plasmática en el momento de la recuperación, de manera similar al estudio de Armstrong y col. (1982). Tras proceder al lavado de sus cuerpos uterinos, la recuperación de estructuras fue pobre (oveja Grupo C1) o nula (oveja Grupo B2), coincidiendo con la literatura (Schiewe y col., 1990; Cerbón, 1995; Rosas, 1995; Rubianes y col., 1996) y atribuída a la expulsión de los embriones vía cérvix. Las demás ovejas sometidas a estos tratamientos simplificados, que presentaron cuerpos lúteos con apariencia normal, tuvieron niveles de progesterona bajos al celo y altos al momento de la colecta, incluso comparables con los niveles hormonales resultantes del tratamiento convencional del Experimento 2 (FSHo en 8 dosis decrecientes). En forma similar y en un estudio realizado en vacas, Yamamoto y col. (1994) no encontraron diferencias en la concentración de progesterona durante el celo inducido y en el momento de la recuperación embrionaria entre vacas tratadas con FSHp en su forma habitual o en una única inyección mediante PVP, lo que sugiere el establecimiento de una función hormonal eficaz detrás de la aplicación de este tratamiento alternativo.

Conjuntamente, los resultados del presente estudio indican que la regresión luteal prematura no sería un problema en ovejas adultas de la raza Corriedale superovuladas mediante tratamientos hormonales simplificados durante el otoño.

### **6.3. SUPEROVULACIÓN Y PRODUCCIÓN DE EMBRIONES**

La superovulación es considerada efectiva cuando las ovejas presentan más ovulaciones que aquella referida como normal para la raza explotada bajo prácticas habituales de manejo. La raza Corriedale, explotada en forma semi-extensiva o extensiva en la región pampeana de la República Argentina, presenta normalmente 1 o 2 ovulaciones en plena estación reproductiva (otoño) (Irazoqui y Menvielle, 1982). Si bien los resultados del Experimento 1 demuestran que es

posible utilizar protocolos simplificados para inducir superovulación en ovinos, la estimulación con FSHo en única inyección en vehículo no salino (FSHo/PVP; Grupo C1) condujo a una respuesta ovárica menor, pues únicamente el 58,3% de las hembras que recibieron dicho tratamiento tuvieron al menos 3 cuerpos lúteos, siendo la tasa de ovulación de  $4,8 \pm 1,0$  cuerpos lúteos. Esta pobre respuesta ovulatoria podría ser atribuida a un período más corto de reclutamiento folicular (Scaramuzzi y col., 1993; Bartlewski y col., 1999) al iniciar el tratamiento poco antes del retiro de las esponjas sincronizadoras. A esta situación se pudo haber sumado una corta duración de concentraciones adecuadas de la FSH cuando ésta fue administrada en PVP. Esto representa sólo una hipótesis, pues en el presente ensayo no se cuantificaron las concentraciones de FSH en sangre. Además, en la bibliografía no existen referencias sobre estos niveles hormonales en ovinos inyectados con FSH en vehículo a base de PVP.

El protocolo de administración de FSHo en PVP fue elegido a partir de las observaciones realizadas en ovejas italianas por D'Alessandro y col. (2001), quienes mostraron la eficacia de una única inyección de FSH porcina disuelta en PVP administrada a las 24 h, pero no a las 48 h, antes de la retirada de las esponjas, mediante la vía i.m. en lugar de la vía s.c. Bajo este método de estimulación, las ovejas del experimento de D'Alessandro y col. (2001) tuvieron una tasa ovulatoria de  $8,1 \pm 1,7$ , con  $4,2 \pm 1,3$  embriones fertilizados, de los cuales el 81% fueron transferibles. Dicha tasa de ovulación fue similar a la obtenida a partir del tratamiento con 6 dosis decrecientes desde las -48 h de la retirada, aunque mayor a la registrada tras repartir la FSHp en 4 dosis decrecientes. Los estudios iniciales realizados por Dattena y col. (1994) en ovejas de raza Sarda en anestro demostraron que una única inyección de FSH porcina en PVP es capaz de inducir una respuesta superovulatoria similar a la obtenida a partir de otros protocolos, como un tratamiento corto basado en 4 dosis múltiples decrecientes de FSHp o el co-tratamiento de FSHp en única inyección más eCG. Contrariamente a estos autores, Lajous y col. (1997) no lograron resultados satisfactorios empleando el protocolo simplificado de administración en PVP, lo cual resaltaría la importancia potencial del genotipo en la respuesta a tratamientos superovulatorios específicos.

La posibilidad de simplificar los tratamientos superovulatorios basados en la administración de FSH como única fuente hormonal y en vehículo salino, consiste en la reducción del número de inyecciones y/o la inyección de dosis de concentraciones iguales en vez de decrecientes. Los estudios previos enfocados en la reducción del número de inyecciones de FSH cruda de origen ovino (Rexroad y Powell, 1991) o porcino (D'Alessandro y col., 2005) han mostrado resultados efectivos. Por otro lado, Torrès y col. (1987), quienes fueron los primeros en comparar protocolos de dosis iguales vs. decrecientes de administración de FSH (no purificada, de origen porcino), refirieron una superior tasa de ovulación a partir de la estimulación con regímenes de dosis decrecientes. El menor contenido de LH en las preparaciones comerciales de FSH ovina (Ovagen), podría justificar la recomendación del laboratorio acerca del uso de un protocolo de dosis constantes en reemplazo del tradicional de concentraciones decrecientes, necesariamente adoptado con las preparaciones no purificadas. Tales fuentes de información fueron la base para evaluar los regímenes de inyección de FSHo dividida en 4 (Grupo B1) y en 6 dosis iguales (Grupo D1) como alternativas de simplificación de los tratamientos. Sin embargo, los resultados del Experimento 1 mostraron que la estimulación mediante FSHo repartida en 4 dosis iguales produjo la menor cantidad de embriones debido a una menor tasa ovulatoria y a fallos en la fertilización. La administración de la FSHo en 6 dosis constantes en lugar de 4, si bien produjo una cantidad de cuerpos lúteos similar, mejoró las tasas de recuperación y de fertilización y por lo tanto la cantidad de embriones viables. Estudios previos realizados en ovejas de raza Manchega demostraron que los protocolos de dosis constantes de Ovagen producen un desarrollo folicular menor y una tasa ovulatoria más baja en comparación con el protocolo de dosis decrecientes (Gonzalez-Bulnes y col., 2000, 2002b). Esto es probable que ocurra debido a que el tratamiento con FSH en concentraciones decrecientes sería más similar al patrón de secreción endógeno de FSH durante la fase folicular de los ciclos estrales no estimulados. La concentración de FSH disminuye después de la luteólisis, suprimida por el estradiol y la inhibina procedentes de los folículos preovulatorios (Baird y McNeilly, 1981), hasta alcanzar sus niveles más bajos 1 a 2 días antes del celo (Miller y col., 1981).

Incluso, esta caída de la FSH sería más pronunciada durante la fase folicular temprana de ovejas con alta tasa ovulatoria (Avdi y col., 1997). La administración de dosis elevadas de FSH durante la fase folicular temprana causaría atresia de los folículos más grandes (López-Sebastián y col., 1999), lo que explicaría las mayores fallas ovulatorias halladas tras la estimulación con dosis iguales de gonadotrofinas (González-Bulnes y col., 2000a). Contrariamente, los estudios de estimulación ovárica con la finalidad de realizar OPU para producir embriones *in vitro* en lugar de recolectar embriones *in vivo*, refieren resultados satisfactorios tras emplear protocolos de dosis iguales. Así, Baldassare y col. (1996) no observaron diferencias entre ovejas tratadas con dosis constantes o decrecientes en términos de cantidad de folículos aspirados y recuperación de ovocitos, mientras que los estudios de Ptak y col. (1999, 2002) informan de altas tasas de recuperación de ovocitos y de desarrollo de blastocistos en ovejas domésticas y salvajes estimuladas con seis dosis iguales de FSH. El estudio más reciente de Berlinguer y col. (2004) informó que la respuesta ovárica no sólo no era afectada por el hecho de administrar la FSH en dosis iguales o decrecientes en ovejas sometidas a OPU, sino que el régimen de dosis constantes tendió a producir una mayor cantidad de embriones. Estos autores sostienen la hipótesis de que las primeras dosis altas de FSH en un protocolo de inyecciones múltiples decrecientes podrían inducir al desarrollo acelerado y anormal de los folículos y por lo tanto, la desincronización del crecimiento ovocito-folículo, causando una reducción en la calidad embrionaria.

Las diferencias halladas en las tasas ovulatorias entre ensayos distintos para un mismo protocolo de estimulación mediante FSHo como única fuente hormonal (Grupos B1 y C1), podrían sugerir la variabilidad entre partidas distintas de una misma hormona. Phillips y col. (1993) señalan la falta de consistencia en la actividad entre ensayos para una misma preparación de gonadotrofina. Más recientemente, este problema fue destacado por Becker en el marco del informe del Workshop de la Reunión de la AETE del año 2002, quien señaló la escasa cantidad de trabajos donde se comparen los resultados obtenidos mediante la estimulación con diferentes partidas de las gonadotrofinas, a pesar de que varios participantes habían notado diferencias en la respuesta superovulatoria a partir de

distintas partidas independientemente de la gonadotropina utilizada. Los datos de Bari y col. (2001) relativos a un programa de superovulación implementado durante ocho años destacan la variación entre años de la tasa ovulatoria y de la cantidad de embriones recuperados a pesar de realizar un mismo manejo en el rebaño y de que la condición corporal de las ovejas no variara entre años. Además dichos autores destacan que este efecto no puede ser atribuido al empleo de diferentes donantes entre años, debido a que en aquellos animales que repitieron el tratamiento en años sucesivos se observaron las mismas variaciones.

Otro factor que pudo haber influido sobre la variación registrada en la tasa ovulatoria entre los ensayos es la fecha en que éstos fueron realizados dentro de la temporada reproductiva del otoño. Las ovejas Corriedale presentan su máxima tasa ovulatoria en los meses de marzo y abril, de acuerdo a un estudio realizado en la zona (Sánchez y col., 1994). Los dos ensayos que abarcaron el Experimento 1 del presente estudio fueron ejecutados durante principios de abril y fines de mayo. Los mismos tratamientos aplicados a ovejas en similares condiciones de manejo y estado nutricional generaron menores tasas ovulatorias en el ensayo más tardío (fines de mayo). Es posible que la época del año ejerciera cierto efecto, en función de la influencia estacional (anestro vs. estación de cría) sobre la respuesta superovulatoria que es posible encontrar en ovejas de distintas razas localizadas en latitudes altas (Gherardi y Lindsay, 1980; Torres y col., 1987; Mufti y col., 1997), probablemente debido a diferencias estacionales en la sensibilidad de los ovarios a las gonadotropinas exógenas (Gherardi y Lindsay, 1980). Incluso, un estudio realizado en la India en ovejas de raza Corriedale superovuladas con eCG registró variaciones mensuales en la tasa ovulatoria, de modo que durante el mes de julio (inicio de la temporada reproductiva) la cantidad de cuerpos lúteos fue inferior a la lograda durante agosto (plena temporada reproductiva).

La elección de los protocolos evaluados en el Experimento 2 se basó en los resultados obtenidos a partir del Experimento 1. El protocolo A1 (176 unidades NIH-FSH-S1 de FSHo y 500 UI eCG en única inyección) fue seleccionado teniendo en cuenta dos aspectos: el grado de simplificación y los resultados

obtenidos (cantidad de embriones viables). Si bien el protocolo C1 fue el más simplificado, pues consistió en la administración de una sola hormona (FSHo) en única inyección, sin embargo su administración no se efectuó en solución salina, sino en vehículo retardante formulado a partir de la droga pura que se comercializa. A pesar de no detectarse diferencias significativas en la cantidad de embriones viables entre los tratamientos A1 y C1, es necesario aclarar que el tratamiento A1 produjo en promedio 2 embriones más que el C1, lo cual podría ser biológicamente importante. Otra variable de interés es el porcentaje de ovejas efectivamente superovuladas. Mientras que en el protocolo A1 el 100% de las ovejas ovularon con al menos 3 cuerpos lúteos, sólo el 58,3% de las ovejas estimuladas mediante el tratamiento C1 presentó esta respuesta. En base a estos resultados, se seleccionó el protocolo A1 y se evaluó la posibilidad de reducir la dosis total de la FSHo (Grupo A2) con el objetivo de disminuir el costo del tratamiento superovulatorio. Estos dos protocolos fueron a su vez comparados con el tratamiento convencional de inyecciones múltiples decrecientes de FSHo (Grupo C2).

La estimulación empleando el protocolo estándar de ocho dosis decrecientes de FSH ovina (Grupo C2), produjo resultados comparables con los publicados en otras razas en cuanto al intervalo al celo (Gonzalez-Bulnes y col., 2002b; Veiga-Lopez y col., 2006a) y al pico de LH (Mitchell y col., 2002), tasa ovulatoria (Forcada y col., 2000; Gonzalez-Bulnes y col., 2003; Veiga-Lopez y col., 2006b; Bettencourt y col., 2008), estructuras recuperadas (Forcada y col., 2000; Gonzalez-Bulnes y col., 2002b; Veiga-Lopez y col., 2006b), embriones recuperados (Gonzalez-Bulnes y col., 2003; Bettencourt y col., 2008) y embriones viables (Forcada y col., 2000; Gonzalez-Bulnes y col., 2003; Veiga-Lopez y col., 2006b). Contrariamente a otras investigaciones (Forcada y col., 2000, 2006; Gonzalez-Bulnes y col., 2002b; Veiga-Lopez y col., 2006a, 2006b) no se detectaron fallos de ovulación. Como se aclaró anteriormente, el intervalo entre el inicio del celo y el pico de LH fue más corto que el reportado por la literatura (Gonzalez-Bulnes y col., 2002b; Veiga-Lopez y col., 2006a).

Los tratamientos simplificados evaluados en el Experimento 2, es decir utilizando la misma dosis de FSHo en única inyección en combinación con eCG (Grupo A2) o una dosis reducida de FSHo en este protocolo combinado (Grupo B2), dieron lugar a unas tasas ovulatorias similares a aquélla obtenida a partir del protocolo estandar de dosis múltiples. Esto concuerda con un estudio previo (Watanabe y col., 1998a) pero difiere con los resultados de otros autores, quienes mostraron una mayor cantidad de cuerpos lúteos a partir de la estimulación con FSH en una única inyección (Leoni y col., 2001) o repartida en varias dosis (Ryan y col., 1991) junto con eCG, debido al reclutamiento más sostenido de folículos pequeños. En cuanto a la funcionalidad de los cuerpos lúteos, la inclusión de eCG aún en una dosis moderada podría incrementar la secreción de progesterona durante la fase luteal, como ocurrió en el Experimento 2 y coincidiendo con otra referencia previa (Jabbour y Evans, 1991a). Sin embargo, la variabilidad entre partidas de la eCG podría incidir sobre estos resultados, tal y como se deduce de la producción de progesterona por cuerpo lúteo en las ovejas estimuladas sólo con FSHo (Grupo C2), que es comparable a aquélla del co-tratamiento A1, confirmando a su vez los resultados de Chagas e Silva (2003), quienes no hallaron diferencias en la secreción de progesterona en ovejas nativas de Portugal estimuladas con eCG o FSH.

A pesar de la tendencia a producir más folículos persistentes en el Grupo A2 seguido por el Grupo B2, estos fallos de ovulación no tuvieron una incidencia significativa. Incluso, la literatura señala que en ciertos tratamientos la incidencia de estos folículos anovulatorios puede ascender al 50% de la población de folículos preovulatorios (Gonzalez-Bulnes y col., 2000).

Las menores tasas de recuperación y de fertilización logradas en los protocolos simplificados A2 y B2 en comparación con el tratamiento convencional C2, podrían estar asociadas con la tendencia a producir más folículos grandes anovulatorios y/o probablemente con una mayor producción de estradiol por parte de tales folículos (no medido en el presente ensayo). Varios estudios (Jabbour y Evans, 1991a; Martemucci y col., 1995; Rubianes y col., 1995; Chagas e Silva y col., 2003) han demostrado que la eCG suele facilitar el desarrollo de folículos



grandes que persisten luego de la ovulación, probablemente debido a la vida útil más larga de esta gonadotropina y a su alta actividad LH. Tales folículos, conjuntamente con su mayor producción hormonal individual, producirían concentraciones de estradiol anormalmente elevadas (Moor y col., 1985; Jabbour y Evans, 1991a; Driancourt y Fry, 1992), lo que afectaría al ambiente uterino y por lo tanto podría disminuir las tasas de fertilización y de recuperación. La menor fertilidad sería debida al desarrollo anormal de los ovocitos (Wehrman y col., 1993) y a la alteración del ambiente uterino con consecuencias sobre el transporte de los gametos a través del útero (Evans y Armstrong, 1984; Murray y col., 1994). También ha podido influir la alteración en el momento de la ovulación inducida por la eCG, en concreto la falta de sincronización entre la ovulación y el tiempo de inseminación (Ryan y col., 1991). La menor cantidad de estructuras recuperadas estaría asociada a fallos en la captación de los óvulos por la fimbria (Murray y col., 1994) y al acelerado transporte de los embriones, originando que éstos sean expulsados del útero (Whyman y Moore, 1980). En concordancia con los resultados presentes, los estudios previos basados en el co-tratamiento de FSHp en única inyección y eCG informaron asimismo alteraciones en los procesos de recuperación (Ledda y col., 1992; Leoni y col., 2001) y de fertilización (Ledda y col., 1992) aún cuando estos autores recurrieran a la reducción de la dosis de FSH (Leoni y col., 2001) o a la inyección de GnRH (Leoni y col., 2001). En forma similar, tras el tratamiento con FSHp en dosis múltiples más eCG, Naqvi y Gulyani (1999) también refieren fallos de fertilización. Sin embargo, estos resultados contrastan con los obtenidos en ovejas Merino estimuladas con FSHp repartida en varias dosis más eCG (Maxwell y Wilson, 1989), señalando probablemente diferencias entre las razas ovinas en la sensibilidad al tratamiento combinado de tales hormonas. La información procedente de una escasa cantidad de ovejas Corriedale (n=5) inyectadas 48 h antes del retiro de las esponjas con una dosis única de FSHp junto con eCG, señala una tasa de recuperación del 58,3% comparable a las del presente ensayo (grupos A2 y B2), pero sin problemas en la fertilización (Yamada y col., 1996). Es necesario aclarar que estos autores incluyeron GnRH en el protocolo de estimulación.

Coincidiendo con las investigaciones de Ryan y col. (1991) en ovejas Merino y de Okada y col. (1999) en hembras Southdown, en el presente estudio algunas ovejas tratadas tanto con la dosis entera como reducida de FSHo en combinación con eCG tuvieron una excesiva hiperestimulación folicular (se registró una tasa ovulatoria muy alta). Dicha hiperestimulación podría haber afectado negativamente la eficiencia en la recuperación de las estructuras (ovocitos y embriones). Por ejemplo, en el presente estudio sólo se recuperaron entre el 13 y el 45% de las estructuras en tres ovejas del Grupo A2 que presentaron de a 20 a 26 cuerpos lúteos. De igual modo, las menores tasas de recuperación registradas en el Grupo B2 (33 y 35%) correspondieron a aquellas ovejas con mayor respuesta ovárica (18 y 17 cuerpos lúteos, respectivamente). Es probable que la eficiencia en la captación de las estructuras por parte de la fimbria estuviera alterada en tales ovejas superestimuladas hormonalmente. Estas observaciones concuerdan con la menor tasa de recuperación señalada por Okada y col. (1999) en hembras Southdown bajo un protocolo combinado simplificado, como resultado de una tasa ovulatoria elevada, con registros de animales portadores de hasta 76 cuerpos lúteos. La fertilización de las ovejas hiperestimuladas referidas en el presente estudio no estuvo comprometida a pesar de recurrirse a la monta natural como método de servicio. Según ha sido informado inicialmente por Armstrong y Evans (1983) las tasas de fertilización tras la monta natural estarían comprometidas en hembras que exceden las 16 ovulaciones. Más recientemente, los datos de Cognie y col. (2003) confirman alteraciones en la fertilización en hembras con una muy alta respuesta ovulatoria (más de 30 ovulaciones), atribuidas a disturbios en el transporte espermático y en la calidad de los ovocitos.

La menor tasa de viabilidad registrada en el tratamiento combinado usando la FSHo en dosis entera (grupo A2) fue debida a una mayor incidencia de ovocitos no fertilizados, pero no a problemas en el desarrollo embrionario. Descontando los ovocitos no fertilizados, los porcentajes de embriones viables en relación a los fertilizados para los grupos A2, B2 y C2 serían comparables (78,1%, 83,9% y 75,8% respectivamente; no se muestran en las tablas).

La eficiencia global de los regímenes hormonales se determina a partir de la cuantificación de los embriones viables finalmente obtenidos. En base a la clasificación visual de los embriones en relación a su estadio del desarrollo y a su apariencia morfológica, no se hallaron diferencias significativas en la cantidad de embriones en condiciones de ser transferidos, entre los grupos experimentales A2, B2 y C2. Sin embargo, se necesitarían estudios más detallados, especialmente si los embriones fueran destinados a su criopreservación en lugar de ser transferidos en fresco. La información procedente de Leoni y col. (2001) sugiere que los embriones derivados del tratamiento combinado de FSHp y eCG, provistos de una morfología aparentemente normal, tendrían un menor número tanto de células totales como de células en el macizo interno que aquéllos obtenidos a partir de la estimulación únicamente con FSHp. La presencia de una menor cantidad de blastómeros podría ocasionar una mayor sensibilidad de los embriones a los procesos de crioconservación.

## VII. CONCLUSIONES

- La inducción de la superovulación mediante tratamientos simplificados de administración de FSHo sólo o combinada con eCG en ovejas de raza Corriedale dentro de la estación de cría, permite obtener resultados satisfactorios.
- Entre los tratamientos simplificados evaluados, la administración de FSHo en una única inyección junto con una dosis baja de eCG permitió lograr una mayor respuesta ovárica y una tendencia a producir más embriones viables.
- La estrategia de reducir la dosis de FSHo en el protocolo combinado con eCG produjo resultados próximos a los del tratamiento convencional de dosis múltiples decrecientes (4,0 frente a 5,5 embriones viables respectivamente), con las ventajas de su mayor sencillez y de reducción de costes.
- La presentación de los celos y los perfiles de LH difieren entre los grupos que incluyen o no eCG en su protocolo de estimulación:
  - La inclusión de eCG produce la anticipación del inicio de los celos y del pico preovulatorio de LH.
  - La estimulación únicamente con FSHo produce una variación en la presentación de los celos y del pico de LH asociada a variaciones en la tasa ovulatoria.
- La adición de eCG al tratamiento de FSHo puede incrementar la producción de progesterona (por cuerpo lúteo) en el momento del celo y en el día de la recuperación de embriones.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Acritopoulou, S., 1979. Progesterone and LH concentrations in ewes after ICI 80996, an analogue of  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , at two different stages of the breeding season. *Theriogenology* 11, 411-420.
- AETA, American Embryo Transfer Association. Internet: <http://www.aeta.org>
- AETE, Association Européenne de Transfert Embryonnaire. Internet: <http://www.aete.eu>
- Aké-López, J.R., Heredia y Aguilar, M., Alfaro-Gamboa, M., Centurión-Castro, F., Rojas-Rodríguez, O., 2003. Efecto de la hormona en la respuesta superovulatoria y de la sincronía del estro en el porcentaje de gestación de ovejas Pelibuey. *Veterinaria México* 34, 225-233.
- Alila, H.W., Dowd, J.P., 1991. The control of corpus luteum function in domestic ruminants. *Oxford Reviews of Reproductive Biology* 13, 203-237. *Ann. Confr. Soc. for the Study of Fertility, Manchester (Abstr)*.
- Al-Kamali, A.A., Boland, M.P., Crosby, T.F., Gordon, I., 1985. Reduced superovulatory response in the ewe following repeated gonadotrophin treatment. *Vet. Rec.* 116, 180-181.
- Allen, W.R., Moor, R.M., 1972. The origin of the equine endometrial cups. I. Production of PMSG by fetal trophoblast cells. *J. Reprod. Fertil.* 29, 313-316.
- Amiridis, G.S., Rekkas, C.A., Fthenakis, G.C., Vainas, E., Lymberopoulos, A., Christodoulou, V., Belibasaki, S., 2002. Progesterone concentration as an indicator of ovarian response to superovulation in Chios ewes. *Theriogenology* 57, 1143-1150.
- Armstrong, D.T., Evans, G., 1983. Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. *Theriogenology* 19, 31-42.

- Armstrong, D.T., Pfitzner, A.P., Porter, K.J., Warnes, G.M., Janson, P.O., Seamark, R.F., 1982. Ovarian responses of anoestrous goats to stimulation with pregnant mare serum gonadotrophin. *Anim. Reprod. Sci.* 5, 15-23.
- Avdi, M., Chemineau, P., Driancourt, M.A., 1997. Alterations in follicular maturation associated with within-breed variation in ovulation rate in Chios sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 46, 223-235.
- Baird, D.T., 1978. Pulsatile secretion of LH and ovarian estradiol during the follicular phase of the sheep estrus cycle. *Biol. Reprod.* 18, 359-364.
- Baird, D.T., 1983. Factors regulating the growth of the preovulatory follicle in sheep and human. *J. Reprod. Fertil.* 46, 343-352.
- Baird, D.T., 1992. Luteotropic control of the corpus luteum. *Anim. Reprod. Sci.* 28, 95-102.
- Baird, D.T., McNeilly, A.S., 1981. Gonadotrophic control of follicular development and function during the oestrous cycle of the ewe. *J. Reprod. Fertil.* 30, 119-133.
- Baird, D.T., Campbell, B.K., Mann, G.E., McNeilly, A.S., 1991. Inhibin and oestradiol in the control of FSH secretion in the sheep. *J. Reprod. Fertil.* (Suppl) 43,125-138.
- Baldassarre, H., Furnus, C.C., de Matos, D.G., Pessi, H., 1996. In vitro production of sheep embryos using laparoscopic folliculocentesis; alternative gonadotrophin treatments for stimulation of oocyte donors. *Theriogenology* 45, 707-717.
- Bari, F., Khalid, M., Wolf, B., Haresign, W., Murray, A., Merrell, B., 2001. The repeatability of superovulatory response and embryo recovery in sheep. *Theriogenology* 56, 147-155.
- Bartlewski, P.M., Beard, A.P., Cook, S.J., Chandolia, R.K., Honaramooz, A., Rawlings, N.C., 1999. 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.

Bartlewski, P.M., Vanderpol, J., Beard, A., Cook, S.J., Rawlings, N.C., 2000. Ovarian antral follicular dynamics and their associations with peripheral concentrations of gonadotropins and ovarian steroids in anoestrous Finnish Landrace ewes. *Anim. Reprod. Sci.* 58, 273-291.

Beard, A.P., Lamming, G.E., 1994. Oestradiol concentration and the development of the uterine oxytocin receptor and oxytocin-induced PGF<sub>2</sub> release in ewes. *J. Reprod. Fertil.* 100, 469-475.

Becker, F., 2002. Superovulation treatments and country regulation practices. In: *Ass. Eur. Trans. Emb. (AETE) Newsletter N°17*, p. 5-7.

Berlinguer, F., Leoni, G., Bogliolo, L., Pintus, P.P., Rosati, I., Ledda, S., Naitana, S., 2004. FSH different regimes affect the developmental capacity and cryotolerance of embryos derived from oocytes collected by ovum pick-up in donor sheep. *Theriogenology* 61, 1477-1486.

Bettencourt, E.M.V., 1999. Caracterização de Parâmetros Reprodutivos nas Raças Ovinas Merina Branca, Merina Preta e Campaniça. Dissertação de Mestrado em Produção Animal. Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária. pp. 139.

Bettencourt, E.M., Bettencourt, C.M., Chagas e Silva, J., Ferreira, P., Manito, C.I., Matos, C.M., Romão, R.J., Rocha, A., 2008. Effect of season and gonadotrophin preparation on superovulatory response and embryo quality in Portuguese Black Merinos. *Small Rumin. Res.* 74, 134-139.

Bindon, B.M., Piper, L.R. Physiological basis of ovarian response to PMSG in sheep and cattle. In: Shelton, J.N., Trounson, A.O., Moore, N.W., James, J.W. (Ed.), *Embryo transfer in cattle, sheep and goats*. Australian Society for Reproductive Biology, Canberra, 1982, pp. 1-5.

- Bindon, B.M., Blanc, M.R., Pelletier, J., Terqui, M., Thimonier, J., 1979. Periovulatory gonadotrophin and ovarian steroid patterns in sheep of breeds with differing fecundity. *J. Reprod. Fertil.* 55, 15-25.
- Bindon, B.M., Piper, L.R., Cahill, L.P., Driancourt, M.A., O'Shea, T., 1986. Genetic and hormonal factors affecting superovulation. *Theriogenology* 25, 53-70.
- Bister, J.L., Paquay, R., 1983. Fluctuations in the plasma levels of folliclestimulating hormone during estrous cycle, anestrus, gestation and lactation: evidence for an endogenous rhythm of FSH release. *Theriogenology* 19, 565-582.
- Bister, J.L., Noel, B., Perrad, B., Mandiki, S.N., Mbayahaga, J., Paquay, R., 1999. Control of ovarian follicles activity in the ewe. *Domest. Anim. Endocrinol.* 17, 315-328.
- Blache, D., Batailler, M., Fabre-Nys, C., 1994. Oestrogen receptors in the preoptic hypothalamic continuum: immunohistochemical study of the distribution and cell density during oestrous cycle in ovariectomized ewe. *J. Neuroendocrinol.* 6, 329-339.
- Blanco, M.R., Simonetti, L., Rivera, O.E., 2003. Embryo production and progesterone profiles in ewes superovulated with different hormonal treatments. *Small Rumin. Res.* 47, 183-191.
- Bo, G.A., Hockley, D.K., Tríbulo, H., Jofre, F., Tríbulo, R., Busso, N., Barth, A.D., Mapletoft, R.J., 1991. The effect of dose schedule and route of administration on superovulatory response to Folltropin in the cow. *Theriogenology* 35, 186 (Abstract).
- Bo, G.A., Hockley, D.K., Nasser, L.F., Mapletoft, R.J., 1994. Superovulatory response to a single subcutaneous injection of Folltropin-V in beef cattle. *Theriogenology* 42, 963-975.
- Boland M.P., Goulding D., Roche J.F., 1991. Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle. *Theriogenology* 35, 5-17.



- Bonino Morlán, J., Hughes, P., 1996. Inducción de celos en ovejas Corriedale fuera de la estación sexual. *Producción Ovina* 9, 85-94.
- Bonino Morlán, J., Hughes, P., Villaamil, A., Azzarini, M., Valledor, F., 1989. Multiovolución y transplante embrionario en ovinos. Resumen de experiencias realizadas en Uruguay. *Producción Ovina* 1, 11-22.
- Booth, W.D., Newcomb, R., Strange, H., Rowson, L.E.A., 1975. Plasma oestrogen and progesterone in relation to superovulation and egg recovery in the cow. *Vet. Rec.* 97, 366-369.
- Boscós, C.M., Samartizi, F.C., Dellis, S., Rogge, A., Stefanakis, A. Krambovitis, E., 2002. Use of progestagen-gonadotropin treatments of sheep. *Theriogenology* 58,1261-1272.
- Brand, A., de Jong, W.H., 1973. Qualitative and quantitative micromorphological investigations of the tertiary follicle population during the oestrous cycle in sheep. *J. Reprod. Fertil.* 33, 431-439.
- Brogliatti, G.M., Lagomarsino, H.R., Martínez, A.G., 1998. Uso de una única dosis de FSH en la superovulación de vacas Hereford. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 18, Sup. 1, 364 (Abstr.).
- Brooks, A.N., Lees, P.D., Cheeks, R.E. Lamming, G.E., Haynes, N.B., 1983. *Proc. Ann. Confr. Soc. for the Study of Fertility, Manchester* (Abstr.).
- Brown, J.B., 1978. Pituitary control of ovarian function. Concepts derived from gonadotropin therapy. *Aust. N.Z. J. Obstet. Gynaecol.* 18, 47-54.
- Bubis, J.J., Cohen, S., Dinbar, J., 1975. Storage of polyvinylpyrrolidone mimicking a congenital mucolipid storage disease in a patient with Muchhausen's syndrome. *Isr. J. Med. Sci.* 11, 999.
- Bunch, T.D., Panter, K.E., Wang, S., Evans, R.C., Holyoak, G.R., 2000. The effects of three dosing regimens of gonadotropins on sheep superovulation. *Theriogenology* 53, 494 (Abstract).

- Cahill, L.P., Mariana, J.C., Mauleon, P., 1979. Total ovarian follicular populations in ewes of high and low ovulation rate. *J. Reprod. Fertil.* 55, 27-36.
- Caldwell, B.V., Moor, R.M., 1971. Further studies on the role of the uterus in the regulation of corpus luteum function in sheep. *J. Reprod. Fertil.* 26, 133-135.
- Calvo, C.A., 1978. Ovinos: orígenes, caracteres zootécnicos, ecología, lanas, cueros, carnes, razas. 299 pp.
- Cameron, A.W., Battye, K.M., Trounson, A.O., 1988. Time of ovulation in goats (*Capra hircus*) induced to superovulate with PMSG. *J. Reprod. Fertil.* 83, 747-752.
- Caraty, A., Delaleu, B., Chesneau, D., Fabre-Nys, C., 2002. Sequential role of E2 and GnRH for the expression of estrous behaviour in ewes. *Endocrinology* 143, 139-145.
- Carson, R.S., Findlay, J.K., Clarke, I.J., Burger, H.G., 1981. Estradiol, testosterone and androstenedione in ovine follicular fluid during growth and atresia of ovarian follicles. *Biol. Reprod.* 24, 105-113.
- Cátedra de "Ovinos, Caprinos y Camélidos Sudamericanos", Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Lomas de Zamora, Buenos Aires, Argentina.
- Cerbón, G.J.L., 1995. Recuperación de embriones en ovejas superovuladas inseminadas intrauterinamente o por monta natural (tesis de licenciatura). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.
- CETA, Canadian Embryo Transfer Association. Internet: <http://www.ceta.ca>
- Chagas e Silva, J., Lopes da Costa, L., Cidadao, R., Robalo Silva, J., 2003. Plasma progesterone profiles, ovulation rate, donor embryo yield and recipient embryo survival in native Saloia sheep in the fall and spring breeding seasons. *Theriogenology* 60, 521-532.

- Chupin, D., Cognie, Y., Combarous, Y., Procureur, R., Saumande, J., 1987. Effect of purified LH and FSH on ovulation in the cow and ewe. In: *Follicle Growth and Ovulation Rate in Farm Animals*, pp 63–72. Eds JF Roche & D O'Callaghan. Dordrecht: Martinus Nijhoff.
- Cognié, Y., 1992. Progress in reproduction techniques in sheep. *World Sheep and Wool Congress*, Argentina.
- Cognié, Y., Baril, G., Poulin, N., Mermillod, P., 2003. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology* 59, 171-188.
- Cole, H.H., Hart, G.H., 1930. The potency of blood serum of mares in progressive stages of pregnancy in effecting the sexual maturity of the immature rat. *Amer. J. Physiol.* 93, 57-68.
- Cordeiro, M.F., Lima-Verde, J.B, Lopes-Júnior, E.S., Teixeira, D.I.A., Farias, L.N., Salles, H.O., Simplicio A.A., Rondina, D., Freitas, V.J.F., 2003. Embryo recovery rate in Santa Inês ewes subjected to successive superovulatory treatments with pFSH. *Small Rumin. Res.* 49, 19-23.
- Cseh, S., Seregi, J., 1993. Practical experiences with sheep embryo transfer *Theriogenology* 39, 207.
- D'Alessandro, A.G., Martemucci, G., Totoda, F., Gambacorta, M., Manchisi, A., 1996. Superovulation and embryo production in ewes using a commercial p-FSH. *Small Ruminant Research* 19, 255-261.
- D'Alessandro, A.G., Martemucci, G., Colonna, M.A., Borghese, A., Terzano, M.G., Bellitti, A., 2001. Superovulation in ewes by a single injection of pFSH dissolved in polyvinylpyrrolidone (PVP): effects of PVP molecular weight, concentration and schedule of treatment. *Anim. Reprod. Sci.* 65, 255-264.
- D'Alessandro, A.G., Martemucci, G., Taibi, L., 2005. How the FSH/LH ratio and dose numbers in the p-FSH administration treatment regimen, and insemination schedule affect superovulatory response in ewes. *Theriogenology* 63, 1764-1774.

- Dattena, M., Vespignani, S., Branca, A., Gallus, M., Ledda, S., Naitana, S., Cappai, P., 1994. Superovulatory response and quality of embryos recovered from anestrus ewes after a single injection of porcine FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology* 42, 235-239.
- Demoustier, M.M., Beckers, J.F., Van Der Zwalmen, P., Closset, J., Gillard, J.L., Ectors, F., 1988. Determination of porcine plasma follitropin levels during superovulation treatment in cows. *Theriogenology* 30, 379-386.
- Dobson, H., 2003. Stress and reproduction. 19th Annual Meeting A.E.T.E., 105-113.
- Dobson, H., Campbell, B.K., Scaramuzzi, R.J., 1997. Use of a GnRH antagonist in conjunction with low amplitude, high frequency LH pulses to induce follicular growth without an LH surge and ovulation in ewes. *Anim. Reprod. Sci.* 46, 213-222.
- D'Occhio, M.J., Jillella, D., Lindsey, B.R., 1999. Factors that influence follicle recruitment, growth and ovulation during ovarian superstimulation in heifers: opportunities to increase ovulation rate and embryo recovery by delaying the exposure of follicles to LH. *Theriogenology* 51, 9-35.
- Donaldson, L.E., 1991. Superovulation on trial. AUSA International Inc., Tyler, TX.
- Downey, B.R., 1980. Regulation of the estrous cycle in domestic animals: A review. *Can. Vet. J.* 21, 301-306.
- Driancourt, M.A., 1987. Ovarian features contributing to the variability of PMSG-induced ovulation rate in sheep. *J.Reprod. Fertil.* 80, 207-212.
- Driancourt, M.A., 2001. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology* 55, 1211-1239.
- Driancourt, M.A., Cahill, L.P., 1984. Preovulatory follicular events in sheep. *J. Reprod. Fertil.* 71, 205-211.

- Driancourt, M.A., Fry, R.C., 1988. Differentiation of ovulatory follicles in sheep. *J. Anim. Sci.* 66, 9-20 (Suppl. 2).
- Driancourt, M.A., Fry, R.C., 1992. Effect of superovulation with pFSH or PMSG on growth and maturation of the ovulatory follicles in sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 27, 279-292.
- Driancourt, M.A., Avdi, M., 1993. Effect of the physiological stage of the ewe on the number of follicles ovulating following hCG injection. *Anim. Reprod. Sci.* 32, 227-236.
- Driancourt, M.A., Gibson, W.R., Cahill, L.P., 1985. Follicular dynamics throughout the oestrous cycle in sheep. A review. *Reproduction Nutrition and Development* 25, 1-15.
- Driancourt M.A., Fry R.C., Campbell B.K., McNeilly A.S., 1990. Granulosa cell content and production of steroids, inhibin and follicular peptides by large follicles from a range of prolific and non-prolific breeds of sheep. *J. Reprod. Fertil.* 43, 230-231.
- Driancourt, M.A., Gougeon, A., Royere, D., Thibault, C., 1993. Ovarian function. In: *Reproduction in mammals and man*. C. Thibault, M.C. Levasseur, R.H.F. Hunter Eds., Paris, Ellipses, 281-305.
- Duggavathi, R., 2004. Dynamics and regulation of ovarian antral follicular waves in sheep. Thesis In Doctor of Philosophy In the Department of Veterinary Biomedical Sciences University of Saskatchewan Saskatoon, pp. 246.
- Echternkamp, S.E., Bolt, D.J., Hawk, H.W., 1976. Ovarian and pituitary hormones in blood of progestogen-treated ewes. *J. Anim. Sci.* 42, 893-900.
- Edwards, L.M., Rahe, C.H., Griffen, J.L., Wolfe, D.F., Marple, D.N., Cummins, K.A., Prichet, J.F., 1987. Effect of transportation stress on ovarian function in superovulated Hereford heifers. *Theriogenology* 28, 291-299.
- Eppig, J.J., 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 122, 829-838.

- Eppleston, J., Bilton, R.J., Moore, N.W., 1984. Effects of FSH dose and treatment regime on ovulatory response in sheep. *Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol.* 16, 68.
- Evans, G., Armstrong, D.T., 1984. Reduction of sperm transport in ewes by superovulation treatments. *J. Reprod. Fertil.* 70, 47-53.
- Evans, A.C., Duffy, P., Hynes, N., Boland, M.P., 2000. Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. *Theriogenology* 53, 699-715.
- Evans, A.C.O., Flynn, J.D., Quinn, K.M., Duffy, P., Quinn, P., Madgwick, S., Crosby, T.F., Boland, M.P., Beard, A.P., 2001. Ovulation of aged follicles does not affect embryo quality or fertility after a 14-day progestagen estrus synchronization protocol in ewes. *Theriogenology* 56, 923-936.
- FAO, FAOSTAT Database Collections.
- Fawcett, D.W., Long, J.A., Jones, A.L., 1969. The ultrastructure of endocrine glands. *Rec. Prog. Horm. Res.* 25, 315-368.
- Fernández Abella, D., 1993. *Principios de fisiología reproductiva ovina.* Universidad de la República, pp. 247.
- FLA, Federación Lanera Argentina. Estadísticas laneras, Estimaciones de Producción de Lanas. Internet: [www.flasite.com](http://www.flasite.com)
- Forcada, F., Lozano, J.M., Abecia, J.A., Zúñiga, O., 2000. Repeated superovulation of high prolificacy Rasa Aragonesa ewes before culling as an inexpensive way to obtain high quality embryos. *Livest. Prod. Sci.* 66, 263-269.
- Forcada, F., Abecia, J.A., Cebrián-Pérez, J.A., Muiño-Blanco, M.T., Valares, J.A., Palacín, I., Casao, A., 2006. The effect of melatonin implants during the seasonal anestrus on embryo production after superovulation in aged high-prolificacy Rasa Aragonesa ewes. *Theriogenology* 65, 356-365.

- Fort, M.C., Suárez, V.H., Bedotti, D.O., 1992. Variación estacional de la actividad ovárica de dos razas ovinas en la región semiárida pampeana. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 12, 185-192.
- Fortune, J.E., 2002. Activation of primordial follicles. In: Eppig J, Hegele-Hartung CH, Lessl M (Eds.) *The future of the oocyte basic and clinical aspects.* Springer. Nueva York, EEUU. pp. 11-21.
- Fuki, Y., Kano, H., Kobayashi, M., Tetsura, M., Ono, H., 1985. Response to repeated superovulation treatment in the ewe. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 31, 155-157.
- Fukui, Y., Okada, M., Ishida, N., 1998. Incidence of premature luteal regression in ewes superovulated with a single injection of Follicle-Stimulating Hormone combined with Equine Chorionic Gonadotropin. *J. Reprod. Dev.* 44, 407-412.
- Garverick, H.A., Zollers, W.G., Smith, M.F., 1992. Mechanisms associated with corpus luteum lifespan in animals having normal or subnormal luteal function. *Anim. Reprod. Sci.* 28, 111-124.
- Gherardi, P.B., Lindsay, D.R., 1980. The effect of season on the ovulatory response of Merino ewes to serum from pregnant mares. *J. Reprod. Fertil.* 60, 425-429.
- Gibbons, J.R., Wiltbank, M.C., Ginther, O.J., 1997. Functional interrelationships between follicles greater than 4 mm and the follicle-stimulating hormone surge in heifers. *Biol. Reprod.* 57, 1066-1073.
- Ginther, O.J., Kot, K., Wiltbank, M.C., 1995. Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. *Theriogenology* 43, 689-703.
- Ginther, O.J., Wiltbank, M.C., Fricke, P.M., Gibbons, J.R., Kot, K., 1996. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol. Reprod.* 55, 1187-1194.

- Ginther, O.J., Kot, K., Kulic, L.J., Wiltbank, M.C., 1997. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. *Theriogenology* 48, 75-87.
- González-Bulnes, A., Santiago-Moreno, J., Cocero, M.J., López-Sebastián, A., 2000. Effects of FSH commercial preparation and follicular status on follicular growth and superovulatory response in Spanish Merino ewes. *Theriogenology* 54, 1055-1064.
- Gonzalez-Bulnes, A., Santiago-Moreno, J., Cocero, M.J., Souza, C.J.H., Groome, N.P., Garcia-Garcia, R.M., Lopez-Sebastian, A., Baird, D.T., 2002a. Measurement of inhibin A and follicular status predict the response of ewes to superovulatory FSH treatments. *Theriogenology* 57, 1263-1272.
- Gonzalez-Bulnes, A., Garcia-Garcia, R.M., Souza, C.J.H., Santiago-Moreno, J., Lopez-Sebastian, A., Cocero, M.J., Baird, D.T., 2002b. Patterns of follicular growth in superovulated sheep and influence on endocrine and ovarian response. *Reprod. Dom. Anim.* 37, 357-361.
- Gonzalez-Bulnes, A., Garcia-Garcia, R.M., Castellanos, V., Santiago-Moreno, J., Ariznavarreta, C., Domínguez, V., 2003. Influence of maternal environment on the number of transferable embryos obtained in response to superovulatory FSH treatments in ewes. *Reprod. Nutr. Dev.* 43, 17-28.
- González-Bulnes, A., Baird, D.T., Campbell, B.K., Cocero, M.J., García-García, R.M., Inskeep, E.K., López-Sebastián A., McNeilly, A.S., Santiago-Moreno, J., Souza, C.J.H., Veiga-López, A., 2004. Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. *Reprod. Fertil. Dev.* 16, 421-435.
- González-Menció F., Manns, J., Murphy, B.D., 1978. FSH and LH activity of PMSG from mares at different stages of gestation. *Anim. Reprod. Sci.* 1, 137-144.
- González-Reyna, A., Márquez-García, E., Lizárraga-Tracy, H., Martínez-González, J.C., 1999. Dose response effects of PMSG on ovulation rate



and follicular development in Pelibuey ewes treated with Syncro-mate-B implants. *Small Rumin. Res.* 31, 149-155.

Goodman, R.L., 1988. Neuroendocrine control of the ovine estrous cycle. In: *The Physiology of Reproduction, 1929-1969*. E. Knobil and J.D. Neil, Raven Press, New York., USA.

Goodman, R.L., 1994. Neuroendocrine control of the ovine estrous cycle. In: *The Physiology of Reproduction (Editors: E. Knobil and JD Neill)*, 2nd Edition. Raven Press, New York. pp 660-693.

Goodman, R.L., Karsch, F.J., 1980. Pulsatile secretion of luteinizing hormone. Differential suppression by ovarian steroids. *Endocrinology* 107, 1286-1292.

Grazul-Bilska, A.T., Kirsch, J.D., Bilski, J.J., Kraft, K.C., Windorski, E.J., Luther, J.S., Vonnahme, K.A., Reynolds, L.P., Redmer, D.A., 2007. Superovulation in sheep: number and weight of the corpora lutea and serum progesterone. *Sheep & Goat Res. J.* 22, 26-31.

Greve, T., Callesen, H., Hyttel, P., 1995. The effects of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology* 43, 41-50.

Gulyani, R., Naqvi, S.M.K., 1994. Superovulation in sheep: the effect of gonadotrophic preparation. In: *Proceedings of the National Symposium on Health Care, University of Rajasthan, Jaipur, India, 4-6 February, 1994*, 143 pp. (abstr.).

Hafez, E.S.E., 1952. Studies on the breeding season and reproduction in the ewe. *J. Agril. Sci.* 42,189-265.

Hafez, E.S.E., 1987. *Reproduction in farm animals*. Fifth Edition. (Eds.) Philadelphia, Lea & Febiger.

Haisenleder, D.J., Dalkin, A.C., Marshall, J.C., 1994. Regulation of gonadotropin gene expression. In: *The Physiology of Reproduction (Editors: E. Knobil and J.D. Neill)*, 2nd Edition. Raven Press, New York. pp 1793-1814.

- Hare, W.C.D., 1986. Diseases transmissible by semen and embryo transfer. Office International des Epizooties, 12 rue de Prony, F-75017 Paris. 90 pp.
- Hare, W.C.D., Seidel, S.M., 1987. Proceedings of the International Embryo Movement Symposium, 19 August 1987, Montreal. Champaign, IL, International Embryo Transfer Society. 198 pp.
- Haresign, W., 1985. The physiological basis for variation in ovulation rate and litter size in sheep: A review. *Livest. Prod. Sci.* 13, 3-20.
- Henderson, K.M., Weaver, A., Wards, R.L., Ball, K., Lun, S., Mullin, C., McNatty, K.P., 1990. Oocyte production and ovarian steroid concentrations of immature rats in response to some commercial gonadotrophin preparations. *Reprod. Fertil. Dev.* 2, 671-682.
- Hild-Petito, S., Ottobre, A.C., Hoyer, P.B., 1987. Comparison of subpopulations of luteal cells obtained from cyclic and superovulated ewes. *J. Reprod. Fertil.* 80, 537-544.
- Hirshfield, A.N., 1991. Development of follicles in the mammalian ovary. *Inter. Rev. Cyt.* 124, 43-101.
- Hockley, D.K., Bo, G.A., Palasz, A.T., Del Campo, M.R., Mapletoft, R.J., 1992. Superovulation with a single subcutaneous injection of Folltropin in the cow: effect of dose and site of injection. *Theriogenology* 37, 224 (Abstract).
- Hsueh, A.J., Adashi, E.Y., Jones, P.B., Welsh, T.H., 1984. Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocrinology Review* 5, 76-127.
- Hunter, M.G.: Characteristics and causes of the inadequate corpus luteum. *J. Reprod. Fertil. (Suppl43):* 77-89, 1991.
- IETS, Internacional Embryo Transfer Society. Internet: <http://www.iets.org>
- IETS, International Embryo Transfer Society, 1987. Manual. 309 W. Clark Street, Champaign, IL 61820. 87 pp.

INDEC, Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. Internet:  
<http://www.indec.mecon.ar>

Irazoqui, H., Menvielle, E.E., 1982. Ovulation rate of Corriedale ewes at Bahía Blanca, Argentina. *Anim. Prod.* 35, 313-320.

Ireland, J.J., Roche, J.F., 1983. Development of non ovulatory antral follicles in heifers: changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotropins. *Endocrinology* 112, 150-156.

Jabbour, H.N., Evans, G., 1991a. Ovarian and endocrine response of Merino ewes to treatment with PMSG and/or FSH-p. *Anim. Reprod. Sci.* 26, 93-106.

Jabbour, H.N., Evans, G., 1991b. Ovarian and endocrine responses of Merino ewes following treatment with PMSG and GnRH or PMSG antiserum. *Anim. Reprod. Sci.* 24, 259-270.

Jabbour, H.N., Ryan, J.P., Evans, G., Maxwell, W.M.C, 1991. Effects of season, GnRH administration and lupin supplementation on the ovarian and endocrine responses on Merino ewes treated with PMSG and FSH-P to induce superovulation. *Reprod. Fertil. Dev.* 3, 699-707.

Kakar, M.A., Maddocks, S., Lorimer, M.F., Kleemann, D.O., Rudiger, S.R., Hartwich, K.M., Walker, S.K., 2005. The effect of peri-conception nutrition on embryo quality in the superovulated ewe. *Theriogenology* 64, 1090-1103.

Kanayama, K., Sankai, T., Nariai, K., Endo, T., Sakuma, Y., 1994. Simplification of superovulation induction by using polyvinylpyrrolidone as a solvent for FSH in rabbits. *J. Vet. Med. Sci.* 56, 599-600.

Karsch, F.J., 1984. Endocrine Control of LH secretion during the estrous cycle of sheep. *Proc. 10th International Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination.* 4, 1-9.

- Karsch, F.J., Bittman, E.L., Foster, D.L., Goodman, R.L., Legan, S.J., Robinson, J.E., 1984. Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. *Rec. Prog. Horm. Res.* 40, 185-225.
- Karsch, F.J., Robinson, J.E., Woodfill, C.J.I., Brown, M.B., 1989. Circannual cycles of luteinizing hormone and prolactin secretion in ewes during a prolonged exposure to a fixed photoperiod: evidence for an endogenous reproductive rhythm. *Biol. Reprod.* 41, 1034-1046.
- Karsch, F.J., Bowen, J.M., Caraty, A., Evans, N.P., Moenter, S.M., 1997. Gonadotropin-releasing hormone requirements for ovulation. *Biol. Reprod.* 56, 303-309.
- Kelly, P., Duffy, P., Roche, J.F., Boland, M.P., 1997. Superovulation in cattle: effect of FSH type and method of administration on follicular growth, ovulatory response and endocrine patterns. *Anim. Reprod. Sci.* 46, 1-14.
- Keyes, P.L., Gadsby, J.E., Yuh, K.C., Bill, C.H., 1983. The corpus luteum. *Int. Rev. Physiol.* 27, 57-97.
- King, K.K., Seidel, G.E. Jr., Elsdon, R.P., 1985. Bovine embryo transfer pregnancies: I. Abortion rates and characteristics of calves. *J. Anim. Sci.* 61, 747-757.
- Ko, J.C., Kastelic, J.P., Del Campo, M.R., Ginther, O.J., 1991. Effects of a dominant follicle on ovarian follicular dynamics during the oestrous cycle in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 91, 511-519.
- Kojima, N., Stumpf, T.T., Cupp, A.S., Werth, L.A., Roberson, M.S., Wolfe, M.W., Kittok, R.J., Kinder, J.E., 1992. Exogenous progesterone and progestins as used in estrous synchrony regimens do not mimic the corpus luteum in regulation of luteinizing hormone and 17 beta-estradiol in circulation of cows. *Biol. Reprod.* 47, 1009-1017.

- Kuo, T.T., Hsueh, S., 1984. Mucicarminophilic histiocytosis: a polyvinylpyrrolidone (PVP) storage disease simulating signet ring carcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 8, 419.
- Lajous, D., Joly, T., Baril, G., Cognié, Y., Beckers, J.F., 1997. Superovulatory response and quality of embryos recovered from Romanov ewes after a single injection of pFSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. In: *Proceedings of the 13th Meeting Ass. Eur. Trans. Emb. (AETE)*, p. 166 [abstract].
- Laster, D.B., 1972. Disappearance and uptake of  $^{125}\text{I}$  FSH in the rat, rabbit, ewe and cow. *J. Reprod. Fertil.* 30, 407-415.
- Ledda, S., Naitana, S., Cappal, P., Branca, A., Lol, P., Forcada, F., Abecia, J.A., Zarazaga, L., 1992. Efecto del tratamiento PMSG+FSHp sobre la superovulación en ovejas de raza Sarda y raza Aragonesa. *VI Jornadas Internacionales de Reproducción Animal e Inseminación Artificial*, pp. 298-303.
- Legan, S.J., Karsch, F.J., 1979. Neuroendocrine regulation of the estrous cycle and seasonal breeding in the ewe. *Biol. Reprod.* 20, 74-85.
- Leoni, G., Bogliolo, L., Pintus, P., Ledda, S., Naitana, S., 2001. Sheep embryos derived from FSH/eCG treatment have a lower in vitro viability after vitrification than those derived from FSH treatment. *Reprod. Nutr. Dev.* 41, 239-246.
- Leyva, V., Buckrell, B.C., Walton, J.S., 1998. Regulation of follicular activity and ovulation in ewes by exogenous progestagen. *Theriogenology* 50, 395-416.
- Lindsell, C.E., Murphy, B.D., Mapletoft, R.J., 1986. Superovulation and endocrine responses in heifers treated with FSH-P at different stages of the estrous cycle. *Theriogenology* 26, 209-219.
- Lopes Junior, E.S., Maia, E.L.M.M., Paula, N.R.O., Teixeira, D.I.A., Villarroel, A.B.S., Rondina, D., Freitas, V.J.F., 2006. Effect of age of donor on embryo

- production in Morada Nova (white variety) ewes participating in a conservation programme in Brazil. *Trop. Anim. Health Prod.* 38, 555-561.
- Lopez-Diaz, M.C., Bosu, W.T.K., 1992. A review and an update of cystic ovarian degeneration in ruminants. *Theriogenology* 37, 1163-1183.
- López-Sebastián, A., Gómez-Brunet, A., Lishman, A.W., Johson, S.K., Inskip, E.K., 1993. Modification by propylene glycol of ovulation rate in response to a single injection of FSH. *J. Reprod. Fertil.* 99, 437-442.
- Lopez-Sebastian, A., Gonzalez de Bulnes, A., Santiago Moreno, J., Gomez-Brunet, A., Townsend, E.C., Inskip, E.K., 1997. Patterns of follicular development during the estrous cycle in monovular Merino del Pais ewes. *Anim. Reprod. Sci.* 48, 279-291.
- López-Sebastián, A., González de Bulnes, A., Santiago Moreno, J., Gómez Brunet, A., Townsend, E.C., Inskip, E.K., 1999. Effects of follicular status at treatment on follicular development and ovulation in response to FSH in Spanish Merino ewes. *Theriogenology* 52, 505-514.
- Lozano, J.M., Lonergan, P., Boland, M.P., 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.
- Lymberopoulos, A.G., Amiridis, G.S., Kühholzer, B., Besenfelder, U., Christodoulou, V., Vainas, E., Brem, G., 2001. Fertilization and embryo recovery rates in superovulated Chios ewes after laparoscopic intrauterine insemination. *Theriogenology* 55, 1855-1862.
- Marshall, F.H.A., 1904. The oestrous cycle and the formation of the corpus luteum in the sheep. *Philos. Trans. R. Soc. L., Ser. B* 196, 47-97.
- Marshall, F.H.A., 1937. On change over in oestrous cycle in animals after transference across equator, with further observations on incidence of

- breeding season and factors controlling sexual periodicity. *Proc. R. Soc. Lond., Ser. B* 12, 413-428.
- Martemucci, G., D'Alessandro, A., Toteda, F., Facciolongo, A.M., Gambacorta, M., 1995. Embryo production and endocrine response in ewes superovulated with PMSG, with or without monoclonal anti-PMSG administered at different times. *Theriogenology* 44, 691-703.
- Maurer, R.R., 1988. Superovulation with FSH in Dorset and Suffolk ewes. *Proceedings of the 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination; 1988 June 26-30; Dublin, Ireland. Dublin, Ireland: University College Dublin. p. 174-175.*
- Maxwell, W.N.C., Wilson, H.R., 1989. Superovulation and embryo recovery in ewes treated with a single injection of PMSG and FSH-P. *Proc. Austr. Soc. Reprod. Biol.* 21, 50 (abstract).
- McCracken, J.A., Schramm, W., Okulicz, W.C., 1984. Hormone receptor control of pulsatile secretion of PGF<sub>2</sub>alpha from the ovine uterus during luteolysis and its abrogation in early pregnancy. *Anim. Reprod. Sci.* 7, 31-55.
- McDonald, L.E., 1991. *Veterinaria: Reproducción y Endocrinología. 6<sup>º</sup> Ed. México D.F., pp. 294-344.*
- McEvoy, T.G., Robinson, J.J., Aitken, R.P., Robertson, I.S., 1996. The effect of time of intrauterine insemination on the development and viability of embryos collected from superovulated ewes. *Theriogenology* 46, 727-738.
- McIntosh, J.E., Moor, R.M., Allen, W.R., 1975. Pregnant mare serum gonadotrophin: rate of clearance from the circulation of sheep. *J. Reprod. Fertil.* 44, 95-100.
- McKelvey, W.A.C., Robinson, J.J., Aitken, R.P., Robertson, I.S., 1986. Repeated recoveries of embryos from ewes by laparoscopy. *Theriogenology* 25, 855-865.

- McNatty, K.P., 1981. Changes in the concentration of gonadotropic and steroidal hormones in antral follicular fluid of ovarian follicles throughout the estrous cycle of the sheep. *Aust. J. Biol. Sci.* 34, 67-80.
- McNatty, K.P., Hudson, N.L., Henderson, K.M., Lun, S., Heath, D.A., Gibb, M., Ball, K., McDiarmid, J.M., Thurley, D.C., 1984. Changes in gonadotropin secretion and ovarian antral follicular activity in seasonally breeding sheep throughout the year. *J. Reprod. Fertil.* 70, 309-321.
- McNatty, K.P., Lun, S., Heath, D.A., Ball, K., Smith, P., Hudson, N.L., McDiarmid, J.M., Gibb, M., Henderson, K.M., 1986. Differences in ovarian activity between Booroola x Merino ewes which are homozygous, heterozygous and non carriers of a major gene influencing their ovulation rate. *J. Reprod. Fertil.* 77, 193-205.
- McNeilly, A.S., Picton, H.M., Campbell, B.K., Baird, D.T., 1991. Gonadotrophic control of follicle growth in the ewe. *J. Reprod. Fertil. Supplement* 43, 177-186.
- Meléndez Guerrero, B., Pérez Espejo, G.A., Siles Cadillá, J., Rufo Castaño, M.C., Miralles Sanchos, J., Nevado Santos, M., 1997. Granuloma frente a polivinilpirrolidona. <http://www.conganat.org/icongreso/comunic/com077>
- Miller, K.F., Nordheim, E.V., Ginther, O.J., 1981. Periodic fluctuations in FSH concentrations during ovine estrous cycle. *Theriogenology* 16, 669-679.
- Misra, A.K., Chaubal, S.A., Krishna Kishore, G., Rajeshwaran, S., Joshi, B.V., Jaiswal, R.S., 1992. Superovulatory response to single subcutaneous injection of Follitropin in Holstein and Sahiwal cows. *Theriogenology* 37, 260 (Abstract).
- Mitchell, L.M., Dingwall, W.S., Mylne, M.J.A., Hunton, J., Matthews, K., Gebbie, F.E., McCallum, G.J., McEvoy, T.G., 2002. Season affects characteristics of the pre-ovulatory LH surge and embryo viability in superovulated ewes. *Anim. Reprod. Sci.* 74,163-174.



- Montgomery, G.W., Galloway, S.M., Davis, G.H., McNatty, K.P., 2001. Genes controlling ovulation rate in sheep. *Reproduction* 121, 843-852.
- Moor, R.M., Osborn, J.C., Crosby, I.M., 1985. Gonadotrophin induced abnormalities in sheep oocytes after superovulation. *J. Reprod. Fertil.* 74, 167-172.
- Moore, J.W., Shelton, J.N., 1964. Egg transfer in sheep, effect of degree of synchronization between donor and recipients, age of egg, and site of transfer on the survival of transferred eggs. *J. Reprod. Fertil.* 7, 145-152.
- Moore, L.G., Chie, W.N., Hudson, N.L., McNatty, K.P., 2000. Isoforms and half-life of FSH from sheep with different reproductive states. *J. Endocrinology* 165, 185-192.
- Mossa, F., Duffy, P., Naitana, S., Lonergan, P., Evans, A.C.O., 2007. Association between numbers of ovarian follicles in the first wave and superovulatory response in ewes. *Anim. Reprod. Sci.* 100, 391-396.
- Müeller, J., 1993. Utilización de la inseminación artificial y la superovulación con transferencia de embriones en el mejoramiento genético de ovinos. *Comunicación Técnica INTA EEA Bariloche PA N° 323*, 7p.
- Müeller, J., 1998. Producción de ovinos en el contexto del Mercosur. 2º Simposio nacional de mejoramiento Animal. Uberada, Brasil. pp. 19-27.
- Müeller, J., 2005. Introducción a la producción ovina Argentina. En: *Corriedale, Anuario 2005*. pp. 14-20.
- Mufti, A.M., Wani, G.M., Wani, N.A., Mir, M.M., Khan, M.Z., 1997. Superovulatory response in Corriedale sheep during different months of the breeding season. *Small Rumin. Res.* 25, 181-184.
- Murphy, B.D., Mapletoft, R.J., Manns, J., Humphries, W.D., 1984. Variability in gonadotrophin preparations as a factor in the superovulatory response. *Theriogenology* 21, 117-125.

- Murray, J.F., Downing, J.A., Scaramuzzi, R.J., Evans, G., 1994. Heterogeneity in ovarian steroid secretion response to treatment with PMSG in ewes during the breeding season and anestrus. *Theriogenology* 42, 1337-1347.
- Mutiga, E.R., Baker, A.A., 1982. Superovulatory response in Merino ewes to three PMSG dose levels. *Theriogenology* 17, 100 (Abstract).
- Naqvi, S.M.K., Gulyani, R., 1998. The effect of gonadotrophin releasing hormone and follicle stimulating hormone in conjunction with pregnant mare serum gonadotrophin on the superovulatory response in crossbred sheep in India. *Trop. Anim. Health. Prod.* 30, 369-376.
- Naqvi, S.M.K., Gulyani, R., 1999. Ovarian response and embryo recovery to different superovulatory regimens in Rambouillet ewes under semiarid conditions. *Small Rumin. Res.* 34, 127-131.
- Naqvi, S.M.K., Anil Joshi, G.K. Das, Mittal, J.P., 2001. Development and application of ovine reproductive technologies: an Indian experience. *Review. Small Rumin. Res.* 39, 199-208.
- Nicholas, F.W., Smith, C., 1983. Increased rates of genetic change in dairy cattle by embryo transfer and splitting. *Anim. Prod.* 36, 341-353.
- Nöel, B., Bister, J.L., Pierquin, B., Paquay, R., 1994. Effects of FGA and PMSG on follicular growth and LH secretion in Suffolk ewes. *Theriogenology* 41, 719-727.
- O'Callaghan, D., Roche, J.F., Karsch, F.J., 1987. Endocrine causes of seasonality in the ewe. *Proc. 38th Annual Meeting of the European Association for Animal Production.*(abst) 2, 902.
- OIE, Office International des Epizooties. Internet : <http://www.oie.int>
- Okada, M., Ishida, N., Ogiso, T., Itagaki, R., Ishikawa, D., Fukui, Y., 1999. Effect of dosage of Equine Chorionic Gonadotropin combined with a single injection of porcine Follicle-Stimulating Hormone for superovulation treatment in ewes. *J. Reprod. Dev.* 45, 307-313.

- Okada, A., Kamada, S., Jeon, C., Miyamoto, A., Fukui, Y., 2000. Incidence of abnormal corpus luteum in superovulated ewes. *J. Reprod. Dev.* 46, 397-402.
- Oyedipe, E.O., Pathiraja, N., Gyang, E.O., 1989. Effect of dose of pregnant mare serum gonadotrophin on estrus parameters, ovulation rate and peripheral progesterone concentrations in Yankasa ewes. *Anim. Reprod. Sci.* 20, 255-264.
- Padrón, D.R.S., 1990. Temas de reproducción femenina. Editorial Científico Técnica. Ciudad de la Habana. p. 17-34.
- Peckham, W.D., Yamaji, T., Dierschke, D.J., Knobil, E., 1973. Gonadal function and the biological and physicochemical properties of follicle stimulating hormone. *Endocrinology* 92, 1660-1666.
- Pelletier, J., Thimonier, J., 1975. Interactions between ovarian steroids or progestagens and LH release. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 15, 131-146.
- Perdigón, F., Sosa, L., Cavestany, D., 1997. Duración de la estación de cría en ovejas Corriedale en Uruguay. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 17, Sup. 1, 257-258 (Abstr.).
- Pérez Álvarez, E., Methol, R., Coronel, F., 1989. Apuntes de lanares y lanas. Razas. Secretariado Uruguato de la Lana, Dpto. de Mejoramiento Ovino (Ed.).
- Phillips, D.J., Hudson, N.L., Lun, S., Condell, L.A., McNatty, K.P., 1993. Biopotency in vitro and metabolic clearance rates of five pituitary preparations of follicle stimulating hormone. *Reprod. Fertil. Dev.* 5, 181-190.
- Philpott, M., 1993. The dangers of disease transmission by artificial insemination and embryo transfer. *Br. Vet. J.* 149, 339-369.
- Picazo, A.R., López, S.A., 1995. Desarrollo folicular en el ovario de la especie ovina. *Producción y Sanidad Animal* 10, 77-93.

- Picazo, R.A., Cocero, M.J., Barragan, M.L., Sebastian, A.L., 1996. Effects of LH administration at the end of an FSH superovulatory regimen on ovulation rate and embryo production in three breeds of sheep. *Theriogenology* 45, 1065-1073.
- Picton, H.M., McNeilly, A.S., 1991. Evidence to support a follicle-stimulating hormone threshold theory for follicle selection in ewes chronically treated with gonadotrophin-releasing hormone agonist. *J. Reprod. Fertil.* 93, 43-51.
- Picton H.M., Tsonis C.G., McNeilly A.S., 1990. The antagonistic effect of exogenous LH pulses on FSH-stimulated preovulatory follicle growth in ewes chronically treated with a gonadotrophin-releasing hormone agonist. *J. Endocrinol.* 127, 273-283.
- Polivinilpirrolidona. Internet: <http://es.wikipedia.org/wiki/Polivinilpirrolidona>.
- Ptak, G., Dattena, M., Loi, P., Tischner, M., Cappai, P., 1999. Ovum pick-up in sheep: efficiency of in vitro embryo production, vitrification and birth of offspring. *Theriogenology* 52, 1105-1114.
- Ptak, G., Clintond, M., Barbonib, B., Muzzeddue, M., Cappai, P., Tischner, M., Loi, P., 2002. Preservation of the wild European Mouflon: The first example of genetic management using a complete program of reproductive biotechnologies. *Biol. Reprod.* 66, 796-801.
- Quirke, J.F., Hanrahan, J.P., Gosling, J.P., 1979. Plasma progesterone levels throughout the oestrous cycle and release of LH at oestrus in sheep with different ovulation rates. *J. Reprod. Fertil.* 55, 37-44.
- Ravindra, J.P., Rawlings, N.C., 1997. Ovarian follicular dynamics in ewes during the transition from anoestrus to the breeding season. *J. Reprod. Fertil.* 110, 279-289.
- Rexroad, C.E. Jr., Powell, A.M., 1991. FSH injections and intrauterine insemination in protocols for superovulation of ewes. *J. Anim. Sci.* 69, 246-251.

- Richards, J.S., Midgley, A.R., 1976. Protein hormone action: a key to understanding ovarian follicular and luteal cell development. *Biol. Reprod.* 14, 82-94.
- Riesenberg, S., Meinecke-Tillmann, S., Meinecke, B., 2001. Ultrasonic study of follicular dynamics following superovulation in German Merino ewes. *Theriogenology* 55, 847-876.
- Robinson, T.J., 1964. Synchronisation of oestrus in sheep by intravaginal and subcutaneous application of progestin impregnated sponges. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.* 8, 47-49.
- Robinson, T.J., 1965. Use of progestagen-impregnated sponges inserted intravaginally or subcutaneously for control of the oestrous cycle in the sheep. *Nature* 206, 39-41.
- Rodríguez Iglesias, R.M., Ciccioli, N.H., Irazoqui, H., 1991. Tratamiento de ovejas cíclicas con esponjas intravaginales impregnadas de progestágeno. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 11, 51-55.
- Rosas, J., Zarco, L., Valencia, J., 1995. Efecto de un tratamiento corto de somatotropina bovina recombinante (rbST) sobre la función lútea y el desarrollo embrionario temprano en la oveja superovulada. *Memorias de la Reunión Nacional de Investigación Pecuaria; Vet. Méx.* 1995; 26, 338.
- Rosell Pardo, R., Llorente Villa, R., Ramírez Rubio, A., Verdecia Rondon, M., Hernández Torres, E., 2004. Regulación neuroendocrina del ciclo estral en los animales domésticos. <http://www.veterinaria.org>, *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*, 5 (7).
- Rowson, L.E.A., Moor, R.M., 1966. Embryo transfer in the sheep: The significance of synchronizing oestrus in the donor and recipient animal. *J. Reprod. Fertil.* 11, 207-212.

- Rubianes, E., Ibarra, D., Ungerfeld, R., De Castro, T., Carbahal, B., 1995. Superovulatory response in anoestrous ewes is affected by the presence of a large follicle. *Theriogenology* 43, 465-474.
- Rubianes, E., Ungerfeld, R., Ibarra, D., 1996. Serum anti-eCG improves luteal function increases ova/embryos recovery in eCG-superovulated ewes. *Small Rumin. Res.* 21, 105-111.
- Rubianes, E., Ungerfeld, R., Viñoles, C., Rivero, A., Adams, G.P., 1997. Ovarian response to gonadotrophin treatment initiated relative to wave emergence in ultrasonographically monitored ewes. *Theriogenology* 47, 1479-1488.
- Russel, A. 1991. Body condition scoring of sheep. In: E. Boden (Ed.) *Sheep and Goat Practice*. p 3. Bailliere Tindall, Philadelphia.
- Ryan, J.P., Bilton, R.J., Hunton, J.R., 1984. Superovulation of ewes with a combination of PMSG and FSH-P. In: D.R. Lindsay and D.T. Pearce (Editors), *Reproduction in the sheep*. Australian Academy of Science, Canberra, pp. 338-341.
- Ryan, J.P., Hunton, J.R., Maxwell, W.M.C., 1991. Increased production of sheep embryos following superovulation of Merino ewes with a combination of pregnant mare serum gonadotrophin and follicle stimulating hormone. *Reprod. Fertil. Dev.* 3, 551-560.
- Sábato, H., 1989. Capitalismo y ganadería en Buenos Aires: La fiebre del lanar 1850 -1890. En: *Sudamericana* (Ed), Buenos Aires, Argentina.
- SAGPyA (a), Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. Ganadería, Ovinos, Boletín de información ovina. Internet: <http://www.sagpya.mecon.gov.ar>
- SAGPyA (b), Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. Ganadería, Ovinos, Genética. Internet: <http://www.sagpya.mecon.gov.ar>
- Saharrea, M.A., 1995. Efecto de la administración de hormona liberadora de gonadotropinas o gonadotropina coriónica humana 84 horas después de

iniciado el estro sobre la luteinización de los folículos anovulatorios (tesis de maestría). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

- Salamonsen, L.A., Jonas, H.A., Burger, H.G., Buckmaster, J.M., Chamley, W.A., Cumming, I.A., Findlay, J.K., Goding, J.R., 1973. A heterologous radioimmunoassay for folliculo-stimulating hormone: application to measurement of FSH in the ovine estrous cycle and in several other species including man. *Endocrinology* 93, 610-618.
- Samartzi, F., Belibasaki, S., Vainas, E., Boscós, C., 1995a. Plasma progesterone concentration in relation to ovulation rate and embryo yield in Chios ewes superovulated with PMSG. *Anim. Reprod. Sci.* 39, 11-21.
- Samartzi, F., Boscós, C., Vainas, E., Tsakalof, P., 1995b. Superovulatory response of Chios sheep to PMSG during spring and autumn. *Anim. Reprod. Sci.* 39, 215-222.
- Sánchez, H.E., Alberio, R., Burges, J., 1994. Actividad sexual y tasa ovulatoria mensual de ovejas Romney Marsh y Corriedale en el sudeste bonaerense. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 14, 114 (Abstract).
- SAS Institute Inc., 1999. SAS/STAT. Software version 8, Cary NC, USA.
- Satoh, H., Numabe, T., Takada, T., Oikawa, T., Kifune, A., Watanabe, G., Taya, K., 1996. Superovulation in Japanese beef cows using polyvinylpyrrolidone (PVP) as the vehicle for porcine FSH (pFSH). *Theriogenology* 45, 332 (Abstract).
- Saumande, J., 1990. Culture of bovine granulosa cells in a chemically defined serum free medium. The effect of insulin and fibronectin on the response to FSH. *J. Steroid Biochem.* 38, 189-196.
- Saumande, J., Chupin, D., 1986. Induction of superovulation in cyclic heifers: the inhibitory effect of large doses of PMSG. *Theriogenology* 25, 233-247.

- Scaramuzzi, R.J., Adams, N.R., Baird, D.T., Campbell, B.K., Downing, J.A., Findlay, J.K., 1993. A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reprod. Fertil. Dev.* 5, 459-478.
- Schiewe, M.C., Howard, J.G., Goodrowe, K.L., Stuart, L.D., Wildt, D.E., 1990. Human menopausal gonadotropin induces ovulation in sheep, but embryo recovery after prostaglandin F<sub>2a</sub> synchronization is compromised by premature luteal regression. *Theriogenology* 34, 469-486.
- Schiewe, M.C., Fitz, T.A., Brown, J.L., Stuart, L.D., Wildt, D.E., 1991. Relationship of oestrus synchronization method, circulating hormones, luteinizing hormone and prostaglandin F-2 alpha receptors and luteal progesterone concentration to premature luteal regression in superovulated sheep. *J. Reprod. Fertil.* 93, 19-30.
- Schrick, F.N., Surface, R.A., Pritchard, J.Y., Dailey, R.A., Townsend, E.C., Inskeep, E.K., 1993. Ovarian structures during the estrous cycle and early pregnancy in ewes. *Biol. Reprod.* 49, 1133-1140.
- Seidel, G.E., Seidel, S.M., 1991. Training manual for embryo transfer in cattle. Ed. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), FAO Animal Production and Health, Paper 77, Rome, 1991.
- Sharma, V.K., Gupta, R.C., Khar, S.K., Khurana, N.K., 1993. Plasma progesterone profiles, ovarian response and embryo recovery in crossbreed ewes superovulated during breeding and non-breeding seasons. *Anim. Reprod. Sci.* 34, 119-126.
- Silvia, W.J., Lewis, G.S., McCracken, J.A., Thatcher, W.W., Wilson, L., 1991. Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin F<sub>2alpha</sub> during luteolysis in ruminants. *Biol. Reprod.* 45, 655-663.
- Sirois, J., Fortune, J.E., 1988. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol. Reprod.* 39, 308-317.



- Smeaton, T.C., Robertson, H.A., 1971. Studies on the growth and atresia of graafian follicles in the ovary of the sheep. *J. Reprod. Fertil.* 25, 243-252.
- Smith, C.L., 1984. Dose effect of follicle stimulating hormone for superovulation of crossbred Targhee ewes. *Theriogenology* 21, 262 (Abstract)
- Smith, L.E.Jr., Sitton, G.D., Vincent, C.K., 1973. Limited injections of follicle stimulating hormone for multiple births in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 37, 523-527.
- Souza, C.J., Campbell, B.K., Baird, D.T., 1998. Follicular waves and concentrations of steroids and inhibin A in ovarian venous blood during the luteal phase of the oestrous cycle in ewes with an ovarian autotransplant. *J. Endocrinol.* 156, 563-572.
- Spearow, J.L., Trost, B.A., 1987. Development of a sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for cattle, sheep, rat and mouse luteinizing hormone. *Biol. Reprod.* 37, 595-605.
- SRA, Sociedad Rural Argentina. Internet: <http://www.sra.org.ar>
- Stellflug, J.N., Weems, Y.S., Weems, C.W., 1997. Clinical reproductive physiology of ewes. In: *Current therapy in large animal. Theriogenology*, 594-598. W.B. Saunders Company (Editors).
- Stringfellow, D.A. 1985. The potential of bovine embryo transfer for infectious disease control. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.*, 4, 859-866.
- Sugano, M., Shinogi, T., 1999. Superovulation induction in Japanese Black cattle by a single intramuscular injection of hMG or FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Anim. Reprod. Sci.* 31, 175-181.
- Suzuki, T., Yamamoto, M., Ooe, M., Takagi, M., 1994. Superovulation of beef cows and heifers with a single injection of FSH diluted in polyvinylpyrrolidone. *Vet. Rec.* 135, 41-42.

- Taft R., Ahmad N., Inskeep E.K., 1996. Exogenous pulses of luteinizing hormone cause persistence of the largest bovine ovarian follicle. *J. Anim. Sci.* 74, 2985-2991.
- Takedomi, T., Aoyagi, Y., Konishi, M., Kishi, H., Taya, K., Watanabe, G., Sasamoto, S., 1993. Superovulation of Holstein heifers by a single injection of porcine FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology* 39, 327 (Abstract).
- Takedomi, T., Aoyagi, Y., Konishi, M., Kishi, H., Taya, K., Watanabe, G., Sasamoto, S., 1995. Superovulation of Holstein heifers by a single subcutaneous injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology* 43, 1259-1268.
- Tervit, H.R., Thompson, J.G., McMillan, W.H., Amyes, N.C., 1991. Repeated surgical embryo recovery from Texel donor ewes. *Theriogenology* 35, 282 (Abstract).
- Theriez, C., Desvignes, A., Thimonier, J., 1971. Amélioration de la prolificité chez les ovins. *Bulletin Technique d'Information - Ministère de l'Agriculture*, 157, 1-7.
- Thibault, C., Levasseur, M.C., 1979. *La fonction ovarienne chez les mammifères*. Paris, INRA, Ed. Masson, pp. 102.
- Thibier, M., 2005a. The zootechnical applications of biotechnology in animal reproduction: current methods and perspectives (Review). *Reprod. Nutr. Dev.* 45, 235-242.
- Thibier, M., 2005b. Data Retrieval Committee Annual Report - Year 2004. Significant increases in transfers of both in vivo derived and in vitro produced embryos in cattle and contrasted trends in other species in 2004. *Embryo Transfer Newsletter*, pp. 11-17.

- Thibier, M., Guérin, B., 2000. Embryo transfer in small ruminants: the methods of choice for health control in germplasm exchanges. *Livest. Prod. Sci.* 62, 253-270.
- Thimonier, J., Mauleon, P., 1969. Variations saisonnières du comportement d'oestrus et des activités ovarienne et hypophysaire chez les ovins. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys* 9, 233-250.
- Thompson, J.G.E., Simpson, A.C., James, R.W., Tervit, H.R., 1990. The application of progesterone-containing CIDRTM devices to superovulated ewes. *Theriogenology* 33, 1297-1304.
- Torrès, S., Sevellec, C., 1987. Repeated superovulation and surgical recovery of embryos in the ewe. *Reprod. Nutr. Dev.* 27, 859-863.
- Torrès, S., Cognie, Y., Colas, G., 1987. Transfer of superovulated sheep embryos obtained with different FSH-P. *Theriogenology* 27, 407-419.
- Trounson, A.O., Willadsen, S.M., Moor, R.M., 1976. Effect of prostaglandin analogue cloprostenol on oestrus, ovulation and embryonic viability in sheep. *J. Agric. Sci.* 86, 609-611.
- Ungerfeld, R., Rubianes, E., 1999. Effectiveness of short-term progestogen priming for the induction of fertile oestrus with eCG in ewes during late seasonal anoestrus. *Anim. Sci.* 68, 349-353.
- Valares, J.A., Abecia, J.A., Forcada, F., Palacín, I., Mata, L., Razquin, P., 2007. Development of a simple enzyme immunoassay for the determination of ovine luteinizing hormone. *Vet. Res. Commun.*, 31, 427-436.
- Vallet, J.L., Lamming, G.E., Batten, M., 1990. Control of endometrial oxytocin receptors and uterine response to oxytocin by progesterone and oestradiol in the ewe. *J.Reprod. Fertil.* 90, 625-634.
- Veiga-Lopez, A., Gonzalez-Bulnes, A., Garcia-Garcia, R.M., Dominguez, V., Cocero, M.J., 2005. Effects of previous ovarian status in ovulation rate and

early embryo development in response to superovulatory FSH treatments in sheep. *Theriogenology* 63, 1973-1983.

Veiga-Lopez, A., Cocero, M.J., Dominguez, V., McNeilly, A.S., Gonzalez-Bulnes, A., 2006a. Follicular wave status at the beginning of the FSH treatment modifies reproductive features in superovulated sheep. *Reprod. Biol.* 6, 243-264.

Veiga-Lopez, A., Gonzalez-Bulnes, A., Tresguerres, J.A.F., Dominguez, V., Ariznavarreta, C., Cocero, M.J., 2006b. Causes, characteristics and consequences of anovulatory follicles in superovulated sheep. *Dom. Anim. Endocrinol.* 30, 76-87.

Villanueva, O.M., Mejía, C.M., Valencia, M.J., Espinosa Aviña, F., 2000. Administración posmonta de acetato de fluorogestona en ovejas donadoras de embriones. *Vet. Méx.* 31, 129-135.

Viñoles, C., 2000. Some aspects on the effects of estrous synchronization treatments on ovarian dynamics in the cyclic ewe. Licentiate thesis, Clinical Chemistry, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, p 85, ISSN 0348-8659.

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.

Viñoles, C., Meikle, A., Forsberg, M., Rubianes, E., 1999. The effect of subluteal levels of exogenous progesterone on follicular dynamics and endocrine patterns during early luteal phase of the ewe. *Theriogenology* 51, 1351-1361.

Viñoles, C., Forsberg, M., Rubianes, E., 2000. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in the ewe. *Proc. of the 14<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction* 1, 26 (abstr.)

- Viñoles, C., Forsberg, M., Banchemo, G., Rubianes, E., 2001. Effect of long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. *Theriogenology* 55, 993-1004.
- Walker, S.K., Smith, D.H. and Seamark, R.F., 1986. Timing of multiple ovulation in the ewe after treatment with FSH or PMSG with and without GnRH. *J. Reprod. Fertil.* 77, 135-142.
- Watanabe, H., Kimura, H., Ishida, N., Okada, M., Miyamoto, A., Fukui, Y., 1998a. A simple superovulation method of a single injection of Follicle-Stimulating Hormone combined with Equine Chorionic Gonadotropin for superovulation of Suffolk ewes during the breeding season: II. The ovarian responses and the embryo qualities. *J. Reprod. Dev.* 44, 177-183.
- Watanabe, H., Miyamoto, A., Okada, M., Ishida, N., Kimura, H., Fukui, Y., 1998b. A simple superovulation method of a single injection of Follicle-Stimulating Hormone combined with Equine Chorionic Gonadotropin for superovulation of Suffolk ewes during the breeding season: I. Effects of different treatments on the endocrine profiles. *J. Reprod. Dev.* 44, 169-176.
- Webb, R., Baxter, G., McBride, D., Ritchie, M., Springbett, A.J., 1992. Mechanism controlling ovulation rate in ewes in relation to seasonal anoestrus. *J. Reprod. Fertil.* 94, 143-151.
- Wehrman, M.E., Roberson, M.S., Cupp, A.S., Kojima, F.N., Stumpf, T.T., Werth, L.A., Wolfe, M.W., Kittok, R.J., Kinder, J.E., 1993. Increasing exogenous progesterone during synchronization of estrus decreases endogenous 17 beta-estradiol and increases conception in cows. *Biol. Reprod.* 49, 214-220.
- Whyman, D., Moore, N.W., 1980. Effects of PMSG and the prostaglandin F2a analogue, cloprostenol, on superovulation, fertilization and egg transport in the ewe. *J. Reprod. Fertil.* 60, 267-272.

- Wierzcho, E., Tischner, M., Maffii, M., 1992. Superovulation of a low fecundity sheep breed using a porcine gonadotrophin extract with a defined LH content (Pluset). *Theriogenology* 38, 147-152.
- Winterberger-Torres, S., Sevellec, C., 1987. Atlas of the Early Development of the Sheep Embryo. INRA, Paris.
- Woelders, H., Zuidberg, C.A., Hiemstra, S.J., 2003. Applications, limitations, possible improvements and future of cryopreservation for livestock species. In: Workshop on Cryopreservation of Animal Genetic Resources in Europe. Paris 2003. (D. Planchenault ed.) ISBN 2-908447-25-8.
- Woelders, H., Zuidberg, C.A., Sulkers, H., Hiemstra, S.J., 2004. Preservation of genetic diversity of farm animals: gene-banking of germplasm. In: Proceedings of the 20th Meeting Ass. Eur. Trans. Emb. (AETE), p. 86-94.
- Wright, R.W.Jr., Bondioli, K., Grammer, J., Kuzan, F., Menino, A.Jr., 1981. FSH or FSH plus LH superovulation in ewes following estrus synchronization with medroxyprogesterone acetate pessaries. *J. Anim. Sci.* 52, 115-118.
- Yamada, A., Kawana, M., Tamura, Y., Miyamoto, A., Fukui, Y., 1996. Effect of single or multiple injection of follicle stimulating hormone combined with pregnant mare serum gonadotropin on superovulatory response, and normal and freezable embryos in ewes. *J. Reprod. Dev.* 42, 81-87.
- Yamamoto, M., Suzuki, T., Ooe, M., Takagi, M., Kawaguchi, M., 1992. Efficacy of single vs. multiple injection superovulation regimens of FSH using polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology* 37, 325 (Abstract).
- Yamamoto, M., Suzuki, T., Ooe, M., Takagi, M., 1993. Superovulation in Beef cows and heifers with a single injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *J. Reprod. Dev.* 39, 353-356.
- Yamamoto, M., Ooe, M., Kawaguchi, M., Suzuki, T., 1994. Superovulation in the cow with a single intramuscular injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology* 41, 747-755.

Yamamoto, M., Kawaguchi, M., Ooe, M., Takagi, M., Suzuki, T., 1995. Dose response to a single intramuscular injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone for superovulation in cows. *J. Reprod. Dev.* 41, 93-96.

## IX. ANEXOS

### 9.1. ANEXO I: ESTADIOS DEL DESARROLLO EMBRIONARIO

#### MÓRULA:

- Masa de células, siendo difícil diferenciar unas blastómeras individuales de otras.
- La masa celular ocupa la mayor parte del espacio perivitelino.

#### MÓRULA COMPACTA:

- Las blastómeras individuales han coalescido, formando una masa compacta, la cual ocupa el 60-70% del espacio perivitelino.

#### BLASTOCISTO TEMPRANO:

- Comienza la aparición del blastocele, siendo posible la diferenciación entre el trofoblasto y el macizo celular interno.
- El embrión ocupa el 70-80% del espacio perivitelino.

#### BLASTOCISTO:

- Diferenciación pronunciada entre el trofoblasto externo y el macizo celular interno más oscuro, comenzando la congregación lateral.
- Mayor prominencia del blastocele, ocupando al menos la mitad del macizo celular.
- El embrión ocupa la mayor parte del espacio perivitelino.

#### BLASTOCISTO EXPANDIDO:

- Incremento del diámetro embrionario 1,2 a 1,5 veces.



- Adelgazamiento de la zona pelúcida a la tercera parte de su grosor original.

#### BLASTOCISTO ECLOSIONADO (HATCHED):

- Puede estar eclosionando o haber abandonado completamente la zona pelúcida.
- Gran incremento del tamaño embrionario.

### 9.2. ANEXO II: EVALUACIÓN EMBRIONARIA

EMBRIONES “VIABLES” o “TRANSFERIBLES”: comprenden embriones “excelentes” (embriones ideales, de formas esféricas, simétricos con células de tamaño, color y textura uniformes) y “buenos” (embriones con imperfecciones menores, como algunas blastómeras extrudadas, forma ligeramente irregular o con pocas vesículas).

EMBRIONES “NO VIABLES”: comprenden embriones “regulares” (embriones con problemas no severos, presencia de blastómeras extrudadas, vesiculación, algunas células degeneradas), “malos” (embriones con problemas severos, numerosas blastómeras extrudadas, células degeneradas, células de tamaños variables, numerosas vesículas grandes) y “retrasados” (embriones que no corresponden al desarrollo de acuerdo al día de la colecta).

**RP-04. “XII Congreso Mundial de Corriedale”, Diciembre de 2003, Montevideo, Uruguay.**

**SUPEROVULACIÓN EN OVEJAS CORRIEDALE MEDIANTE DIFERENTES TRATAMIENTOS HORMONALES**

L. Simonetti, O. Rivera, N. Carou

Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Lomas de Zamora. Ruta 4 Km. 2 (1836), Llavallol, Buenos Aires, Argentina. Email: l\_simonetti@hotmail.com (L.Simonetti)

**Resumen**

Se compararon diferentes tratamientos superovulatorios simplificados en ovejas Corriedale durante el otoño. Veintiuna ovejas fueron sincronizadas con esponjas intravaginales con progestágeno durante 14 días y asignadas a los grupos I: 140 U\* oFSH en salina en 4 inyecciones iguales cada 12h a partir de las 24h previas al retiro de esponjas (PRE-RE); II: 140 U\* oFSH en polivinilpirrolidona en única inyección 24h PRE-RE; III: 1200 UI eCG en única inyección 24h PRE-RE. I y II recibieron 500 UI eCG 24h PRE-RE. Luego de RE, las ovejas recibieron servicio natural y se registró el intervalo RE-celo. Seis días pos-servicio se realizaron laparotomías. Se determinaron el número de cuerpos lúteos (CL) y folículos persistentes (FP). Se lavaron los cuernos uterinos de aquellas con respuesta superovulatoria (>3 CL). Se registraron: ovocitos no fertilizados (NF) embriones totales (EM) y viables (EMV). Los datos fueron analizados por Chi-cuadrado o ANOVA según correspondiera. La presentación de celos y el intervalo a los mismos fue 100% y 25.71±2.5h (I), 100% y 22.28±1.7h (II), 100% y 29.14±3.0h (III). El porcentaje de superovulación fue 85.7% (I), 85.7% (II) y 100% (III). CL: 7.83±1.2 (I), 10.50±1.0 (II) y 8.83±1.4 (III); FP: 1.33±0.4 (I), 2.17±1.1 (II) y 1.00±0.4 (III); NF: 1.00±0.5 (I), 0.80±0.4 (II) y 0.00±0.0 (III); EM: 3.60±1.9 (I), 5.80±1.2 (II) y 4.80±0.6 (III); EMV: 3.40±1.9 (I), 4.40±0.5 (II) y 4.00±0.3 (III). No existieron diferencias (P>0.05) entre grupos para ninguna de las variables. Se concluye que los tratamientos empleados fueron igualmente eficientes en términos de respuesta superovulatoria y recuperación embrionaria. \*NIH-FSH-S1

**Palabras claves**

Oveja; superovulación; hormonas.

**Abstract**

Different simplify superovulatory treatments were tested in Corriedale ewes during autumn. Twenty-one ewes were treated with progestagen-impregnated sponges for 14 days and assigned to groups I: 140 U\* oFSH in saline administered in 4 equal doses at 12h intervals from 24h before pessary withdrawal (PRE-RE); II: 140 U\* oFSH in polyvinylpyrrolidone in a single injection 24h PRE-RE; III: 1200 IU eCG in a single injection 24h PRE-RE. I and II were also injected with 500 IU eCG 24h PRE-RE. Following RE, ewes were naturally mated and the interval RE-estrous onset was registered. Laparotomies were performed six days after service and numbers of corpora lutea (CL) and persistent follicles (FP) were determined. Uterine horns of those ewes showing a superovulatory response (>3 CL) were flushed to determine non-fertilized oocytes (NF),

total embryos (EM) and viable embryos (EMV). Data were analysed by Chi-square or ANOVA as appropriate. Estrous percentage and interval RE-estrous onset were 100% and 25.71±2.5h (I), 100% and 22.28±1.7h (II), 100% and 29.14±3.0h (III). Superovulatory percentage was 85.7% (I), 85.7% (II) and 100% (III). CL: 7.83±1.2 (I), 10.50±1.0 (II) and 8.83±1.4 (III); FP: 1.33±0.4 (I), 2.17±1.1 (II) and 1.00±0.4 (III); NF: 1.00±0.5 (I), 0.80±0.4 (II) and 0.00±0.0 (III); EM: 3.60±1.9 (I), 5.80±1.2 (II) and 4.80±0.6 (III); EMV: 3.40±1.9 (I), 4.40±0.5 (II) and 4.00±0.3 (III). No differences ( $P>0.05$ ) were found among groups for any of the above variables. It was concluded that all treatments tested were equally effective in terms of superovulatory response and embryo production. \*NIH-FSH-S1

### Key words

Ewes; superovulation; hormones.

### Introducción

La superovulación y la transferencia embrionaria, permiten aumentar el número de crías que pueden lograrse a partir de una hembra. De este modo, empleando ovejas donantes y carneros de alto nivel genético, es posible lograr un mayor progreso genético en virtud del aumento de la intensidad de selección de las hembras y la disminución del intervalo generacional (1).

La producción ovina representa un rubro importante dentro de las producciones agropecuarias de nuestro país. Sin embargo, esta especie ha permanecido relegada en materia de aplicación tecnológica, siendo escasos los trabajos realizados en nuestro medio sobre superovulación ovina.

Diversos factores tienen influencia en la respuesta superovulatoria en las ovejas. Los correspondientes a la especie, tales como la raza, la estación del año o la edad y los relacionados al tipo, fuente, dosis y modo de administración del tratamiento hormonal utilizado para inducirla (2, 3, 4, 5).

La superovulación en ovinos ha sido realizada mediante la utilización de diferentes fuentes hormonales. Entre las hormonas más frecuentemente empleadas se hallan la eCG (gonadotropina del suero de yegua preñada, también denominada PMSG) y la FSH (hormona folículo estimulante) proveniente de diversas especies.

La eCG, debido a su mayor contenido en ácido siálico, mantiene concentraciones circulantes altas durante tiempo prolongado (6) y por lo tanto, la posibilidad de ser administrada en una única inyección. Otro aspecto interesante se relaciona con su bajo costo comparativo. Ha sido ampliamente empleada en programas de transferencia embrionaria (3, 7, 8, 9), pero diferentes autores han hallado que, especialmente cuando se suministran dosis elevadas, produciría efectos negativos (10, 11, 12).

La utilización de FSH en reemplazo de la eCG resultaría en una menor variabilidad en la respuesta superovulatoria, una menor cantidad de folículos anovulatorios, una mayor cantidad de embriones recuperados y una mejor calidad embrionaria (7, 13, 14, 15). La FSH es eliminada rápidamente de la circulación (16), razón por la cual requiere su administración frecuente con la finalidad de mantener concentraciones en sangre suficientes para lograr una respuesta ovárica. Debe ser administrada mediante regímenes de inyecciones múltiples, generalmente de dosis decrecientes, que pueden resultar estresantes para los animales (17, 18), laboriosos desde el punto de vista técnico (18) y conllevar a errores en la dosificación y en los tiempos de inyección (19), razones por las cuales son desventajosos.

La simplificación de los tratamientos con FSH podría consistir desde la reducción de la cantidad de días de estimulación (18, 20, 21, 22), la reducción de la frecuencia de las inyecciones (23) y/o el empleo de regímenes de dosis iguales (5, 22, 24), hasta la total simplificación consistente en su administración en una única inyección mediante la utilización de vehículos retardantes (18, 20, 25, 26, 27).

Los trabajos realizados hasta el momento en los cuales se evalúan tratamientos simplificados han generado resultados dispares (ver discusión).

La administración de FSH como única fuente hormonal de estimulación puede resultar en una menor proporción de ovejas en celo (28), un menor porcentaje de ovejas que presentan respuesta superovulatoria (28, 29, 30) y una respuesta ovárica baja (1). Murphy y col. (31) sugieren que aún empleando preparaciones de FSH con una actividad considerable de LH, los niveles de LH podrían resultar insuficientes para generar una respuesta superovulatoria. Con la finalidad de superar estos problemas, diferentes autores emplearon protocolos basados en tratamientos combinados (FSH más eCG en dosis bajas a moderadas) (1, 28, 32, 33), debido a que la eCG aportaría una actividad similar a la LH en forma adicional (34).

El objetivo del presente ensayo fue estudiar la respuesta superovulatoria y la obtención de embriones en ovejas de raza Corriedale durante el otoño mediante tratamientos hormonales simplificados, utilizando una fuente homóloga de FSH (oFSH) y/o eCG.

## **Materiales y Métodos**

### ***Animales***

Se utilizaron 21 ovejas Corriedale adultas en buena condición corporal, pertenecientes a una majada comercial situada en el partido de Olavarría, provincia de Buenos Aires, Argentina. El ensayo fue realizado durante el otoño.

### ***Tratamientos superovulatorios***

Las ovulaciones fueron sincronizadas mediante esponjas intravaginales conteniendo 60 mg de acetato de medroxiprogesterona durante 14 días y asignadas al azar a los siguientes grupos:

Grupo 1: administración de 140 unidades NIH-FSH-S1 de oFSH<sup>1</sup> disuelta en solución salina en 4 dosis i.m. comenzando a las 24h antes de la remoción de las esponjas (pre-RE) y a intervalos de 12h. Se utilizó un protocolo de dosis iguales. Conjuntamente con la primer dosis de oFSH, se administraron 500 UI de eCG<sup>2</sup> i.m.

Grupo 2: administración de 140 unidades NIH-FSH-S1 de oFSH disuelta en 30% polivinilpirrolidona<sup>3</sup> (PVP) en una única inyección i.m. 24h pre-RE. Al mismo tiempo de la inyección de oFSH-PVP, se administraron 500 UI de eCG i.m.

Grupo 3: inyección i.m. de 1200 UI de eCG 24h pre-RE.

### ***Evaluación de la respuesta reproductiva***

Luego de remover las esponjas, las ovejas fueron expuestas a carneros pintados en el pecho a los efectos de recibir servicios y verificar la presentación de los celos. El registro de los celos presentados se realizó a intervalos regulares de 6h durante 72h.

Seis días después de los servicios, aquellas ovejas que presentaron celo fueron sometidas a laparotomía ventral inguinal, bajo anestesia general con xilacina 2% y clorhidrato de Ketamina por vía i.m.

<sup>1</sup> (Ovagen; Immuno Chemical Products NZ)

<sup>2</sup> (Novormon; Syntex Arg.)

<sup>3</sup> Sigma; peso molecular 40.000

Se exteriorizaron los ovarios y se determinó la cantidad de cuerpos lúteos y folículos persistentes (folículos anovulatorios con un diámetro mínimo de 5 mm). Aquellas ovejas que presentaron al menos 1 cuerpo lúteo fueron consideradas ovuladas. Las que presentaron más de 3 cuerpos lúteos fueron consideradas superovuladas.

Posteriormente, se procedió al lavado de ambos cuernos uterinos mediante la inserción de un catéter de polietileno de 2 mm de diámetro (Tom-cat) en el lumen uterino próximo a la unión útero-tubal y una sonda pediátrica (Folley) en la base del cuerno (35). El medio de lavado fue introducido desde la unión útero-tubal y consistió en buffer fosfato salino (PBS) con 1% suero ovino y antibióticos. Cada cuerno fue lavado con aproximadamente 60 ml de medio.

Se procedió a la búsqueda de estructuras bajo lupa estereoscópica (40x), que fueron clasificadas en las siguientes categorías:

- Ovocitos no fertilizados.
- Embriones, tomando al clivaje como evidencia de fertilización. Los mismos fueron clasificados de acuerdo a su estadio del desarrollo y a su apariencia morfológica (100x) siguiendo el criterio:
  - “VIABLES”: comprendiendo embriones “excelentes” (embriones ideales, de formas esféricas, simétricos con células de tamaño, color y textura uniformes) y “buenos” (embriones con imperfecciones menores, como algunas blastómeras extrudadas, forma ligeramente irregular o con pocas vesículas).
  - “NO VIABLES”: comprendiendo embriones "regulares" (embriones con problemas no severos, presencia de blastómeras extrudadas, vesiculación, algunas células degeneradas), "malos" (embriones con problemas severos, numerosas blastómeras extrudadas, células degeneradas, células de tamaños variables, numerosas vesículas grandes) y “retrasados” (embriones con menos de 32 células).

#### ***Análisis de los datos***

Para cada grupo experimental, se consideraron los siguientes indicadores:

- Porcentaje de ovejas que exhibieron celo.
- Intervalo desde el retiro de las esponjas hasta la presentación de los celos.
- Porcentaje de ovejas ovuladas en relación con aquellas que exhibieron celo.
- Porcentaje de ovejas superovuladas en relación con aquellas que ovularon.
- Respuesta ovárica total para cada oveja superovulada, obtenida como la suma de la cantidad de cuerpos lúteos y folículos persistentes.
- Cantidad de cuerpos lúteos.
- Cantidad de folículos persistentes.
- Cantidad de ovocitos no fertilizados + embriones recuperados.
- Tasa de recuperación (porcentaje de ovocitos no fertilizados + embriones recuperados en relación a la cantidad de cuerpos lúteos).
- Cantidad de embriones recuperados.
- Tasa de fertilización (porcentaje de embriones en relación a la recuperación total de ovocitos no fertilizados + embriones).
- Cantidad de embriones viables.
- Tasa de viabilidad (porcentaje de embriones clasificados como viables con respecto al número total de embriones).

Los datos expresados en porcentaje fueron analizados mediante Chi-cuadrado o test exacto de Fisher según correspondiera.

Los datos sobre el intervalo desde el retiro de las esponjas hasta la presentación de los celos, respuesta ovárica total, cuerpos lúteos, folículos persistentes, recuperación total, ovocitos no fertilizados, embriones totales y embriones viables fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA).

### Resultados

Los resultados correspondientes a la presentación de celos y la respuesta ovárica se muestran en la Tabla 1.

La presentación de celo fue máxima, puesto que el 100% de las ovejas tratadas fue marcado por los carneros. El intervalo transcurrido entre la remoción de los pesarios y la detección de los celos osciló entre las 18 y las 42hs, y no varió entre los grupos experimentales.

Todas las ovejas presentaron al menos un cuerpo lúteo, resultando en porcentajes de ovulación máximos. El porcentaje de ovejas con respuesta superovulatoria fue de entre el 85.7% y 100%, no existiendo diferencias significativas entre grupos. La cantidad de estructuras ováricas totales, de cuerpos lúteos y de folículos persistentes fue similar entre grupos.

Los datos sobre la recuperación, fertilización y viabilidad embrionaria se presentan en la Tabla 2.

No se detectaron diferencias entre grupos con respecto a la tasa de recuperación, y se recuperó una cantidad similar de estructuras totales.

En cuanto a fertilización, el grupo 3 presentó la mayor tasa. La cantidad promedio de embriones obtenidos por cada oveja superovulada no difirió entre grupos. Asimismo, la calidad de los embriones no fue influenciada por los tratamientos empleados. La cantidad de embriones clasificados como viables obtenidos a partir de cada hembra superovulada no tuvo variaciones en función de los tratamientos.

Tabla 1 Presentación de celos y respuesta superovulatoria

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Ovejas en celo (%) ns	7 / 7 (100.0)	7 / 7 (100.0)	7 / 7 (100.0)
Intervalo al celo (hs: $\bar{x} \pm \text{sem}$ )	25.71 $\pm$ 2.5 <sup>a</sup> [18 – 36]	22.28 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup> [18 – 30]	29.14 $\pm$ 3.0 <sup>a</sup> [18 – 42]
Ovejas ovuladas (%) ns	7 / 7 (100.0)	7 / 7 (100.0)	6 / 6 (100.0)
Ovejas superovuladas (%) ns	6 / 7 (85.7)	6 / 7 (85.7)	6 / 6 (100.0)
Respuesta ovárica total ( $\bar{x} \pm \text{sem}$ )	9.17 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup> [6 – 13]	12.67 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup> [12 – 15]	9.83 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup> [7 – 17]
Cuerpos lúteos ( $\bar{x} \pm \text{sem}$ )	7.83 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup> [5 – 12]	10.50 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup> [6 – 13]	8.83 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup> [5 – 15]
Folículos persistentes ( $\bar{x} \pm \text{sem}$ )	1.33 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup> [0 – 3]	2.17 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup> [0 – 7]	1.00 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup> [0 – 2]

Valores entre corchetes corresponden a los mínimos y máximos.

Valores con igual superíndice dentro de cada fila no difieren significativamente ( $P > 0.05$ ).

ns: Diferencias no significativas entre grupos ( $P > 0.05$ ).

Aclaración: una oveja del Grupo 3 fue descartada para los datos de superovulación debido a la presentación de un solo cuerno uterino.

Tabla 2 Recuperación, fertilización y viabilidad embrionaria

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Tasa de recuperación (%) ns	23 / 35 (65.7)	33 / 57 (57.9)	24 / 38 (63.2)
Ovocitos no fertilizados y embriones (x±sem)	4.60 ± 1.7 <sup>a</sup> [2 – 11]	6.60 ± 1.2 <sup>a</sup> [5 – 11]	4.80 ± 0.6 <sup>a</sup> [3 – 6]
Tasa de fertilización (%) ds	18 / 23 (78.3)	29 / 33 (87.9)	24 / 24 (100.0)
Ovocitos no fertilizados (x±sem)	1.00 ± 0.5 <sup>a</sup> [0 – 3]	0.80 ± 0.4 <sup>a</sup> [0 – 2]	0.00 ± 0.0 <sup>a</sup> [0 – 0]
Embriones (x±sem)	3.60 ± 1.9 <sup>a</sup> [0 – 11]	5.80 ± 1.2 <sup>a</sup> [3 – 10]	4.80 ± 0.6 <sup>a</sup> [3 – 6]
Tasa de viabilidad (%) ns	17 / 18 (94.4)	22 / 29 (75.9)	20 / 24 (83.3)
Embriones viables (x±sem)	3.40 ± 1.9 <sup>a</sup> [0 – 11]	4.40 ± 0.5 <sup>a</sup> [3 – 6]	4.00 ± 0.3 <sup>a</sup> [3 – 5]

Valores entre corchetes corresponden a los mínimos y máximos.

Valores con igual superíndice dentro de cada fila no difieren significativamente (P>0.05).

ds: Diferencias significativas entre grupos (P<0.05).

ns: Diferencias no significativas entre grupos (P>0.05).

## Discusión

Tradicionalmente la FSH ha sido administrada en dosis decrecientes, pudiendo conducir a errores de dosificación. La alternativa de utilización de dosis constantes ha sido testada con resultados contradictorios en función especialmente del grado de contaminación con LH de las preparaciones. Así, en aquellas preparaciones con un alto contenido en LH la administración en dosis decrecientes ha demostrado ser más eficiente (5), en tanto que preparaciones con muy baja contaminación (como la indicada para la oFSH empleada) admitirían protocolos de dosis iguales. La respuesta superovulatoria y la obtención de embriones satisfactorias logradas en el presente trabajo mediante la administración de la FSH en dosis iguales (Grupo 1) indicaría esta posibilidad de simplificación y se halla en coincidencia con bibliografía anterior (22, 24, 36).

Generalmente la FSH ovina es administrada mediante regímenes largos consistentes en 8 inyecciones, durante 4 días (36, 37, 38). Los resultados obtenidos en el Grupo 1 estarían señalando la factibilidad de emplear tratamientos reducidos de dosis múltiples como ser la administración de la dosis total repartida en 4 inyecciones a intervalos de 12 horas. De forma similar, resultados satisfactorios han sido informados por otros autores utilizando 6 inyecciones de la misma FSH empleada en el presente (22), o bien empleando 4 inyecciones de otras fuentes de FSH (18, 20, 21), en todos los casos administradas cada 12 horas. La necesidad de inyectar la FSH cada 12 horas ha sido sugerida por Thompson y col. (23) al hallar una mayor tasa ovulatoria, respuesta ovárica total, ovocitos y embriones recuperados y transferibles en comparación con su administración cada 24 horas.

Los resultados del presente estudio señalan la posibilidad de sustitución del tratamiento de inyecciones múltiples por una única inyección de FSH en vehículo retardante. Estos hallazgos se hallan en concordancia con estudios previos realizados bajo otras condiciones de trabajo. Así por ejemplo, Dattena y col. (20) obtuvieron una respuesta superovulatoria mediante una única inyección i.m. de FSH porcina disuelta en PVP en ovejas en anestro comparable a la de los tratamientos tradicionales. Estos hallazgos se contradicen con los resultados no satisfactorios reportados por Lajous y col. (26), quienes informan una

respuesta ovárica menor luego de la administración de FSH en una única inyección (empleando como vehículo solución salina o PVP) en comparación con su administración en un régimen de dosis múltiples, lo cual podría atribuirse al rol del genotipo sobre la respuesta a los tratamientos de estimulación ovárica (18). Otros aspectos tales como el momento de la administración de FSH-PVP, la concentración del PVP en la solución-vehículo y la vía de administración podrían contribuir a la variabilidad en los resultados (18).

Debido a su prolongada duración en circulación, la eCG causaría el crecimiento folicular alrededor del periodo periovulatorio, lo cual conduciría a la formación de folículos grandes luego de la ovulación y previo a la colecta de los embriones (28, 39). De acuerdo con las proposiciones de Murray y col. (40), el transporte de los ovocitos sería acelerado por niveles altos de estradiol resultando en un pasaje temprano de los ovocitos desde los oviductos hacia el útero. Por ello, la reducción en la cantidad de ovocitos fertilizados luego de la administración de eCG podría deberse a los efectos del estradiol sobre el transporte de estas gametas, como así también a los efectos nocivos del exceso de estradiol sobre la viabilidad ovocitaria. A su vez, la eCG causaría efectos negativos sobre el desarrollo embrionario temprano (20). Todo ello contribuiría a la disminución de la cantidad de embriones de calidad transferible que pueden lograrse por donante (39, 41). Contrariamente a la bibliografía general, los resultados obtenidos en el presente trabajo bajo las condiciones detalladas anteriormente, han sido satisfactorios, por cuanto la incidencia de folículos persistentes ha sido baja, la fertilización no se ha visto afectada y finalmente, la recuperación embrionaria ha sido comparable con los otros grupos experimentales.

### **Conclusión**

Se concluye que los tres tratamientos hormonales empleados fueron igualmente eficientes en términos de respuesta superovulatoria y producción embrionaria en ovejas Corriedale durante el otoño.

### **Agradecimientos**

Los autores agradecen a los laboratorios König, San Jorge-Bagó y Young Quimagro, las donaciones de productos utilizados en el desarrollo experimental y al Méd. Vet. José Mujica por posibilitar la utilización de animales e instalaciones.

### **Referencias**

- (1) Bonino Morlán, J., Hughes, P., Villaamil, A., Azzarini, M. y Valledor, F. (1989). *Multi-ovulación y trasplante embrionario en ovinos. Resumen de experiencias realizadas en Uruguay. Producción Ovina 1*, 11-22.
- (2) Gherardi, P.B. y Lindsay, D.R. (1980). *The effect of season on the ovulatory response of Merino ewes to serum from pregnant mares. J. Reprod. Fertil.* 60, 425-429.
- (3) Mutiga, E.R. y Baker, A.A. (1982). *Superovulatory response in Merino ewes to three PMSG dose levels. Theriogenology 17*, 100 (Abstr.).
- (4) Bondurant, R.H. (1986). *Embryo transfer in sheep and goats. In: Morrow, D.A. (Ed.), Current Therapy in Theriogenology 2. W.B. Saunders, Philadelphia, PA, pp. 63-66.*
- (5) Torres, S., Cognie, Y. y Colas, G. (1987). *Transfer of superovulated sheep embryos obtained with different FSH-P. Theriogenology 27*, 407-419.



- (6) McIntoch, J.E.A., Moor, R.M. y Allen, W.R. (1975). Pregnant mare serum gonadotrophin: rate of clearance from the circulation of sheep. *J. Reprod. Fertil.* 44, 95-100.
- (7) Armstrong, D.T. y Evans, G. (1983). Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. *Theriogenology* 19, 31-42.
- (8) Walker, S.K., Smith, D.H. y Seamark, R.F. (1986). Timing of multiple ovulations in the ewe after treatment with FSH or PMSG with and without GnRH. *J. Reprod. Fert.* 77, 135-142.
- (9) Martemucci, G., Toteda, F., Manchisi, A., Lacalandra, G. y Gambacorta, M. (1988b). Superovulatory response to PMSG in Gentile di Puglia and Altamura breeds of sheep. Fecundity following embryo transfer. *Zoot. Nutr. Anim.* 14, 165-172.
- (10) Shelton, J.N. y Moore, N.W. (1967). The response of the ewe to pregnant mare serum and to horse anterior pituitary extract. *J. Reprod. Fertil.* 14, 175-177.
- (11) Evans, G. y Robinson, T.J. (1980). The control of fertility in sheep: endocrine and ovarian responses to progestagen-PMSG treatment in the breeding season and in anoestrus. *J. Agric. Sci.* 94, 69- 88.
- (12) Bindon, B.M. y Piper, L.R. (1982). Physiological basis of ovarian response to PMSG in sheep and cattle. In: Shelton, J.N., Trounson, A.O., Moore, N.W., James, J.W. (Ed.), *Embryo transfer in cattle, sheep and goats*. Australian Society for Reproductive Biology, Canberra, pp. 1-5.
- (13) Evans, G. y Armstrong, D.T. (1984a). Reduction of sperm transport in ewes by superovulation treatments. *J. Reprod. Fert.* 70, 47-53.
- (14) Martemucci, G., Gambacorta, M., Toteda, F., Manchisi, A. y Bellitti, E. (1988a). Superovulatory response to treatment with PMSG, FSH-p or hMG in ewe for embryo transfer. *Zoot. Nutr. Anim.* 15, 379-386.
- (15) Cogniè, Y. (1990). Current technologies for synchronization and artificial insemination of sheep. In: Oldham, C.M., Martin, G.B., Purwis, I.W. (eds), *Reproductive Physiology of Merino sheep*. School of Agriculture (Animal Science), The University of Western Australia, Perth, 207-216.
- (16) Laster, D.B. (1972). Disappearance and uptake of  $^{125}\text{I}$  FSH in the rat, rabbit, ewe and cow. *J. Reprod. Fertil.* 30, 407-415.
- (17) Yamamoto, M., Kawaguchi, M., Ooe, M., Takagi, M. y Suzuki, T. (1995). Dose response to a single intramuscular injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone for superovulation in cows. *J. Reprod. Dev.* 41, 93-96.
- (18) D'Alessandro, A.G., Martemucci, G., Colonna, M.A., Borghese, A., Terzano, M.G. y Bellitti, A. (2001). Superovulation in ewes by a single injection of pFSH dissolved in polyvinylpyrrolidone (PVP): effects of PVP molecular weight, concentration and schedule of treatment. *Anim. Reprod. Sci.* 65, 255-264.
- (19) Demoustier, M.M., Beckers, J.F., Van Der Zwalmen, P., Closset, J., Gillard, J.L. y Ectors, F. (1988). Determination of porcine plasma follitropin levels during superovulation treatment in cows. *Theriogenology* 30, 379-386.
- (20) Dattena, M., Vespignani, S., Branca, A., Gallus, M., Ledda, S., Naitana, S. y Cappai, P. (1994). Superovulatory response and quality of embryos recovered from anestrus ewes after a single injection of porcine FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology* 42, 235-239.
- (21) D'Alessandro, A.G., Martemucci, G., Toteda, F., Gambacorta, M. y Manchisi, A. (1996). Superovulation and embryo production in ewes using a commercial p-FSH. *Small Ruminant Research* 19, 255-261.

- (22) González-Bulnes, A., Santiago-Moreno, J., Cocero, M.J. y López-Sebastián, A. (2000). Effects of FSH commercial preparation and follicular status on follicular growth and superovulatory response in Spanish Merino ewes. *Theriogenology* 54, 1055-1064.
- (23) Thompson, J.G.E., Simpson, A.C., James, R.W. y Tervit, H.R. (1990). The application of progesterone-containing CIDRTM devices to superovulated ewes. *Theriogenology* 33, 1297-1304.
- (24) Bunch, T.D., Panter, K.E., Wang, S., Evans, R.C. y Holyoak, G.R. (2000). The effects of three dosing regimens of gonadotropins on sheep superovulation. *Theriogenology* 53, 494 (Abstract).
- (25) López-Sebastián, A., Gómez-Brunet, A., Lishman, A.W., Johson, S.K. y Inskoop, E.K. (1993). Modification by propylene glycol of ovulation rate in response to a single injection of FSH. *J. Reprod. Fertil.* 99, 437-442.
- (26) Lajous, D., Joly, T., Baril, G., Cognié, Y. y Beckers, J.F. (1997). Superovulatory response and quality of embryos recovered from Romanov ewes after a single injection of pFSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Proc. 13th Meeting Ass. Eur. Trans. Emb. (AETE)*, Lyon, p. 166 (Abstract).
- (27) López-Sebastián, A., González de Bulnes, A., Santiago Moreno, J., Gómez Brunet, A., Townsend, E.C. y Inskoop, E.K. (1999). Effects of follicular status at treatment on follicular development and ovulation in response to FSH in Spanish Merino ewes. *Theriogenology* 52, 505-514.
- (28) Jabbour, H.N. y Evans, G. (1991). Ovarian and endocrine response of Merino ewes to treatment with PMSG and/or FSH-p. *Anim. Reprod. Sci.* 26, 93-106.
- (29) Wright, R.W.Jr., Bondioli, K., Grammer, J., Kuzan, F. y Menino, A.Jr. (1981). FSH or FSH plus LH superovulation in ewes following estrus synchronization with medroxyprogesterone acetate pessaries. *J. Anim. Sci.* 52, 115-118.
- (30) Eppleston, J., Bilton, R.J. y Moore, N.W. (1984). Effects of FSH dose and treatment regime on ovulatory response in sheep. *Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol.* 16, 68.
- (31) Murphy, B.D., Mapletoft, R.J., Manns, J. y Humphries, W.D. (1984). Variability in gonadotrophin preparations as a factor in the superovulatory response. *Theriogenology* 21, 117-125.
- (32) Ryan, J.P., Hunton, J.R. y Maxwell, W.M. (1991). Increased production of sheep embryos following superovulation of Merino ewes with a combination of pregnant mare serum gonadotrophin and follicle stimulating hormone. *Reprod. Fertil. Dev.* 3, 551-560.
- (33) Paz, P., Sanchez, A.J., Fernandez, J.G., Carbajo, M., Dominguez, J.C., Chamorro, C.A. y Anel, L. (1994). Sheep embryo cryopreservation by vitrification and conventional freezing. *Theriogenology* 42, 327-338.
- (34) Papkoff, H. (1981). Variations in the properties of equine chorionic gonadotropin. *Theriogenology* 15, 1-11.
- (35) Smith, C.L. y Murphy, C.A. (1987) An antegrade surgical uterine flush technique for ova collection in the ewe. *Am. J. Vet. Res.* 48, 1129-1131.
- (36) Lymberopoulos, A.G., Amiridis, G.S., Kühholzer, B., Besenfelder, U., Christodoulou, V., Vainas, E. y Brem, G. (2001). Fertilization and embryo recovery rates in superovulated Chios ewes after laparoscopic intrauterine insemination. *Theriogenology* 55, 1855-1862.
- (37) Forcada, F., Abecia, J.A., Lozano, J.M. y Zúñiga, O. (2000). Repeated superovulation of high-prolificacy Rasa Aragonesa ewes before culling as an inexpensive way to obtain high-quality embryos. *Livestock Production Science* 66, 263-269.

- (38) Amiridis, G.S., Rekkas, C.A., Fthenakis, G.C., Vainas, E., Lymberopoulos, A., Christodoulou, V. y Belibasaki, S. (2002). Progesterone concentration as an indicator of ovarian response to superovulation in Chios ewes. *Theriogenology* 57, 1143-1150.
- (39) Rubianes, E., Ungerfeld, R. y Ibarra, D. (1996). Serum anti-eCG improves luteal function and increases ova/embryos recovery in eCG-superovulated ewes. *Small Rumin. Res.* 21, 105-111.
- (40) Murray, J.F., Downing, J.A., Scaramuzzi, R.J. y Evans, G. (1994). Heterogeneity in ovarian steroid secretion response to treatment with PMSG in ewes during the breeding season and anestrus. *Theriogenology* 42, 1337-1347.
- (41) Samartzi, F., Boscos, C., Vainas, E. y Tsakalof, P. (1995). Superovulatory response of Chios sheep to PMSG during spring and autumn. *Anim. Reprod. Sci.* 39, 215-222.

**Revista Argentina de Producción Animal, "XXVII Congreso Argentino de Producción Animal", Octubre de 2004, Tandil, Argentina.**

**SIMPLIFICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS SUPEROVULATORIOS EN OVINOS.** Simonetti, L.\*, Forcada, F.\*\*, Rivera, O.\*, Carou, N.\* - \*Fac. Ciencias Agrarias, UNLZ - \*\*Dpto. Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Univ. Zaragoza, España.

Simplified superovulatory treatments in ewes.

El objetivo fue evaluar la posibilidad de simplificar los tratamientos superovulatorios en ovinos mediante el análisis de la respuesta superovulatoria y la obtención de embriones, empleando diferentes tratamientos hormonales. Durante el otoño, 35 ovejas Corriedale fueron sincronizadas mediante esponjas intravaginales impregnadas con 60 mg de acetato de medroxiprogesterona durante 14 días y superovuladas con 176 unidades NIH-FSH-S1 FSHo (Ovagen) administrada de acuerdo a los grupos: I (convencional): repartida en 8 inyecciones decrecientes (35,2 x 2; 17,6 x 6 unidades) en vehículo salino cada 12 horas empezando a las 72 horas previas al retiro de esponjas (PRE-RE); II (convencional): repartida en 6 inyecciones iguales en vehículo salino cada 12 horas empezando a las 48 horas PRE-RE; III (simplificado): en única inyección en vehículo salino junto con 500 UI PMSG a las 48 horas PRE-RE; IV (simplificado): repartida en 4 inyecciones iguales en vehículo salino cada 12 horas empezando a las 24 horas PRE-RE; V (simplificado): en única inyección en vehículo retardante 24 horas PRE-RE. Luego del retiro de las esponjas, las ovejas recibieron servicio natural y se registró el intervalo al celo. Seis a siete días post-servicio se realizaron laparotomías. Se determinó el número de cuerpos lúteos (CL) y de folículos persistentes (FP). Se computaron los porcentajes de ovejas ovuladas (al menos 1 cuerpo lúteo), superovuladas (al menos 3 cuerpos lúteos) y con cuerpos lúteos regresados (avasculares, pequeños y pálidos). Se lavaron los cuernos uterinos y se registraron: estructuras recuperadas (ER), embriones totales (EM) y transferibles (EMT). Se computaron los porcentajes de recuperación (ER/CL), fertilización (EM/ER) y viabilidad embrionaria (EMT/EM). Los datos fueron analizados por Chi-cuadrado o ANOVA según correspondiera. Los resultados se presentan en las tablas 1 y 2.

Tabla 1: Presentación de celos y respuesta superovulatoria

Grupos	I	II	III	IV	V
Ovejas en celo (%)	7/7 (100)	8/8 (100)	8/8 (100)	5/5 (100)	7/7 (100)
Intervalo al celo (horas)	30,7±3,3 a	35,2±3,1 a	23,2±2,4 b	33,6±1,5 a	32,6±1,8 a
Ovuladas (%)	7/7 (100)	8/8 (100)	8/8 (100)	5/5 (100)	7/7 (100)
Superovuladas (%)	6/7 (85,7)	7/8 (87,5)	8/8 (100)	5/5 (100)	6/7 (85,7)
Cuerpos lúteos	10,7±1,8 b	7,8±1,0 b	17,8±1,9 a	8,8±1,6 b	7,4±1,5 b
Folículos persistentes	0,6±0,4	1,4±0,5	1,1±0,4	0,2±0,2	0,7±0,5

Valores con letras distintas dentro de cada fila difieren significativamente (P<0,05).

Tabla 2: Obtención y evaluación embrionaria

Grupos	I	II	III	IV	V
Recuperación (%)	57/75 (76,0)	43/62 (69,4)	74/121 (61,2)	31/44 (70,4)	36/52 (69,2)
Estructuras recuperadas	8,1±1,5 ab	5,4±0,7 b	10,6±1,1 a	6,2±2,2 b	5,1±1,6 b
Fertilización (%) <sup>#</sup>	56/56 (100) a	31/40 (77,5) bc	39/74 (52,7) c	9/29 (31,0) d	31/35 (88,6) ab
Embriones totales	8,0±1,5	3,9±0,8	5,6±1,9	1,8±0,9	4,4±1,4
Viabilidad (%)	38/56 (67,8)	27/31 (87,1)	31/39 (79,5)	7/9 (77,8)	24/31 (77,4)
Embriones transferibles	5,4±1,2	3,4±0,7	4,4±1,7	1,4±0,7	3,4±1,3

Valores con letras distintas dentro de cada fila difieren significativamente (P<0,05).

<sup>#</sup>Diferencias significativas entre grupos (P<0,05) según criterio de Bonferroni.

En todos los grupos se obtuvo un alto porcentaje de ovejas con respuesta superovulatoria, siendo el promedio de cuerpos lúteos por oveja tratada superior en el III con respecto al resto. Sólo en una oveja perteneciente al grupo V se observó regresión luteal, involucrando a la totalidad de sus cuerpos lúteos. Se registró una baja incidencia de folículos persistentes. No se detectaron diferencias significativas en los porcentajes de recuperación de estructuras, conduciendo a una mayor cantidad de estructuras recuperadas en el grupo III en comparación con II, IV y V (P<0,05). Es importante destacar la marcada diferencia en los porcentajes de fertilización entre grupos, registrándose el valor más bajo en IV. Si bien no se detectaron diferencias significativas (P>0,05) en la cantidad de embriones obtenidos, se observó una tendencia (P<0,10) a una mejor respuesta en el grupo I con respecto a II, IV y V y en el III con respecto a IV. No hubo diferencias entre grupos en la cantidad de embriones clasificados como transferibles (P>0,05). Los resultados obtenidos bajo estas condiciones sugieren la posibilidad de utilizar algún programa simplificado para obtener respuesta superovulatoria en ovinos.

Palabras claves: ovinos; superovulación; hormonas; FSH; PMSG

Key words: ewe; superovulation; hormones; FSH; PMSG

**Revista Argentina de Producción Animal, "XXVIII Congreso Argentino de Producción Animal", Octubre de 2005, Bahía Blanca, Argentina.**

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA SUPEROVULATORIA Y LOS NIVELES HORMONALES DE CUATRO TRATAMIENTOS SUPEROVULATORIOS EN OVINOS. **Simonetti, L.\***, **Forcada, F.\*\***, **Rivera, O.\***, **Carou, N.\*** - \*FCA-UNLZ - \*\*Fac. Veterinaria, Univ. Zaragoza, España. E-mail: l\_simonetti@hotmail.com

*Evaluation of superovulatory response and hormonal profiles of four superovulatory treatments in ewes.*

Se evaluó la respuesta superovulatoria y los niveles de LH y P4 en ovejas sometidas a diferentes tratamientos superovulatorios. Durante el otoño, 26 ovejas Corriedale fueron tratadas con esponjas intravaginales con progestágenos y superovuladas según cuatro protocolos: **I**: 140 unidades FSHo (Ovagen) repartidas en 4 inyecciones iguales en vehículo salino cada 12 horas empezando 24 horas previo al retiro de las esponjas (PRE-RE) y 500 UI eCG junto con la primera inyección de FSHo; **II**: 140 unidades FSHo en única inyección en vehículo retardante (PVP) junto con 500 UI eCG 24 horas PRE-RE; **III**: 176 unidades FSHo repartidas en 4 inyecciones iguales en vehículo salino cada 12 horas empezando 24 horas PRE-RE; **IV**: 176 unidades FSHo en única inyección en vehículo retardante 24 horas PRE-RE. Luego de retirar las esponjas, las ovejas recibieron servicio natural y se registró el intervalo al celo empleando una frecuencia de detección cada 6 horas. Los niveles de LH se determinaron mediante ELISA en muestras de sangre extraídas cada 6 horas durante un lapso de 96 horas luego del retiro de las esponjas. Seis a siete días post-servicio se realizaron laparotomías. Se determinó el número de cuerpos lúteos (CL), folículos persistentes (FP) y respuesta ovárica total. Se computaron los porcentajes de ovejas ovuladas ( $\geq 1$  CL), superovuladas ( $\geq 3$  CL) y con cuerpos lúteos regresados. Se lavaron los cuernos uterinos y se registraron: estructuras recuperadas (ER), embriones totales (EM) y viables (EMV). Se computaron los porcentajes de recuperación (ER/CL), de fertilización (EM/ER), de viabilidad embrionaria (EMV/EM) y de eficiencia (EMV/CL). Los niveles de P4 se determinaron por RIA en muestras de sangre al momento de las laparotomías. Los datos fueron analizados por Chi-cuadrado o ANOVA según correspondiera. Los resultados se presentan en las tablas 1 y 2.

Tabla 1: Respuesta ovárica y niveles de LH

Grupos	I	II	III	IV
Ovejas en celo (%)	7/7 (100)	7/7 (100)	5/5 (100)	7/7 (100)
Intervalo al celo (h)	25,7 $\pm$ 2,5 b	22,3 $\pm$ 1,7 b	33,6 $\pm$ 1,5 a	32,6 $\pm$ 1,8 a
Intervalo RE-pico LH (h)	25,7 $\pm$ 1,7 b	28,3 $\pm$ 4,1 b	42,0 $\pm$ 3,5 a	38,4 $\pm$ 2,4 a
Pico LH (ng/ml)	17,4 $\pm$ 1,4	14,6 $\pm$ 2,4	13,2 $\pm$ 0,6	15,1 $\pm$ 2,2
Ovuladas (%)	8/8 (100)	8/8 (100)	5/5 (100)	7/7 (100)
Superovuladas (%)	7/8 (87,5)	8/8 (100)	5/5 (100)	6/7 (85,7)
Cuerpos lúteos funcionales	7,1 $\pm$ 1,2	9,4 $\pm$ 1,4	8,8 $\pm$ 1,6	6,7 $\pm$ 1,5

Folículos persistentes	1,1±0,4 <sup>ab</sup>	2,7±1,1 <sup>a</sup>	0,2±0,2 <sup>b</sup>	0,7±0,5 <sup>b</sup>
Respuesta ovárica total	8,3±1,3	12,1±0,7	9,0±1,6	8,1±1,6

Valores con letras distintas dentro de cada fila difieren significativamente (P<0,05)

Valores con superíndices distintos dentro de cada fila difieren significativamente (P<0,10)

Tabla 2: Obtención, evaluación embrionaria y niveles de P4 a la cirugía

Grupos	I	II	III	IV
Recuperación (%)	18/31 (58,1)	33/60 (55,0)	31/44 (70,4)	31/52 (59,6)
Fertilización (%)	14/18 (77,8) b	32/33 (97,0) a	9/29 (31,0) c	26/30 (86,7) ab
Viabilidad (%)	14/14 (100) a	21/32 (65,6) b	7/9 (77,8) ab	21/26 (80,8) ab
Eficiencia (%)	14/31 (45,2) a	21/60 (35,0) a	7/44 (15,9) b	21/52 (40,4) a
P4 total (ng/ml)	18,9±3,3 <sup>ab</sup>	23,0±3,6 <sup>a</sup>	12,6±4,0 <sup>b</sup>	11,7±1,8 <sup>b</sup>
P4 / cuerpo lúteo (ng/ml)	2,8±0,2 <sup>a</sup>	3,0±0,7 <sup>a</sup>	1,4±0,3 <sup>b</sup>	1,6±0,1 <sup>b</sup>

Valores con letras distintas dentro de cada fila difieren significativamente (P<0,05)

Valores con superíndices distintos dentro de cada fila difieren significativamente (P<0,10)

Todas las ovejas presentaron celo y ovularon, con un intervalo al celo y al pico de LH más corto (P<0,05) para los grupos que incluyeron eCG. No hubo diferencias entre grupos en los niveles al pico de LH. En todos los grupos se obtuvo un alto porcentaje de ovejas con respuesta superovulatoria, con una cantidad de CL similar, pero una tendencia (P<0,10) a más FP para el grupo II. Sólo en una oveja (grupo IV) se observó regresión luteal en todos sus CL. No hubo diferencias significativas en los porcentajes de recuperación. Hubo diferencias marcadas en los porcentajes de fertilización entre grupos, siendo más bajo en III (P<0,05). Si bien hubo diferencias significativas (P<0,05) en viabilidad embrionaria, el porcentaje de embriones viables en relación con la cantidad de cuerpos lúteos fue inferior (P<0,05) en III. Los grupos I y II tendieron (P<0,10) a presentar más P4 total y por CL a la colecta embrionaria. Los resultados obtenidos sugieren la posibilidad de utilizar algún programa simplificado para obtener respuesta superovulatoria en ovinos. Por su mayor simplificación se sugiere la administración de FSH en única inyección en vehículo retardante.

Palabras clave: ovinos; superovulación; FSH ovina; eCG

Key words: ovine; superovulation; ovine FSH; eCG

**RF 96. Revista Argentina de Producción Animal, "XXVIII Congreso Argentino de Producción Animal", Octubre de 2006, Mar del Plata, Argentina.**

COMPARACIÓN DE DIFERENTES TRATAMIENTOS SUPEROVULATORIOS EN OVINOS. **Simonetti, L.\***, **Rivera, O.\***, **Carou, N.\***, **Forcada, F.\*\*** - \*FCA-UNLZ - \*\*Fac. Veterinaria, Univ. Zaragoza, España. E-mail: [simonettilaura@yahoo.com.ar](mailto:simonettilaura@yahoo.com.ar) - [lsimonetti@agrarias.unlz.edu.ar](mailto:lsimonetti@agrarias.unlz.edu.ar)

*Comparison of different superovulatory treatments in ewes.*

Se evaluó la respuesta superovulatoria en ovejas sometidas a diferentes tratamientos hormonales. Durante el otoño, 50 ovejas Corriedale fueron tratadas con esponjas intravaginales con progestágenos (60 mg MAP) durante 14 días y superovuladas según tres protocolos: I: 176 unidades FSHo (Ovagen) en única inyección en vehículo salino junto con 500 UI eCG a las 48 horas previas al retiro de las esponjas (PRE-RE); II: 132 unidades FSHo en única inyección en vehículo salino junto con 500 UI eCG a las 48 horas PRE-RE; III: 176 unidades FSHo repartidas en 8 inyecciones en dosis decrecientes (35,2 x 2; 17,6 x 6 unidades) y administradas en vehículo salino cada 12 horas, empezando a las 72 horas PRE-RE. Luego de retirar las esponjas, las ovejas recibieron servicio natural y se registró el intervalo al celo empleando una frecuencia de detección cada 6 horas. Seis a siete días post-servicio se realizaron laparotomías. Se determinó el número de cuerpos lúteos (CL) diferenciándolos en funcionales (CLF) y regresados (CLR), folículos persistentes (FP) y respuesta ovárica total (CL+FP). Se computaron los porcentajes de ovejas que ovularon ( $\geq 1$  CL), con CLF y superovuladas ( $\geq 3$  CL). Se lavaron los cuernos uterinos y registraron: estructuras recuperadas (ER: ovocitos+embriones totales+zonas pelúcidas), embriones totales (EM), transferibles (EMT) y congelables (EMC). Se computaron porcentajes de recuperación (ER/CLF), fertilización (EM/(ovocitos+EM)), viabilidad (EMT/EM) y congelabilidad (EMC/EM). Los datos fueron analizados por Chi-cuadrado o ANOVA según correspondiera. Los resultados se presentan en las tablas 1 y 2.

Tabla 1: Presentación de celos y respuesta ovárica después de utilizar tres protocolos de superovulación

Grupos	I	II	III
Ovejas en celo (%)	17/18 (94,4)	15/15 (100)	17/17 (100)
Intervalo al celo (h)	23,3 $\pm$ 2,0 <sup>B</sup>	20,0 $\pm$ 1,0 <sup>B</sup>	30,4 $\pm$ 1,7 <sup>A</sup>
Ovejas con cuerpos lúteos funcionales (%)	18/18 (100)	14/15 (93,3)	17/17 (100)
Ovejas superovuladas (%)	18/18 (100)	14/15 (93,3)	16/17 (94,1)
Cuerpos lúteos funcionales (X $\pm$ SE)	13,9 $\pm$ 1,5 <sup>a</sup>	9,6 $\pm$ 1,3 <sup>b</sup>	10,7 $\pm$ 0,9 <sup>b</sup>
Folículos persistentes (X $\pm$ SE)	1,3 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	0,9 $\pm$ 0,2 <sup>ab</sup>	0,3 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>
Respuesta ovárica total (X $\pm$ SE)	15,2 $\pm$ 1,7 <sup>A</sup>	10,9 $\pm$ 1,2 <sup>B</sup>	11,0 $\pm$ 1,0 <sup>B</sup>



Superíndices diferentes dentro de una misma fila indican diferencias significativas:  $P < 0,10$  (minúsculas) o  $P < 0,05$  (mayúsculas).

Tabla 2: Recuperación y evaluación embrionaria

Grupos	I	II	III
Recuperación (%)	119/218 (54,6) <sup>B</sup>	84/134 (62,7) <sup>ab</sup>	133/182 (73,1) <sup>A</sup>
Estructuras recuperadas (X±SE)	7,9±1,2	6,5±0,7	7,8±0,8
Fertilización (%)	64/118 (54,2) <sup>C</sup>	62/76 (81,6) <sup>B</sup>	124/132 (93,9) <sup>A</sup>
Embriones totales (X±SE)	4,3±1,1 <sup>b</sup>	4,8±0,8 <sup>b</sup>	7,3±1,0 <sup>a</sup>
Viabilidad (%)	50/64 (78,1)	52/62 (83,9)	94/124 (75,8)
Embriones transferibles (X±SE)	3,3±1,0	4,0±0,8	5,5±0,8
Congelabilidad (%)	35/64 (54,7)	44/62 (71,0)	84/124 (67,7)
Embriones congelables (X±SE)	2,3±0,8 <sup>b</sup>	3,4±0,8 <sup>ab</sup>	4,9±0,8 <sup>a</sup>

Superíndices diferentes dentro de una misma fila indican diferencias significativas:  $P < 0,10$  (minúsculas) o  $P < 0,05$  (mayúsculas).

Todas las ovejas a excepción de una presentaron celo, con un intervalo al celo más corto ( $P < 0,05$ ) para los grupos que incluyeron eCG. Se obtuvo un alto porcentaje de ovejas con respuesta superovulatoria independientemente de los protocolos de estimulación empleados. Sólo en una oveja perteneciente al grupo II se observó regresión luteal, involucrando a la totalidad de sus CL. El número de CLF tendió a ser mayor en el grupo I en comparación con II y III ( $P < 0,10$ ). El grupo I registró una tendencia ( $P < 0,10$ ) a más FP en comparación con III. Si bien se detectaron diferencias significativas en los porcentajes de recuperación entre los grupos I y III, la cantidad de ER fue similar en todos los tratamientos ( $P > 0,10$ ). Es importante destacar la marcada diferencia en los porcentajes de fertilización entre grupos ( $P < 0,05$ ), registrándose el valor más bajo en I. La cantidad de EM fue ligeramente superior en el grupo III ( $P < 0,10$ ). No hubo diferencias entre grupos en la cantidad de EMT ( $P > 0,10$ ). Sin embargo, el número de EMC tendió a ser mayor en III y menor en I ( $P < 0,10$ ). Los resultados obtenidos bajo estas condiciones sugieren la posibilidad de utilizar el programa II para obtener respuesta superovulatoria en ovinos por combinar una mayor simplificación, menores dosis de gonadotropinas y generar similar cantidad de embriones transferibles y congelables en comparación con el protocolo tradicional de dosis múltiples decrecientes.

Palabras clave: ovinos; superovulación; FSH ovina; eCG

Key words: ovine; superovulation; ovine FSH; eCG

**RF 202. Revista Argentina de Producción Animal, "XXIX Congreso Argentino de Producción Animal", Octubre de 2007, Santiago del Estero, Argentina.**

EFFECTOS DEL TRATAMIENTO SUPEROVULATORIO SOBRE LA PRESENTACIÓN DE LOS CELOS, EL PICO PREEVULATORIO DE LH Y LA TASA OVULATORIA EN OVEJAS CORRIEDALE. **Simonetti, L.\***, **Forcada, F.\*\***, **Abecia, A.\*\***, **Palacín, I.\*\***, **Rivera, O.E.\***, **Carou, N.\***, **Lynch, G.M.\*** - \*FCA-UNLZ - \*\*Fac. Veterinaria, Univ. Zaragoza, España. E-mail: [lsimonetti@agrarias.unlz.edu.ar](mailto:lsimonetti@agrarias.unlz.edu.ar)

Se evaluó la distribución de los celos, de los picos preovulatorios de LH y la tasa ovulatoria en ovejas de raza Corriedale estimuladas mediante tres tratamientos superovulatorios simplificados. La información proviene de dos ensayos (1 y 2) realizados en dos años consecutivos, en otoño bajo condiciones similares de manejo, salvo que en los ensayos se utilizaron partidas diferentes de FSH. Un total de 38 ovejas adultas Corriedale fueron tratadas con esponjas intravaginales (60 mg MAP) durante 14 días y superovuladas según los protocolos: A (n=13): 176 unidades de FSH ovina (FSHo; Ovagen) en única inyección en vehículo salino junto con 500 UI eCG, 48 h previas al retiro de las esponjas (PRE-RE); B (n=12): 176 unidades FSHo repartidas en 4 inyecciones iguales, en vehículo salino cada 12 h empezando 24 h PRE-RE; C (n=13): 176 unidades FSHo en única inyección, en vehículo retardante 24 h PRE-RE. Luego de retirar las esponjas, las ovejas fueron expuestas a careros provistos de arneses marcadores y se registró el porcentaje de celos y el intervalo al celo empleando una frecuencia de detección cada 6 h. A los efectos de determinar los niveles de LH, se tomaron muestras de sangre de vena yugular a intervalos de 6 h a partir del retiro de las esponjas y durante un lapso de hasta 84 h. Las concentraciones plasmáticas de LH fueron determinadas mediante ELISA tipo sándwich. Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron 8,2% y 11,7%, respectivamente y la sensibilidad, 0,05 ng/ml. Se definió el pico de LH como aquél correspondiente a la concentración máxima alcanzada y se determinó el intervalo de tiempo hasta el pico de LH. Seis días post-servicio se realizó laparotomía y se determinó la respuesta ovulatoria (número de cuerpos lúteos-CL). Los resultados fueron analizados por ANOVA, contemplando los efectos de los tratamientos, los ensayos y su interacción, y se presentan en la tabla.

Tabla: Intervalo desde el retiro de la esponja hasta el celo y el pico de LH, y n° de CL observados en ovejas de raza Corriedale con diferentes tratamientos de superovulación en dos ensayos diferentes (promedio  $\pm$  SEM)

	A (n = 13)	B (n = 12)	C (n = 13)
Intervalo al celo (hs)			
Ensayo 1 (n = 19)	27,0 $\pm$ 3,4 <sup>aA</sup>	44,6 $\pm$ 1,8 <sup>bA</sup>	50,0 $\pm$ 5,0 <sup>bA</sup>
Ensayo 2 (n = 19)	24,0 $\pm$ 2,6 <sup>aA</sup>	33,6 $\pm$ 1,5 <sup>bB</sup>	32,6 $\pm$ 1,8 <sup>bB</sup>
Intervalo al pico de LH (hs)			
Ensayo 1	28,0 $\pm$ 2,0 <sup>aA</sup>	49,7 $\pm$ 1,7 <sup>bA</sup>	61,2 $\pm$ 8,1 <sup>bA</sup>
Ensayo 2	27,6 $\pm$ 2,4 <sup>aA</sup>	42,0 $\pm$ 3,5 <sup>bB</sup>	38,4 $\pm$ 2,4 <sup>bB</sup>
N° de CL			
Ensayo 1	9,8 $\pm$ 2,7 <sup>aA</sup>	4,4 $\pm$ 1,1 <sup>bA</sup>	2,8 $\pm$ 1,0 <sup>bA</sup>
Ensayo 2	17,3 $\pm$ 2,1 <sup>aB</sup>	8,8 $\pm$ 1,6 <sup>bB</sup>	6,7 $\pm$ 1,5 <sup>bB</sup>

Valores con letras minúsculas distintas dentro de cada fila difieren significativamente ( $P < 0,05$ ).

Valores con letras mayúsculas distintas dentro de cada columna difieren significativamente ( $P < 0,05$ ).

Todas las ovejas presentaron celo, pico de LH y ovularon (al menos un CL). Sólo una oveja del grupo C presentó regresión de sus CL. Se detectó interacción tratamiento\*ensayo para las variables intervalo al celo e intervalo al pico de LH. De este modo, en ambos ensayos, las ovejas tratadas con el protocolo que incluyó eCG (A) entraron en celo y presentaron pico de LH más temprano que las de los grupos B o C ( $P < 0,05$ ). Comparando los dos ensayos, los intervalos al celo y al pico de LH fueron similares en A ( $P > 0,05$ ), pero diferentes en B y C ( $P < 0,05$ ). La respuesta ovulatoria estuvo afectada por el tratamiento, siendo significativamente mayor en A que en B o C ( $P < 0,05$ ). Para cada tratamiento, se observaron diferencias en la respuesta ovulatoria entre ensayos ( $P < 0,05$ ), lo cual podría sugerir la variabilidad entre partidas distintas de una misma hormona. Los resultados sugieren además la necesidad de realizar una programación diferencial de los servicios (ya sea naturales o por inseminación artificial) de acuerdo al tipo de protocolo de superovulación empleado. En los protocolos que no incluyen eCG, las diferencias en la presentación del celo y del pico de LH podrían estar asociadas a la distinta respuesta ovulatoria registrada entre los ensayos.

Palabras clave: ovinos; superovulación; FSH ovina; eCG; LH

Key words: sheep; superovulation; ovine FSH; eCG; LH



## Simplified superovulatory treatments in Corriedale ewes

L. Simonetti<sup>a,\*</sup>, F. Forcada<sup>b</sup>, O.E. Rivera<sup>a</sup>, N. Carou<sup>a</sup>,  
R.H. Alberio<sup>c</sup>, J.A. Abecia<sup>b</sup>, I. Palacin<sup>b</sup>

<sup>a</sup> *Animal Production, School of Agrarian Sciences, National University of Lomas de Zamora,  
Ruta 4 Km. 2, 1836 Llavallol, Buenos Aires, Argentina*

<sup>b</sup> *Animal Production and Food Science, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zaragoza,  
Miguel Servet, 177, 50013 Zaragoza, Spain*

<sup>c</sup> *Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción, INTA, Balcarce, Argentina*

Received 12 December 2006; accepted 26 January 2007

Available online 4 February 2007

---

### Abstract

Two experiments were designed to evaluate the possibility of simplifying superovulatory treatments in Corriedale ewes with use of ovine FSH (oFSH). Ewes received intravaginal progestogen sponges for 14 days. In Experiment 1, several simplified schedules were tested. Ewes were treated with 176 NIH-FSH-S1 units' oFSH given as a single injection in saline, along with 500 IU eCG 48 h before sponge removal (Group A1), in four equal doses (B1), or given as a single injection in a polyvinylpyrrolidone vehicle (C1) 24 h before sponge removal. In Experiment 2, the simplified protocol that exhibited the most desirable results in Experiment 1 (A2) was compared with the same protocol, but using less oFSH (132 units) (B2) and with the most conventional protocol (176 units of oFSH in eight decreasing doses; C2). Estrus was detected and ewes were naturally mated. The ovarian response and embryo production were assessed on Day 6 after estrus. LH was measured at 6 h intervals from pessary withdrawal. The onset of estrus and the pre-ovulatory LH surge were advanced ( $P < 0.05$ ) in ewes treated with FSH and eCG. In Experiment 1, protocol A1 produced a greater percentage of superovulated ewes compared to C1 (100.0 compared with 58.3%;  $P < 0.05$ ), increased ovulation rate (13.8 corpora lutea compared with 6.2 and 4.7 for B1 and C1, respectively;  $P < 0.05$ ), and tended to increase the number of transferable embryos compared to B1 ( $P = 0.08$ ). In Experiment 2, percentages of superovulated ewes and ovulation rates were similar among groups; however, Group A2 tended to have more large follicles ( $P = 0.07$ ) than C2. The number of transferable embryos was similar among the three treatments. In conclusion, the reduced-dose oFSH given once along with eCG is the

---

\* Corresponding author. Tel.: +54 11 4282 6263; fax: +54 11 4282 7896.  
E-mail address: lsimonetti@agrarias.unlz.edu.ar (L. Simonetti).

most appropriate superovulatory treatment because it combines simplicity and a lesser dose of gonadotropin, which also implies a reduction in cost, without reducing embryo production.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

*Keywords:* Superovulation; Hormones; Embryo; Sheep

---

## 1. Introduction

Both eCG and FSH are widely used to induce superovulation in sheep. Treatment with eCG is economically inexpensive and, because of its long half-life, can be administered in a single injection; however, when it is given at greater doses, eCG has a detrimental effect on hormonal profiles, ovulation, fertilization, embryo recovery, and viability rates (Shelton and Moore, 1967; Evans and Robinson, 1980; Bindon and Piper, 1982). To avoid the problems associated with eCG, various commercial FSH compounds are used; however, because of its short half-life, FSH has to be administered in multiple doses for up to 4 days. Such a procedure is labor intensive and can involve errors in dose and injection times. Furthermore, excessive handling can be stressful for animals and detrimental to reproductive performance. This problem may be greater in animals raised under extensive conditions.

Although it is feasible to obtain a superovulatory response following a single injection of FSH dissolved in saline, a greater frequency of premature luteal regression can occur, as reflected by post-estrus progesterone concentrations (Riesenberg et al., 2001). The need for an oily vehicle to allow a slower absorption rate of the FSH given as a single dose was suggested (López-Sebastián et al., 1993, 1999), but the subject has not been studied extensively (Dattena et al., 1994; Lajous et al., 1997; D'Alessandro et al., 2001).

Most of the research on protocols based on FSH and eCG co-treatments have involved administering FSH in multiple injections (Jabbour et al., 1991; Ryan et al., 1991; Naqvi and Gulyani, 1998, 1999). Furthermore, ovarian stimulation using a single injection of FSH in saline coincidentally with small or moderate doses of eCG has been tested in some sheep breeds, such as Merino (Maxwell and Wilson, 1989; Ali and Shelton, 1993), Sarda (Ledda et al., 1992; Dattena et al., 1994; Leoni et al., 2001), and Rasa Aragonesa (Ledda et al., 1992).

To date, most of the FSH tested in simplified superovulatory protocols was derived from pigs; however, it is common for the ovarian response to drop when stimulation with heterologous FSH is repeated in the same donor ewes (Al-Kamali et al., 1985; Fuki et al., 1985; McKelvey et al., 1986). The more recent use of purified ovine FSH (oFSH) seems to resolve the problem at short term, although Forcada et al. (2000) reported a reduced ovarian response of Rasa Aragonesa ewes after the third superovulatory treatment with an interval of 2 months between two consecutive treatments.

Corriedale is a dual-purpose (wool, meat) breed and, in South America, it is important in pure and crossbred breeding. In Argentina, almost 38% of the stock is Corriedale, where the breed is well distributed throughout all regions and managed under extensive conditions. Little is known about the superovulatory response in Corriedale ewes and, to our knowledge, no studies have reported developing a protocol that could be easily applied in extensively managed flocks. Thus, the aim of the present study was to evaluate the viability of simplifying superovulatory treatments in Corriedale ewes by means of oFSH.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

The study was conducted during two consecutive breeding seasons at the R8 Experimental Farm of INTA Balcarce, Buenos Aires, Argentina, using 3–6-year-old non-pregnant Corriedale ewes that had been expressing estrus at typical intervals prior to initiation of treatments and weighed 50–60 kg. Animals were maintained in good health under natural field conditions, and fed pasture (*Lolium perenne* and *Trifolium repens*) plus a supplementary diet of oaten hay during the intensive labor requiring period throughout the experiments.

### 2.2. Experimental design

#### 2.2.1. Experiment 1

The experiment was designed to compare simplified superovulatory protocols. Time of estrus was synchronized among ewes using intravaginal sponges that contained 60 mg medroxyprogesterone acetate, which were inserted for 14 days. Superovulation was induced in ewes using one of the following treatments: Group A1 ( $n = 13$ ): oFSH (Ovagen, ICPbio, New Zealand) dissolved in saline along with 500 IU eCG (Folligon, Intervet) was administered in a single i.m. injection 48 h before sponge removal. Group B1 ( $n = 12$ ): from 24 h before to 12 h after sponge removal, oFSH dissolved in saline was divided into four equal i.m. doses administered at 12 h intervals. Group C1 ( $n = 13$ ): oFSH dissolved in a 30% (w/v) polyvinylpyrrolidone solution (Sigma–Aldrich Química S.A., Buenos Aires, Argentina; MW 40,000) was given in a single i.m. injection 24 h before sponge removal. In all of the groups, the total dose of oFSH was 176 NIH-FSH-S1 units of NIADDK-oFSH-17.

Rams were fitted with crayons and placed with ewes in a ram:ewe ratio of 1:10. Ewes were assessed for signs of estrus at 6 h intervals up to 96 h after sponge withdrawal. Ewes in estrus were mated and mating was repeated after 12 and 24 h. Then, ewes remained with one ram per five ewes for 2 additional days.

Six days after the onset of estrus, embryos were collected using mid-ventral laparotomy. The ewes were anesthetized using an i.m. injection of 1 mL 2% xylazine and 4 mL ketamine chlorhydrate. Ovaries were examined and the numbers of corpora lutea (functional and regressed) and large follicles (anovulated follicles having at least 5 mm diameter) were recorded. Rate of ovulating ewes having at least one functional corpora lutea was computed. Ewes that had at least three functional corpora lutea were assumed to have superovulated. The uterine horns were flushed with a phosphate-buffered saline solution (PBS) supplemented with 1% heat-treated bovine serum and antibiotics. The flushing medium was directed toward a polyethylene catheter inserted at the uterotubal junction and recovered using a Foley catheter inserted at the base of the horn. Ova were observed under a stereomicroscope and cleavage was used as evidence of fertilization. Embryos were evaluated based on their stage of development and morphological appearance (Winterberger-Torres and Sevellec, 1987), and classified as “non-viable” (retarded or fair embryos) or “viable” (embryos of excellent or good quality) (Martemucci et al., 1988a). The rates of recovery and fertilization were the result of dividing total ova by corpora lutea and embryos by total ova, respectively, and were expressed as percentages. The viability rate was calculated as the percentage of viable embryos among the total number of ova obtained.

### 2.2.2. Experiment 2

The second experiment was based on the preliminary information obtained in Experiment 1. The simplified protocol that performed the best in Experiment 1 (Group A1) was selected (Group A2) and compared with the same protocol, but using less oFSH (Group B2), and with the conventional multiple-dose schedule (Group C2). Synchronization of estrus was performed as in Experiment 1 and ewes were randomly assigned to one of the following three groups: Group A2 ( $n = 16$ ): 176 units of oFSH dissolved in saline along with 500 IU eCG administered in a single i.m. injection 48 h prior to sponge withdrawal. Group B2 ( $n = 14$ ): 132 units of oFSH dissolved in saline along with 500 IU eCG administered in one i.m. injection 48 h before sponge removal. Group C2 ( $n = 17$ ): from 72 h before to 12 h after sponge removal, 176 units of oFSH dissolved in saline were administered in eight i.m. doses of decreasing concentrations ( $35.2 \text{ units} \times 2$  and  $17.6 \text{ units} \times 6$ ) at 12 h intervals. The detection of estrus, mating, ovarian response, and embryo recovery and evaluation were performed using the same methods as in Experiment 1.

### 2.3. Hormone assays

To measure plasma concentrations of LH in ewes from both experiments, blood samples were collected by jugular venepuncture at 6 h intervals for up to 96 h from pessary withdrawal and stored at  $-20^\circ\text{C}$ . Plasma LH concentrations were measured using a simple sandwich enzyme immunoassay (EIA) on 96-well polyvinyl microtiter plates (Valares et al., 2007). The plate was sensitized using a well-characterized capture antibody that is used in the development of EIA assays for LH in a number of species, including sheep (Spearow and Trost, 1987). To each well was added 100  $\mu\text{L}$  of each LH standard or sample, in duplicate, and incubated for 2 h at  $37^\circ\text{C}$ . After three washings, 100  $\mu\text{L}$  of anti-LH peroxidase conjugate (1:5000 in a dilution buffer) was added to each well and incubated for 30 min at room temperature. The anti-LH antibody used for labelling with peroxidase was obtained by using ovine LH to immunize rabbits. The plates were re-washed three times and 100  $\mu\text{L}$  of tetramethyl benzidine (TMB; Sigma–Aldrich Química S.A., Madrid, Spain) was added to each well and incubated for 30 min at room temperature. To stop the enzymatic conversion of the substrate, 50  $\mu\text{L}$  0.5 mol/L sulphuric acid were added to each well. An ELISA Reader (Labsystem, Finland) was used to measure the optical density of each well at 450 nm. The sensitivity of the assay was 0.05 ng/mL, and the intra- and inter-assay coefficients of variation were 8.2 and 11.7%, respectively. The LH peak was the maximum LH concentration, and the time and magnitude of the LH surge were determined.

Progesterone concentrations were measured just before embryos were collected. Samples were obtained and processed in the manner above described for LH. Plasma progesterone concentrations were determined using solid-phase RIA kits based on antibody-coated tubes,  $^{125}\text{I}$ -labelled progesterone, and rabbit antiserum (DPC, Los Angeles, USA). The assay sensitivity was 0.05 ng/mL, and the intra- and inter-assay coefficients of variation were 11.1 and 8.2%, respectively. Data of progesterone per corpus luteum were the result of dividing progesterone concentration as measured by RIA by the number of corpora lutea recorded for each ewe.

### 2.4. Statistical analysis

Results expressed as percentages (ewes exhibiting estrus, ewes ovulating with functional corpora lutea, ewes superovulating, and rates of recovery, fertilization, and viability) were analyzed using Chi-square or Fisher exact tests, as appropriate. When differences were statistically significant, multiple comparisons were made using the Bonferroni criterion.

Analysis of variance was performed on time to estrus onset, corpora lutea, large follicles, ova recovered, ova fertilized, viable embryos, time to LH peak, LH peak, and progesterone concentration, using the GLM procedure of SAS (SAS Institute, 1999). For both experiments, the mathematical model for the analysis of data included the group as fixed effect and residual error. When statistically significant, multiple comparisons were made using least squares means.

### 3. Results

#### 3.1. Experiment 1

In response to the treatments, all of the Corriedale ewes exhibited estrus-related behavior and a preovulatory LH surge. The onset of estrus and the LH peak occurred earlier ( $P < 0.05$ ) in ewes treated with the FSH and eCG simplified protocol (Group A1) than in the other ewes (Table 1). The time between the appearance of estrus and the LH surge tended ( $P < 0.10$ ) to be shorter in Group A1 than in Group B1 or Group C1. The frequency of superovulation (at least three functional corpora lutea) differed ( $P < 0.05$ ) between the two simplified protocols (100 and 58.3% in Group A1 and Group C1, respectively). The mean ovulation rate (number of corpora lutea) among ovulating ewes was greater ( $P < 0.05$ ) in Group A1 ( $13.8 \pm 1.9$ ) than in Group B1 ( $6.2 \pm 1.1$ ) or Group C1 ( $4.7 \pm 1.0$ ). Progesterone secreted per corpus luteum was independent of treatment.

Recovery rates were independent of treatment, but the number of ova recovered was greater ( $P < 0.05$ ) in Group A1 ( $8.4 \pm 1.4$ ) than in Group B1 ( $3.1 \pm 1.1$ ) or Group C1 ( $3.2 \pm 1.1$ ). Treatment

Table 1  
Experiment 1

Treatment	oFSH + eCG (A1)	oFSH4d (B1)	oFSH/PVP (C1)
No. of ewes in estrus (%)	13/13 (100)	12/12 (100)	13/13 (100)
Onset of estrus (h) <sup>a</sup>	25.4 ± 2.0 B	40.0 ± 2.0 A	40.6 ± 3.5 A
Time to LH peak (h) <sup>a</sup>	27.8 ± 1.5 B	47.4 ± 1.9 A	49.8 ± 5.5 A
Interval estrus–LH peak (h) <sup>a</sup>	2.7 ± 1.2 b	6.6 ± 1.1 ab	7.8 ± 2.4 a
LH peak (ng/mL) <sup>a</sup>	14.4 ± 0.9	15.3 ± 1.1	13.9 ± 1.5
Ewes ovulating with functional corpora lutea (%) <sup>b</sup>	13/13 (100)	12/12 (100)	12/13 (92.3)
Ewes with superovulations (%) <sup>c</sup>	13/13 (100) A	10/12 (83.3) AB	7/12 (58.3) B
Ovulation rate <sup>a</sup>	13.8 ± 1.9 A	6.2 ± 1.1 B	4.7 ± 1.0 B
Large follicles <sup>a</sup>	0.9 ± 0.3	1.2 ± 0.4	1.0 ± 0.3
Progesterone/corpus luteum at laparotomy <sup>b</sup> (ng/mL) <sup>a</sup>	1.5 ± 0.2	1.4 ± 0.2	1.7 ± 0.2
Ova recovery rate (%)	109/180 (60.6)	37/75 (49.3)	39/57 (68.4)
No. of recovered ova <sup>a</sup>	8.4 ± 1.4 A	3.1 ± 1.1 B	3.2 ± 1.1 B
Fertilization rate (%)	70/109 (64.2) B	17/37 (45.9) B	35/39 (89.7) A
No. of embryos <sup>a</sup>	5.4 ± 1.6 a	1.4 ± 0.4 b	2.9 ± 1.0 ab
Viability rate (%)	58/109 (53.2) B	15/37 (40.5) B	30/39 (76.9) A
No. of viable embryos <sup>a</sup>	4.5 ± 1.3 a	1.2 ± 0.4 b	2.5 ± 0.9 ab

Ovarian response and embryo production in Corriedale ewes treated with 176 NIH-FSH-S1 units of oFSH given as a single injection along with 500 IU eCG (Group A1), in four equal doses (Group B1), or given as a single injection in a PVP vehicle (Group C1). Different letters indicate significant differences at  $P < 0.10$  (small letters, a and b) or  $P < 0.05$  (capital letters, A and B).

<sup>a</sup> Mean ± S.E.M.

<sup>b</sup> Corresponds to ewes that had at least one functional corpus luteum.

<sup>c</sup> Ewes that had at least three functional corpora lutea.



with FSH and eCG in a single dose (Group A1) tended ( $P=0.06$ ) to produce more embryos ( $5.4 \pm 1.6$ ) than did the protocol involving four equal doses (Group B1:  $1.4 \pm 0.4$  embryos). Fertilization and viability rates were greater ( $P<0.05$ ) in group C1 than those of the other groups. The overall efficacy of the superovulatory treatment, as measured by the number of viable embryos, tended ( $P=0.08$ ) to be affected by the treatment, and the Group A1 simplified protocol appeared to be more efficient ( $4.5 \pm 1.3$  viable embryos per ovulated ewe) when compared to Group B1 ( $1.2 \pm 0.4$ ) but not Group C1 ( $2.5 \pm 0.9$ ).

### 3.2. Experiment 2

In the second experiment, only one ewe (in Group A2) failed to show estrus (Table 2). The traditional protocol that involved repeated doses of FSH without eCG (Group C2) delayed ( $P<0.05$ ) the onset of estrus and the LH peak compared to the other simplified treatments, including the combination of FSH and eCG. All of the ewes had corpora lutea indicating ovulation had occurred, and one ewe in Group B2 had regressed corpora lutea, as reflected by morphology and functionality ( $0.64$  ng/mL of progesterone at embryo recovery). With all of the protocols, ovulation rates and the incidence of superovulation (almost 100%) were acceptable. No differences in ovulation rate among groups were found. However, Group A2 tended to produce more large follicles when compared to C2 ( $P=0.07$ ). Mean plasma progesterone concentrations per corpus luteum were less ( $P<0.05$ ) in Group C2 than in the other treatments in Experiment 2, but similar to those observed in all of the treatment in Experiment 1.

Recovery rate was greater ( $P<0.05$ ) in the multiple-dose treatment (Group C2) than in the simplified FSH plus eCG protocols, but the total number of ova recovered were similar among

Table 2  
Experiment 2

Treatment	oFSH + eCG (A2)	oFSH + eCG (B2)	oFSH8d (C2)
No. of ewes in estrus (%)	15/16 (93.8)	14/14 (100)	17/17 (100)
Onset of estrus (h) <sup>a</sup>	22.0 ± 1.4 B	20.1 ± 1.0 B	30.4 ± 1.7 A
Time to LH peak (h) <sup>a</sup>	24.6 ± 2.4 B	19.0 ± 1.8 B	33.3 ± 2.5 A
Interval estrus–LH peak (h) <sup>a</sup>	5.3 ± 1.2	3.0 ± 1.3	2.7 ± 1.0
LH peak (ng/mL) <sup>a</sup>	13.8 ± 0.9	16.1 ± 0.9	14.6 ± 1.0
Ewes ovulating with functional corpora lutea (%) <sup>b</sup>	15/15 (100)	13/14 (92.8)	17/17 (100)
Ewes with superovulations (%) <sup>c</sup>	15/15 (100)	13/13 (100)	16/17 (94.1)
Ovulation rate <sup>a</sup>	13.7 ± 1.7	10.3 ± 1.3	10.7 ± 0.9
Large follicles <sup>a</sup>	1.3 ± 0.5 a	1.0 ± 0.3 ab	0.3 ± 0.2 b
Progesterone/corpus luteum at laparotomy <sup>b</sup> (ng/mL) <sup>a</sup>	2.3 ± 0.4 A	2.8 ± 0.3 A	1.5 ± 0.1 B
Ova recovery rate (%)	118/206 (57.3) B	76/134 (56.7) B	132/182 (72.5) A
No. of recovered ova <sup>a</sup>	7.9 ± 1.2	5.8 ± 0.7	7.8 ± 0.8
Fertilization rate (%)	64/118 (54.2) C	62/76 (81.6) B	124/132 (93.9) A
No. of embryos <sup>a</sup>	4.3 ± 1.1 b	4.8 ± 0.8 b	7.3 ± 1.0 a
Viability rate (%)	50/118 (42.4) B	52/76 (68.4) A	94/132 (71.2) A
No. of viable embryos <sup>a</sup>	3.3 ± 1.0	4.0 ± 0.8	5.5 ± 0.8

Ovarian response and embryo production in Corriedale ewes treated with 176 (Group A2) or 132 (Group B2) NIH-FSH-S1 units of oFSH and 500 IU eCG administered in a single injection, or 176 units in eight decreasing doses (Group C2). Different letters indicate differences at  $P<0.10$  (small letters, a and b) or  $P<0.05$  (capital letters, A, B and C).

<sup>a</sup> Mean ± S.E.M.

<sup>b</sup> Corresponds to ewes that had at least one functional corpus luteum.

<sup>c</sup> Ewes that had at least three functional corpora lutea.

the three superovulatory treatments. Fertilization rates differed ( $P < 0.05$ ) among treatments and ewes subjected to the conventional FSH8d protocol tended ( $P = 0.07$ ) to produce more embryos than did ewes in the other treatment groups. The mean overall efficiencies of the protocols, as measured by the number of viable embryos, did not significantly differ among groups ( $3.3 \pm 1.0$ ,  $4.0 \pm 0.8$  and  $5.5 \pm 0.8$  embryos in Group A2, Group B2, and Group C2, respectively).

#### 4. Discussion

The experiments in the present study clearly demonstrate that the combination of eCG and FSH in a single injection advance the onset of estrus in Corriedale ewes. Naqvi and Gulyani (1999) reported similar results, but Leoni et al. (2001) did not observe differences in the timing of estrus between ewes superovulated using a single injection of FSH plus eCG and ewes superovulated using multiple injections of FSH. Although the interval between the onset of estrus and the LH peak might have differed among groups in the present study, in all of the groups, the onset of estrus was followed by the onset of the LH peak. Thus, the present experiments demonstrated a delay in the preovulatory LH surge when eCG was not included in the treatment, which should be considered in an artificial insemination program, because ewes not receiving eCG may need to be inseminated later than those receiving eCG. In all treatments, the interval between the onset of estrus and the LH peak was similar to that reported by Jabbour and Evans (1991), but shorter than the intervals reported in other previous studies (Jabbour et al., 1991; McEvoy et al., 1996; González-Bulnes et al., 2002).

Superovulation requires the administration of a gonadotropin that mimics the effect of endogenous FSH, which can be available long enough to stimulate the development of extra follicles. In other previous studies, a proportion of ewes in which superovulation was induced exhibited inadequate luteal function caused by premature luteal regression (Schiewe et al., 1991; Forcada et al., 2006). In the present study, the proportion of ewes that exhibited inadequate luteal function was minimal. The lesser incidence of regressed corpora lutea in the FSH-PVP treatment (Group C1) is similar to that reported by D'Alessandro et al. (2001), which suggests that such a polymer will permit slower absorption and more prolonged blood concentrations of FSH, and this might positively affect the quality of the follicles leading to more functional corpora lutea in Corriedale ewes. Moreover, the addition of a smaller dose of eCG to the FSH administered as a single injection in saline would be important. Riesenber et al. (2001) found a greater incidence of anomalous corpora lutea when FSH was injected once in saline without eCG co-treatment. In general, the results of the present study suggest that premature luteal regression is not a major problem for Corriedale ewes in which superovulation was induced using simplified protocols.

Superovulation is successful when a ewe has more ovulations than is normal for the breed under normal management practices. Normally, Corriedale ewes have one or two ovulations; thus, while the results from Experiment 1 of the present study demonstrate that it is feasible to use simplified protocols to induce superovulation in ewes, stimulation with either FSH in four equal doses (Group B1) or, especially, one injection of FSH in PVP (Group C1) induced a lesser ovarian response. The ovine FSH-PVP protocol was chosen based on observations of Italian ewes by D'Alessandro et al. (2001), who reported that a single injection of porcine FSH in PVP given 24 h, but not 48 h before sponge removal and i.m., rather than s.c., was effective. Moreover, the studies of Dattena et al. (1994) and D'Alessandro et al. (2001) showed that a single injection of FSH dissolved in PVP can induce in ewes a superovulatory response similar to that obtained using standard multiple-dose protocols. In contrast, Lajous et al. (1997) failed to obtain satisfactory results using

the same simplified treatment, which underscores the potential importance of genetic differences in the response to specific superovulatory treatments.

Previous studies that have focused on reducing the number of crude ovine (Rexroad and Powell, 1991) or porcine FSH (D'Alessandro et al., 2005) injections reported effective results. In contrast, in the present experiments, when Corriedale ewes received four injections of oFSH, the ovarian response and embryo production were poor. The poor ovulatory response in Group B1 (FSH in four doses) and Group C1 (FSH plus PVP) might have been due to a short period for ovarian follicular recruitment (Scaramuzzi et al., 1993; Bartlewski et al., 1999), which is a common phenomenon in superovulatory treatments that begin 24 h before the end of the progestagen treatment (Boland et al., 1985; D'Alessandro and Martemucci, 2004).

Torrès et al. (1987), who were the first to evaluate a protocol for using decreasing doses of FSH (non-purified porcine FSH) to superovulate ewes, reported greater superovulation rates when a regimen of decreasing doses was used. The lesser amount of LH in commercial batches of oFSH seems to justify the manufacturer recommendation to use a protocol of constant doses, rather than one of decreasing doses, as used with non-purified preparations. That recommendation prompted the use in the present study a protocol involving four constant doses of oFSH (Group B1) as a simplified alternative. In Experiment 1 of the present study, however, that protocol yielded the fewest embryos because of failures in ovulation and fertilization. Similarly, Manchega ewes injected with FSH in constant-doses had less follicular development and a lesser ovulation rate than did ewes receiving decreasing doses (González-Bulnes et al., 2000, 2002), which is probably because the decreasing-dose protocol mimics better the “wave like pattern” of FSH secretion. In contrast, a recent study of Berlinguer et al. (2004) found that the ovarian response was not influenced by whether FSH was administered in equal or decreasing doses. Furthermore, FSH given in a constant-dose regime tended to produce more embryos. These authors hypothesized that the initial greater doses of FSH in a decreasing dose protocol can induce rapid and abnormal ovarian follicular development and thereby, the de-synchronisation of oocyte-follicle growth, causing a reduction in embryo quality.

Stimulation using the standard superovulatory treatment of eight doses oFSH (Group C2) produced results that are comparable to those reported in other breeds (Forcada et al., 2000; Veiga-Lopez et al., 2005). In addition, Experiment 2 revealed that the simplified protocol using the same oFSH dose plus eCG (Group A2) as well as using a reduced dose of oFSH in such combined protocol (Group B2) resulted in an ovulation rate that was similar to that obtained using the standard protocol of eight doses of oFSH.

The lesser recovery and fertilization rates in the simplified protocols A2 and B2 relative to the standard protocol of eight doses of oFSH alone (C2) would be associated with a tendency to produce more large follicles and/or probably with greater estradiol production. Previous studies (Jabbour and Evans, 1991; Mahmood et al., 1991; Chagas e Silva et al., 2003) have shown that a larger eCG dose can cause the development of large unovulated follicles that persist after ovulation, probably because of the long half-life of this gonadotropin. Such follicles, together with their relatively greater individual hormonal production, can produce abnormally elevated concentrations of estradiol (Jabbour and Evans, 1991), which can affect the uterine environment and, thus, interfere with ova capture by the fimbria (Murray et al., 1994) or with the transport of ova (Murray et al., 1994) and spermatozoa through the female genital tract (Evans and Armstrong, 1984). In the present study, some of the ewes treated with the entire as well as with the reduced dose of oFSH combined with eCG had a greater degree of follicular hyperstimulation, as indicated by the greater ovulation rates, which negatively affected ova retrieval (data not shown). It is probable that the efficiency of ova capture by the fimbria was impaired in these hormonally super-

stimulated ewes. This is consistent with the general pattern of an association between a greater ovarian stimulation and a decrease in oocyte and/or embryo production (Armstrong and Evans, 1983; Martemucci et al., 1988b; Thompson et al., 1995; D'Alessandro et al., 2005). Similarly to the present study, previous studies involving FSH-eCG co-treatments found failures in the rates of fertilization (Ledda et al., 1992) and recovery (Leoni et al., 2001). All of these previous results contrast with the results in Merino ewes (Maxwell and Wilson, 1989), which probably reflects differences among sheep breeds in their sensitivity to the use of such hormones in combination.

According to the classification of the embryos based on their stage of development and morphological appearance, no statistical differences in the number of viable embryos among the treatments were found in the present study in Experiment 2, which determines overall efficiency of the hormonal regimens used. Leoni et al. (2001) reported that embryos derived from FSH-eCG treatments, although apparently normal morphologically, seemed to have fewer cells than did those derived from FSH alone, which might make them more susceptible to vitrification.

In conclusion, the present study demonstrated that simplified protocols can be used to induce superovulation in Corriedale ewes. Among those protocols, administration of oFSH along with eCG in a single injection produced the most desirable ovarian response and tended to result in greater embryo production. The strategy of reducing the oFSH dose in an oFSH-eCG protocol produced results that were similar to that of the conventional multiple-dose protocol; however, the efficiency in embryo production that result from treatments based on a smaller dose of eCG plus FSH requires further study.

## Acknowledgements

We are especially grateful to the Ovine Production Department of INTA Balcarce, supervised by Eng. Carlos Solanet, for providing the animals and installations, as well as collaboration in the execution of the assay. We thank the students of the School of Agrarian Sciences, National University of Lomas de Zamora, for their technical assistance with the laparotomies, Dr. A.F. Parlow and NIDDK for providing the LH antigens, and Dr. Jan Roser for providing the 518b7 monoclonal antibody. The study was supported by National University of Lomas de Zamora (Argentina) and by grant AGL2004-00432 from C.I.C.Y.T. (Spain).

## References

- Ali, J., Shelton, J.N., 1993. Successful vitrification of day-6 sheep embryos. *J. Reprod. Fertil.* 99, 65–70.
- Al-Kamali, A.A., Boland, M.P., Crosby, T.F., Gordon, I., 1985. Reduced superovulatory response in the ewe following repeated gonadotrophin treatment. *Vet. Rec.* 116, 180–181.
- Armstrong, D.T., Evans, G., 1983. Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. *Theriogenology* 19, 31–42.
- Bartlewski, P.M., Beard, A.P., Cook, S.J., Chandolia, R.K., Honaramooz, A., Rawlings, N.C., 1999. 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.
- Berlinguer, F., Leoni, G., Bogliolo, L., Pintus, P.P., Rosati, I., Ledda, S., Naitana, S., 2004. FSH different regimes affect the developmental capacity and cryotolerance of embryos derived from oocytes collected by ovum pick-up in donor sheep. *Theriogenology* 61, 1477–1486.
- Bindon, B.M., Piper, L.R., 1982. Physiological basis of ovarian response to PMSG in sheep and cattle. In: Shelton, J.N., Trounson, A.O., Moore, N.W., James, J.W. (Eds.), *Embryo Transfer in Cattle, Sheep and Goats*. Australian Society for Reproductive Biology, Canberra, pp. 1–5.
- Boland, M.P., Kelly, P., Crosby, T.F., Roche, J.F., 1985. The effect of type and number of FSH injections on superovulatory response in ewes. In: *Proceedings of 111th Meeting on Animal Science*, pp. 524–525 (abstract).

- Chagas e Silva, J., Lopes da Costa, L., Cidado, R., Robalo Silva, J., 2003. Plasma progesterone profiles, ovulation rate, donor embryo yield and recipient embryo survival in native Saloia sheep in the fall and spring breeding seasons. *Theriogenology* 60, 521–532.
- D'Alessandro, A.G., Martemucci, G., 2004. Efficiency of superovulatory treatment with FSH-p for in vivo embryo production in dairy ewes: multiple versus single dose regimen. *J. Anim. Vet. Adv.* 3, 388–393.
- D'Alessandro, A.G., Martemucci, G., Colonna, M.A., Borghese, A., Terzano, M.G., Bellitti, A., 2001. Superovulation in ewes by a single injection of pFSH dissolved in polyvinylpyrrolidone (PVP): effects of PVP molecular weight, concentration and schedule of treatment. *Anim. Reprod. Sci.* 65, 255–264.
- D'Alessandro, A.G., Martemucci, G., Taibi, L., 2005. How the FSH/LH ratio and dose numbers in the p-FSH administration treatment regimen, and insemination schedule affect superovulatory response in ewes. *Theriogenology* 63, 1764–1774.
- Dattena, M., Vespignani, S., Branca, A., Gallus, M., Ledda, S., Naitana, S., Cappai, P., 1994. Superovulatory response and quality of embryos recovered from anestrus ewes after a single injection of porcine FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology* 42, 235–239.
- Evans, G., Robinson, T.J., 1980. The control of fertility in sheep: endocrine and ovarian responses to progestagen-PMSG treatment in the breeding season and in anoestrus. *J. Agric. Sci.* 94, 69–88.
- Evans, G., Armstrong, D.T., 1984. Reduction of sperm transport in ewes by superovulation treatments. *J. Reprod. Fertil.* 70, 47–53.
- Forcada, F., Lozano, J.M., Abecia, J.A., Zúñiga, O., 2000. Repeated superovulation of high prolificacy Rasa Aragonesa ewes before culling as an inexpensive way to obtain high quality embryos. *Livest. Prod. Sci.* 66, 263–269.
- Forcada, F., Abecia, J.A., Cebrián-Pérez, J.A., Muiño-Blanco, M.T., Valares, J.A., Palacín, I., Casao, A., 2006. The effect of melatonin implants during the seasonal anestrus on embryo production after superovulation in aged high-prolificacy Rasa Aragonesa ewes. *Theriogenology* 65, 356–365.
- Fuki, Y., Kano, H., Kobayashi, M., Tetsura, M., Ono, H., 1985. Response to repeated superovulation treatment in the ewe. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 31, 155–157.
- González-Bulnes, A., Santiago-Moreno, J., Cocero, M.J., López-Sebastián, A., 2000. Effects of FSH commercial preparation and follicular status on follicular growth and superovulatory response in Spanish Merino ewes. *Theriogenology* 54, 1055–1064.
- González-Bulnes, A., Garcia-Garcia, R.M., Souza, C.J.H., Santiago-Moreno, J., Lopez-Sebastian, A., Cocero, M.J., Baird, D.T., 2002. Patterns of follicular growth in superovulated sheep and influence on endocrine and ovarian response. *Reprod. Domest. Anim.* 37, 357–361.
- Jabbour, H.N., Evans, G., 1991. Ovarian and endocrine response of Merino ewes to treatment with PMSG and/or FSH-p. *Anim. Reprod. Sci.* 26, 93–106.
- Jabbour, H.N., Ryan, J.P., Evans, G., Maxwell, W.M.C., 1991. Effects of season, GnRH administration and lupin supplementation on the ovarian and endocrine responses on Merino ewes treated with PMSG and FSH-P to induce superovulation. *Reprod. Fertil. Dev.* 3, 699–707.
- Lajous, D., Joly, T., Baril, G., Cognié, Y., Beckers, J.F., 1997. Superovulatory response and quality of embryos recovered from Romanov ewes after a single injection of pFSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. In: *Proceedings of the 13th Meeting Ass. Eur. Trans. Emb. (AETE)*, p. 166 (abstract).
- Ledda, S., Naitana, S., Cappai, P., Branca, A., Lol, P., Forcada, F., Abecia, J.A., Zarazaga, L., 1992. Efecto del tratamiento PMSG + FSHp sobre la superovulación en ovejas de raza Sarda y raza Aragonesa. VI Jornadas Internacionales de Reproducción Animal e Inseminación Artificial, 298–303.
- Leoni, G., Bogliolo, L., Pintus, P., Ledda, S., Naitana, S., 2001. Sheep embryos derived from FSH/eCG treatment have a lower in vitro viability after vitrification than those derived from FSH treatment. *Reprod. Nutr. Dev.* 41, 239–246.
- López-Sebastián, A., Gómez-Brunet, A., Lishman, A.W., Johson, S.K., Inskeep, E.K., 1993. Modification by propylene glycol of ovulation rate in response to a single injection of FSH. *J. Reprod. Fertil.* 99, 437–442.
- López-Sebastián, A., González de Bulnes, A., Santiago Moreno, J., Gómez Brunet, A., Townsend, E.C., Inskeep, E.K., 1999. Effects of follicular status at treatment on follicular development and ovulation in response to FSH in Spanish Merino ewes. *Theriogenology* 52, 505–514.
- Mahmood, S., Kould, G.L., Biswas, J.C., 1991. Comparative efficacy of FSH-P and PMSG on superovulation in Pashmina goats. *Theriogenology* 35, 1191–1196.
- Martemucci, G., Toteda, F., Manchisi, A., Lacalandra, G., Gambacorta, M., 1988a. Risposta al trattamento di superovulazione con PMSG in pecore di razza Gentile di Puglia y Altamura. Fecondità successiva a trapianto di embrioni (Superovulatory response to PMSG in Gentile di Puglia and Altamura breeds of sheep. Fecundity following embryo transfer). *Zoot. Nutr. Anim.* 14, 165–172.

- Martemucci, G., Gambacorta, M., Toteda, F., Manchisi, A., Bellitti, E., 1988b. Induzione della superovulazione nella pecora con PMSG, FSH-P, hMG, per il trapianto di embrioni (Superovulation by PMSG, FSH-P, hMG for embryo transfer in ewes). *Zoot. Nutr. Anim.* 15, 379–386.
- Maxwell, W.N.C., Wilson, H.R., 1989. Superovulation and embryo recovery in ewes treated with a single injection of PMSG and FSH-P. *Proc. Austr. Soc. Reprod. Biol.* 21, 50 (abstract).
- McEvoy, T.G., Robinson, J.J., Aitken, R.P., Robertson, I.S., 1996. The effect of time of intrauterine insemination on the development and viability of embryos collected from superovulated ewes. *Theriogenology* 46, 727–738.
- McKelvey, W.A.C., Robinson, J.J., Aitken, R.P., Robertson, I.S., 1986. Repeated recoveries of embryos from ewes by laparoscopy. *Theriogenology* 25, 855–865.
- Murray, J.F., Downing, J.A., Scaramuzzi, R.J., Evans, G., 1994. Heterogeneity in ovarian steroid secretion response to treatment with PMSG in ewes during the breeding season and anestrus. *Theriogenology* 42, 1337–1347.
- Naqvi, S.M.K., Gulyani, R., 1998. The effect of gonadotrophin releasing hormone and follicle stimulating hormone in conjunction with pregnant mare serum gonadotrophin on the superovulatory response in crossbred sheep in India. *Trop. Anim. Health Prod.* 30, 369–376.
- Naqvi, S.M.K., Gulyani, R., 1999. Ovarian response and embryo recovery to different superovulatory regimens in Rambouillet ewes under semiarid conditions. *Small Rumin Res.* 34, 127–131.
- Rexroad Jr., C.E., Powell, A.M., 1991. FSH injections and intrauterine insemination in protocols for superovulation of ewes. *J. Anim. Sci.* 69, 246–251.
- Riesenberg, S., Meinecke-Tillmann, S., Meinecke, B., 2001. Ultrasonic study of follicular dynamics following superovulation in German Merino ewes. *Theriogenology* 55, 847–876.
- Ryan, J.P., Hunton, J.R., Maxwell, W.M.C., 1991. Increased production of sheep embryos following superovulation of Merino ewes with a combination of pregnant mare serum gonadotrophin and follicle stimulating hormone. *Reprod. Fertil. Dev.* 3, 551–560.
- SAS Institute Inc., 1999. SAS/STAT. Software Version 8. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Scaramuzzi, R.J., Adams, N.R., Baird, D.T., Campbell, B.K., Downing, J.A., Findlay, J.K., 1993. A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reprod. Fertil. Dev.* 5, 459–478.
- Schiewe, M.C., Fitz, T.A., Brown, J.L., Stuart, L.D., Wildt, D.E., 1991. Relationship to oestrus synchronization method, circulating hormones, luteinizing hormone and prostaglandin F-2 $\alpha$  receptors and luteal progesterone concentration to premature luteal regression in superovulated sheep. *J. Reprod. Fertil.* 93, 19–30.
- Shelton, J.N., Moore, N.W., 1967. The response of the ewe to pregnant mare serum and to horse anterior pituitary extract. *J. Reprod. Fertil.* 14, 175–177.
- Spearow, J.L., Trost, B.A., 1987. Development of a sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for cattle, sheep, rat and mouse luteinizing hormone. *Biol. Reprod.* 37, 595–605.
- Thompson, J.G., Bell, A.C.S., McMillan, W.H., Peterson, A.J., Tervit, H.R., 1995. Donor and recipient ewe factors affecting in vitro development and post-transfer survival of cultured sheep embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 40, 269–279.
- Torrès, S., Cogne, Y., Colas, G., 1987. Transfer of superovulated sheep embryos obtained with different FSH-P. *Theriogenology* 27, 407–419.
- Valares, J.A., Abecia, J.A., Forcada, F., Palacín, I., Mata, L., Razquin, P., 2007. Development of a simple enzyme immunoassay for the determination of ovine luteinizing hormone. *Vet. Res. Commun.* 31, 427–436.
- Veiga-Lopez, A., González-Bulnes, A., Garcia-Garcia, R.M., Domínguez, V., Cocero, M.J., 2005. The effects of previous ovarian status on ovulation rate and early embryo development in response to superovulatory FSH treatments in sheep. *Theriogenology* 63, 1973–1983.
- Winterberger-Torres, S., Sevellec, C., 1987. Atlas of the Early Development of the Sheep Embryo. INRA, Paris.