

# UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

Departamento Ciencia Animal



## ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD OVÁRICA DE LA RAZA OVINA GUIRRA

**TESIS FINAL DE MASTER**

**Alumno:**

Begoña Cebrián Yuste.

**Directora:**

Dra: M<sup>a</sup> Pilar Viudes de Castro

Valencia, diciembre 2008.

Agradecimientos:

Me gustaría dedicar este trabajo a mi familia, (padres y hermana M<sup>a</sup> Carmen) por su apoyo incondicional y su paciencia en este año que decidí volver a estudiar después de 8 años.

En el tiempo que he estado trabajando en granjas nunca dejé de lado los estudios porque me apasiona mi trabajo, pero el hecho de volver a estudiar un MASTER me ha ayudado a reconocer que siempre hay que estar abierta a nuevas experiencias y espero que me sirva en un futuro.

Tengo que agradecer de forma muy especial a los directores del centro CITA ( Manolo y Ernesto), gracias por confiar en mi.

También me gustaría dedicar este trabajo a Pilar Viudes por su entrega y su confianza depositada en mi para la defensa de este trabajo, por supuesto no me olvido de mis compañeros del master y compis de trabajo del CITA, (Irene, Alba, Arantxa, Mar, Paula, Carmela), también me gustaría dedicárselo a José porque empezamos juntos el camino en agrícolas y lo recuerdo con gran cariño.

Por supuesto que mi familia adoptiva, Rafael y Vicenta también este trabajo se lo debo a ellos.

Por último me gustaría también nombrar a mis amigos más cercanos, ( Manolo, Jorge, M<sup>a</sup> Jose, Eva y Fran, Raquel, Merce, Abel, Susana, Maite, Mati, Pili, M<sup>a</sup>José B), gracias por estar ahí siempre.

Bueno me despido y espero que con este trabajo todos podamos ver la problemática de la raza Guirra y darles todo el cariño que se merecen.

## RESUMEN

La aplicación en ovino de diferentes técnicas reproductivas pasan por el conocimiento de la actividad ovárica y su control fisiológico. En la raza ovina Guirra la creación de un banco de germoplasma permitiría garantizar este recurso genético único en la Comunidad Valenciana, ya que este tipo de bancos pueden mantener la variabilidad genética de una especie indefinidamente. Por ello, los esfuerzos han de centrarse en conocer la fisiología reproductiva de esta especie y en caracterizar su ciclo estral ya que el conocimiento de la dinámica ovárica de esta raza nos permitirá ajustar un buen esquema de sincronización y superovulación para la obtención de embriones. Para estudiar la actividad ovárica se utilizaron 12 ovejas con una condición corporal semejante. A lo largo de todo el año se extrajeron 3 veces por semana muestras de sangre de todos los animales. Se determinó la concentración de progesterona mediante el uso de fluorimetría a tiempo-resuelto. El análisis de los datos nos muestra que la actividad cíclica de esta raza se extiende desde el mes de julio hasta el mes de febrero, y que presenta un anestro estacional a partir de marzo hasta el mes de junio.

## INTRODUCCIÓN

La raza ovina Guirra (Sudat o Roja Levantina) es la única oveja autóctona de la Comunidad Valenciana. De origen africano, ha dado lugar a una peculiar raza con capa de color rojizo (única en la Península Ibérica), con un alto grado de untuosidad en su lana por su abundante suarna y que se caracteriza por el perfil frontonasal convexo, muy marcado en los machos. Esta raza tiene una constitución fuerte y se adapta muy bien a los terrenos secos y áridos y las hembras tienen buen comportamiento maternal. Diversas razas y variedades de animales de interés ganadero han sufrido una importante disminución de su población hasta llevarlas a cotas próximas a la extinción. Entre las muchas y distintas causas por las que esto ocurre, pueden citarse la introducción de material genético foráneo, determinadas políticas agrarias, la demanda cambiante de los mercados o la degradación de los ecosistemas. Así, la poca tradición ganadera de la Comunidad Valenciana, la elevada edad media de los ganaderos en activo (el 63% de los titulares de los rebaños se hallan próximos a la edad de jubilación, y solamente un 8% de los ganaderos posee menos de 40 años, mientras que el 29% tienen una edad comprendida entre los 40-55 años) y la falta de aliciente oficial para mantener viva la raza, son sólo algunas de las causas que han provocado el gran retroceso del sector ovino en la Comunidad Valenciana.

En pequeños rumiantes, tecnologías reproductivas tales como la congelación y transferencia de embriones son importantes herramientas que permiten incrementar la tasa reproductiva de hembras seleccionadas (Cognie, 1999) o de razas autóctonas en peligro (Solti et al, 2000) además de constituir las metodologías idóneas para el control sanitario en los intercambios de germoplasma (Thibier and Guérin, 2000). En la creación de bancos de germoplasma se contempla como paso inicial la aplicación de tratamientos de superovulación mediante la administración de gonadotropinas de

origen exógeno, por lo que en los tratamientos de superovulación se tendrán que vencer los mecanismos inhibidores establecidos por el folículo dominante (González-Bulnes A., 2006). En el caso de la raza Guirra la creación de un banco de germoplasma permitiría garantizar este recurso genético único en la Comunidad Valenciana, ya que este tipo de bancos pueden mantener la variabilidad genética de una especie indefinidamente. Además, la crioconservación de gametos permite reducir considerablemente el número de individuos necesario para mantener una población viable y por lo tanto, reducir las necesidades de espacio que se requieren para recuperar una especie. Tanto las dosis de semen como los embriones guardados pueden ser utilizados durante muchos años. A pesar de las ventajas, la principal limitación es el empleo de biotecnologías reproductivas para la recuperación de especies amenazadas, ya que existe un desconocimiento de la reproducción de estas especies.

La temperatura ambiental, el fotoperiodo, la localización geográfica y el estado nutricional son los factores más decisivos en el control de la reproducción (Godfrey and Dodson, 2003; Kleemann and Walker 2005; Marai et al 2007). Varios estudios realizados en cámaras climáticas con ovejas demuestran que un estrés térmico prolongado puede afectar a la concentración plasmática de progesterona (Wheeler and Blackshaw 1986; Bell et al 1989), de igual forma, el estrés natural durante el verano interfiere la producción de progesterona de las hembras gestantes (Alí and Hayder, 2008). La influencia de la latitud a través del fotoperiodo se ve reflejada en el aumento gradual de la duración del periodo de inactividad ovulatoria a medida que las razas se sitúan hacia los polos (Hafez, 2000). En regiones templadas, las diferentes razas ovinas se comportan como reproductores estacionales con un máximo de actividad sexual durante el periodo de luz decreciente (Ortavan et al., 1985). No obstante, en países europeos situados en una latitud 40°N, las ovejas son estacionales estrictas y la mayoría de las razas sólo muestran actividad cíclica ovárica

de septiembre a febrero/marzo, permaneciendo en anestro durante la primavera y el verano (Chemineau et al, 1992). En Francia se ha visto que la tasa de ovulación media y el número de embriones viables recuperados en ovejas Lacaune era significativamente mayor en Noviembre que en Abril (Torres et al., 1987). Sin embargo, esto no se ha observado en la raza Manchega criada en Madrid, a una latitud de 40°N (López Sebastián et al., 1990). Por otra parte, en la mayoría de las hembras de mamíferos, tras el parto se produce un periodo de ausencia de actividad reproductiva (anestro post-parto), en el que el sistema reproductivo retoma su integridad funcional normal del periodo no gestante (Mitchell et al., 1998). En el caso del ovino, si el parto ocurre en la estación reproductiva, el periodo de anestro post-parto dura normalmente un mes (Soltner, 1989), mientras que si éste ocurre en época de anestro, la ausencia de actividad ovárica puede prolongarse hasta la próxima estación reproductiva. Por todo ello, el hecho de realizar estos tratamientos en primavera podría perjudicar la respuesta de las hembras. De ahí que en las ovejas, la utilización de dos en vez de una estación reproductiva por año, tendría un mayor impacto en la aplicación de biotecnologías reproductivas.

La raza ovina Guirra según el catálogo de la FAO y de acuerdo con el Real Decreto 1682/97 de 24 de Junio, BOE nº279 (21/11/1997) está catalogada como raza autóctona en peligro de extinción y se dispone de muy poca información científica sobre su función reproductiva. Con un censo de 3640 hembras y 174 machos (Peris et al., 2002), hay que destacar que más de la mitad de la población actual se halla concentrado en sólo 6 rebaños (1.534 animales). En la actualidad está incluida en el Catálogo Oficial de Razas de Ganado de España como raza pura de protección especial, según la Orden APA/661/2006 de 3 de marzo que ha sustituido al RD 1682/97.

La aplicación en ovino de diferentes técnicas reproductivas (sincronización e inducción de celos, inseminación artificial, superovulación, congelación, transferencia de embriones, etc) pasan por el conocimiento de la actividad ovárica y su control fisiológico. Por ello, los esfuerzos han de centrarse en conocer la fisiología reproductiva de las especies amenazadas y en caracterizar los ciclos sexuales de las hembras, desarrollar protocolos de sincronización de celos, y determinar el momento óptimo de la ovulación mediante el análisis de perfiles hormonales para así desarrollar protocolos de sincronización y superovulación adaptados a cada especie.

La progesterona es la hormona cuyas oscilaciones mejor define el ciclo ovárico y el estudio de su concentración durante un periodo de tiempo dilatado permite establecer la actividad ovárica. La concentración de progesterona puede ser determinada empleando diferentes técnicas como enzima inmunoensayo (ELISA, Eckersall et al., 1987; Mukasa-Mugerwa et al., 1992a:1992b; Boscós et al. 2003) o radio inmunoanálisis (RIA, López-Sebastian et al., 1984; Mac Donnell et al., 1988; Zarkawi et al., 1997). Este último grupo de técnicas tienen como limitante el uso de la radioactividad en su medición, por lo que a priori, parece más adecuado la elección de técnicas tipo ELISA que no requieran el empleo de radiactividad.

## OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo fue la determinación de la actividad ovárica cíclica de esta raza a través de la medida de los niveles de progesterona presentes en sangre a lo largo de todo un año.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Material animal:

Para estudiar la actividad ovárica anual se utilizaron un total de 12 ovejas de la raza Guirra con una condición corporal semejante.

Recogida de muestras sanguíneas:

A lo largo de todo el año, se procedió a la extracción, tres veces por semana, de muestras de sangre de todas las ovejas mediante punción en la vena yugular, recogiendo la sangre en tubos heparinizados. Una vez extraídas las muestras de sangre, el plasma fue recuperado post-centrifugación (3000 rpm, durante 20 minutos) y almacenado a -80°C hasta su posterior análisis.

Tratamiento de sincronización:

Para no alterar los resultados de los niveles de progesterona plasmática, se llevó a cabo una sincronización del celo mediante una doble administración de prostaglandinas durante el mes de octubre. Las hembras fueron divididas aleatoriamente en cuatro lotes que fueron sincronizados con una semana de diferencia entre ellos. A todas las hembras se les aplicaron 2 ml de dinoprost trometanol, (Enzaprost T, CEVA SALUD ANIMAL; Barcelona, España) intramuscularmente el día 1 y el día 10 recibían una segunda inyección de prostaglandinas junto con una

inyección de 250-400 UI de gonadotropina coriónica equina (Sincropart, CEVA SALUD ANIMAL; Barcelona, España). Para la detección del estro y la monta, las hembras fueron alojadas con dos machos a las 21 h tras el segundo tratamiento con prostaglandinas que permanecieron con ellas durante 48 h., a excepción de dos hembras a las que no se les introdujo el macho en el corral.

#### Determinación de la tasa de ovulación:

El día 18, todas las hembras fueron sometidas a un examen laparoscópico para confirmar la existencia de ovulación. A las hembras se les privó de alimentación de 24 a 36 horas antes de la intervención y también se les retiró el agua 12 horas antes. En el momento del examen laparoscópico, los animales fueron preanestesiados con 0.1 ml de xilacina 2% y a continuación se les suministró 2,2 ml de clorhidrato de ketamina (Imalgene 500, Merial, Lyon, Francia) administrados por vía intravenosa. Durante la laparoscopia los animales se mantenían en decúbito supino con un ángulo de 45° de inclinación. Se evaluaba el estado de sus ovarios y se anotaba el número de cuerpos lúteos presentes. Tras cada intervención, a todos los animales se les administró un antibiótico de amplio espectro además de un analgésico con efecto anti-inflamatorio.

#### Análisis plasmáticos de progesterona:

La determinación de la concentración de progesterona se llevó a cabo mediante fluorimetría a tiempo-resuelto (DELFLIA, Perkin Elmer, Turku, Finland).

El ensayo DELFLIA de progesterona es un fluoroinmunoensayo en fase sólida que se basa en la competencia que se da entre la progesterona marcada con europium y la progesterona de la muestra por los anticuerpos policlonales anti-progesterona (producidos en conejo). El patrón, el control y las muestras experimentales que contienen progesterona inhiben la unión de la progesterona marcada con europium a las moléculas de anticuerpos. En el tampón de muestra del

ensayo está presente el danazol, sustancia que facilita la liberación de progesterona de las proteínas de unión de la muestra. Tapizando la fase sólida se encuentra un anticuerpo secundario (contra las IgG de conejo) al que se unirá el complejo IgG-progesterona, obteniéndose una conveniente separación de los puentes del anticuerpo y antígeno libre. De ahí que en este ensayo se requiera solo una etapa de incubación. Se utiliza una solución potenciadora que lo que hace es disociar los iones Europium de la progesterona marcada de la solución, y estos iones junto con componentes de esta solución forman quelatos que emiten mucha fluorescencia. Dicha fluorescencia es inversamente proporcional a la concentración de progesterona de la muestra. La medida de la fluorescencia se llevó a cabo con un lector de placas automático.

Las determinaciones de las muestras y de los patrones se realizaban por duplicado. Una vez medida la fluorescencia, se representaba la curva patrón del logaritmo de las concentraciones de los patrones frente al cociente de su medida de fluorescencia respecto al blanco ( $B/B_0$ ), se calculaba la ecuación de regresión y se procedía a interpolar los valores obtenidos de las muestras ensayadas para calcular sus correspondientes concentraciones. Se consideró con actividad ovárica aquellos animales que presentaban valores de progesterona superiores a 1ng/ml.

Análisis estadísticos:

Para estudiar el efecto de la estación del año sobre la producción de progesterona, se agruparon los datos bimestralmente y se llevó a cabo una transformación logarítmica de la variable, analizándose mediante un ANOVA, utilizando el procedimiento General Linear Models (GLM) del Statgraphics®Plus5.1 (Statistical Graphics Corp., Rockville, MO, USA), considerando los factores: hembra, bimestre y su interacción, y como variable la concentración de progesterona.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diez de las doce hembras presentaron cuerpos lúteos en sus ovarios en el momento de la realización de la laparoscopia, y en dos casos aparecieron folículos persistentes de gran tamaño, que tras la realización de los análisis de progesterona pudo comprobarse que estaban luteinizados, ya que en ambos casos su presencia en el ovario correspondía con niveles elevados de progesterona en sangre. De las diez hembras restantes, cuatro quedaron gestantes. Todas las hembras no gestantes reiniciaron nuevos ciclos y mantuvieron su actividad cíclica hasta el mes de Marzo (Gráfica 1).

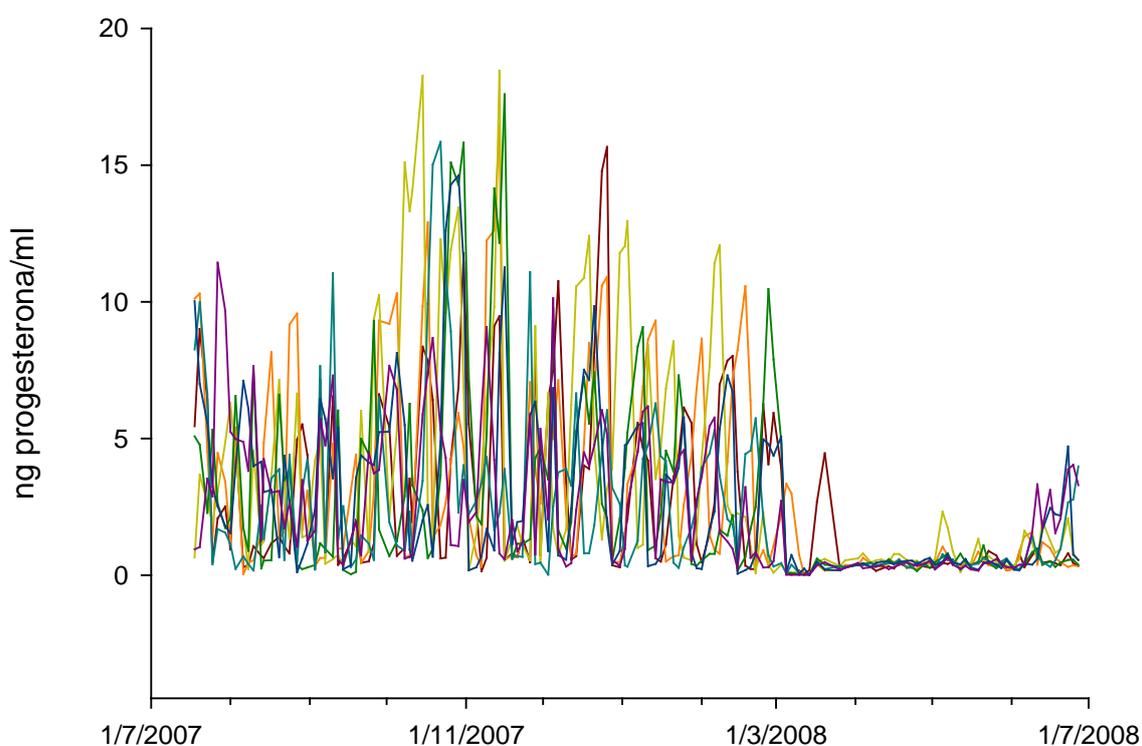
Se analizaron un total de 1.764 muestras de suero por duplicado, correspondientes a las 52 semanas experimentales. La máxima sensibilidad obtenida en el ensayo fue de 0,18 ng/ml. Los coeficientes de variación intra-ensayo y Inter.-ensayo fueron del 9,8% y 11,3% respectivamente.

Para llevar a cabo una mejor visualización de los perfiles hormonales de las hembras, se presentan por separado los perfiles hormonales de las hembras gestantes y las no gestantes.

Tal y como puede observarse en los gráficos 1 y 2, en todas las hembras se produce una elevación de los niveles plasmáticos de progesterona a finales de Junio, principios de Julio, mientras que durante el mes de Marzo, a excepción de una hembra que presentó un ciclo estral en este mes, el resto de los animales mostraban niveles plasmáticos de progesterona muy reducidos, sin presencia de ciclos estrales.

Durante la época de actividad sexual, la concentración de progesterona en las hembras no gestantes llega a alcanzar los 18 ng de progesterona por mililitro, que corresponde a los niveles máximos por la presencia de cuerpos lúteos (fase luteal) y desciende hasta los 0,43 ng/ml que corresponde a los niveles mínimos de la fase folicular en esta época.

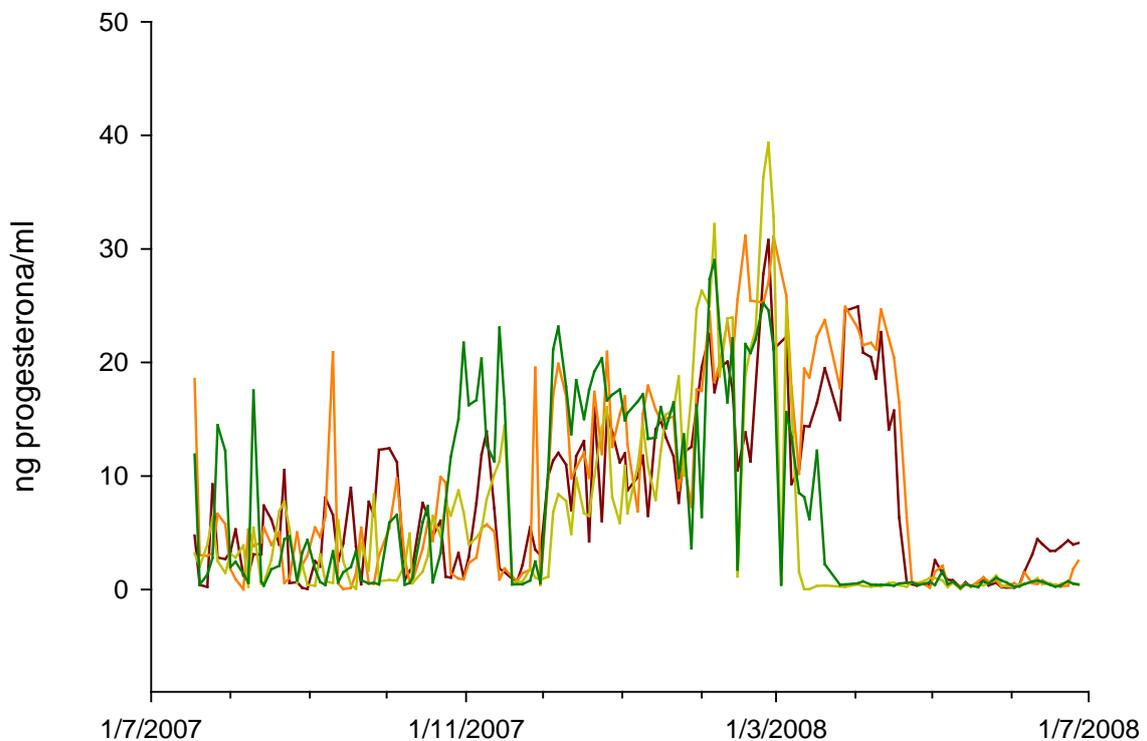
Gráfico 1. perfil hormonal de niveles plasmáticos de progesterona de hembras no gestantes.



Existen muy poca información disponible sobre los niveles de progesterona plasmática en ovino, lo habitual es que se lleven a cabo determinaciones de sus niveles en momentos muy puntuales. Los resultados de este experimento muestran que todas las ovejas analizadas mostraban un comportamiento similar, por lo que puede concluirse que la raza ovina Guirra presenta un periodo de inactividad sexual que se extiende desde el mes de Marzo hasta finales del mes de Junio, lo que

coincide con los resultados que muestran las razas ovinas españolas en el área mediterránea (Gómez Brunet y López Sebastian, 1991) y con la mayoría de razas del sur de Europa, en las que la estación reproductiva comienza alrededor del solsticio de verano (Gallegos-Sanchez et al., 1998). Sin embargo, en otras razas españolas como la Rasa Aragonesa, se observó que más del 50% de las ovejas presentaban ciclicidad ovárica durante la primavera (Alonso de Miguel y Cognié, 1980). Los datos obtenidos en la raza Guirra, indican que en marzo no hay una ciclicidad ovárica, presentando un anestro estacional de casi cuatro meses, mientras que la Rasa Aragonesa presenta un anestro de tres meses únicamente, correspondiendo a los meses de verano (Abecia et al., 1992).

Gráfico 2: Perfil hormonal de los niveles plasmáticos de las hembras gestantes.



En el caso de las hembras gestantes, en el gráfico 2 podemos observar que durante la gestación, los niveles de progesterona van aumentando hasta alcanzar un máximo en el último tercio, llegando en algunos casos a niveles próximos a 45 ng de progesterona por mililitro, produciéndose un descenso brusco en el día previo al parto. Además, como los partos tuvieron lugar en época de anestro, vemos que la ausencia de actividad ovárica se prolonga hasta el mes de Julio (siguiente estación reproductiva) lo que coincide con las observaciones de Mitchell et al.(1998).

En lo que se refiere al efecto de la estación sobre la producción de progesterona, se analizaron los datos de producción bimestralmente y se obtuvieron diferencias significativas entre los meses de septiembre-octubre y noviembre-diciembre frente a enero-febrero, marzo-abril y mayo-junio, tal y como se observa en la tabla 1 ( $P<0.05$ ).

Si consideramos el inicio de la época de actividad cíclica de las hembras, podemos observar que la producción de progesterona difiere significativamente en los dos primeros meses de actividad, Julio-Agosto, con respecto a los dos meses siguientes (Septiembre-Octubre), lo que estaría de acuerdo con los resultados obtenidos por otros autores que observan un efecto negativo de las altas temperaturas sobre la producción de progesterona (Wheeler and Blackshaw 1986; Bell et al 1989; Alí and Hayder, 2008). Por otra parte, la producción de progesterona fue significativamente superior durante los meses de Noviembre-Diciembre frente a los obtenidos durante los meses de Enero-Febrero ( $P<0,05$ ), lo que coincide con los resultados obtenidos por otros autores en distintas razas ovinas (Michelll et al. 1999; Wallace et al. 1997; Xia et al. 2003).

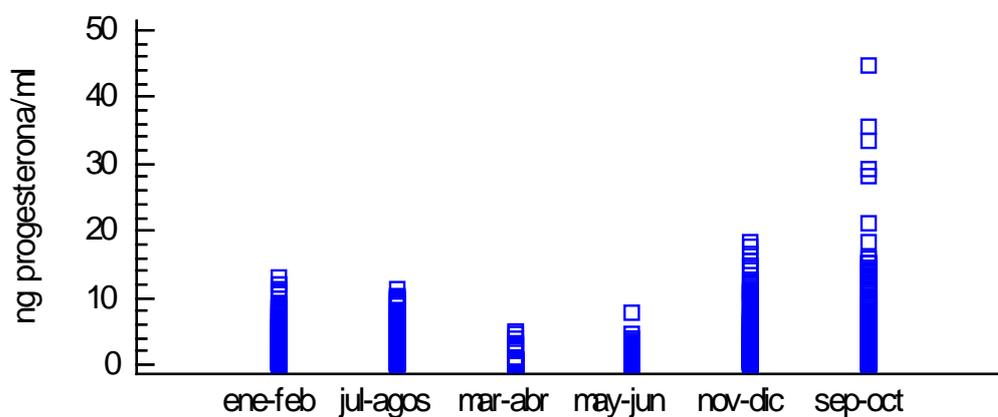
Tabla 1: Producción bimestral de progesterona a lo largo del año de las hembras no gestantes (media  $\pm$  error estándar).

Bimestre	N	ng Progesterona/ml
Septiembre-Octubre	207	5.43 $\pm$ 0.25a
Noviembre-Diciembre	208	4.10 $\pm$ 0.25ab
Enero-Febrero	208	3.23 $\pm$ 0.25c
Marzo-Abril	184	0.53 $\pm$ 0.26e
Mayo-Junio	200	0.87 $\pm$ 0.25d
Julio-Agosto	159	3.39 $\pm$ 0.28bc

a,b,c,d,e Valores in la misma columna con diferente letra son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Si representamos la producción bimestral de progesterona (Gráfica 3) se puede observar claramente la evolución que presentan los niveles plasmáticos de progesterona.

Gráfica 3: producción bimestral de progesterona



Así, en los meses de marzo, abril, mayo y junio la media de progesterona presente en sangre se sitúa muy por debajo del resto de los meses, lo que corresponde con el anestro en esta raza, mientras que a partir del mes de julio se puede apreciar un aumento progresivo de la concentración plasmática de progesterona, que alcanza su máximo en los meses de septiembre y octubre, manteniéndose elevados hasta enero-febrero, y a partir de ese momento comienza a declinar.

De los resultados obtenidos en el presente trabajo podemos concluir que la raza ovina Guirra presenta una estación de anestro muy marcada, que se extiende desde el mes de Marzo hasta prácticamente el mes de Julio, y que además, la producción de progesterona se incrementa significativamente en los meses de septiembre y octubre, y a partir de ese momento, parece que la producción de progesterona comienza a declinar hasta que alcanza valores mínimos en el mes de marzo, por lo que los meses de septiembre y octubre serían los idóneos para iniciar un programa de superovulación y recuperación de embriones. Por otra parte, al comenzar la actividad cíclica de las hembras en verano, se podría maximizar la eficacia de los programas de obtención de embriones ya que se dispone de 8 meses en los cuales la hembra está cíclica y con niveles altos de progesterona.

## BIBLIOGRAFIA

- Ali A, Hayder M. Seasonal variation of reproductive performance, foetal development and progesterone concentrations of sheeps in the subtropics. *Reprod Dom Anim.* 2008, 43: 730-734.
- Abecia JA. Efecto del plano de alimentación y del nivel de reservas sobre los parámetros reproductivos en ovejas de raza Rasa Aragonesa durante el anoestro estacionario y al inicio de la época de actividad sexual. 1992. Tesis doctoral, Universidad de Zaragoza.
- Alonso de Miguel M, Cognié Y. Variaciones de la actividad sexual de la oveja "Rasa Aragonesa" durante el período del anoestro estacionario. Efecto de la edad, de las condiciones climáticas y, de la presencia de machos. IX Congreso Internacional de Reproducción Animal e Inseminación Artificial, Madrid, 1980, 387-392.
- Bell AW, McBride BW, Slepets R, Early RJ, Curie WB. Chronic heat stress and prenatal development in sheep: 1. Conceptus growth and maternal plasma hormones and metabolites. *J Anim Sci* 1989, 67: 3289-3299.
- Boscós CM, Samartzi FC, Lymberopoulos AG, Stefanakis A, Belibasaki S. Assessment of progesterone concentration using enzymeimmunoassay, for early pregnancy diagnosis in sheep and goats. *Reprod Domest Anim* 2003;38:170-174.
- Chemineau P, Malpoux B, Delgadillo JA, Guérin Y, Ravault JP, Thimonier J, et al. Control of sheep and goat reproduction: use of light and melatonin. *Anim Reprod Sci* 1992;30: 157-84.
- Cognié Y. State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology* 1999; 51:105-116.
- Eckersall PD, Harvey MJ. The use of a bovine plasma progesterone ELISA kit to measure progesterone in equine, ovine and canine plasmas. *Vet Rec* 1987;120:5-8.

- FAO. Lista Mundial de Vigilancia para la Diversidad de los Animales Domésticos. (2ª EDICION). Roma, Julio 1997.
- <http://www.fao.org/docrep/V8300S/V8300S00.htm>. (2007).
- Gallegos-Sanchez J, Malpaux B, Thiery JC. Control of pulsatile LH secretion during seasonal anoestrus in the ewe. *Reprod Nutr Dev* 1998;38:3-15.
- Godfrey RW, Dodson RE. Effect of supplemental nutrition around lambing on hair sheep ewes and lambs during the dry and wet season in the U.S. Virgin Islands. *J. Anim Sci*, 2003. 81: 587-593.
- Gómez Brunet A., López-Sebastian A. 1991. Effect of Season on plasma concentrations of prolactin and cortisol in pregnant, non pregnant and lactating ewes. *Anim. Reprod. Sci.* 26, 251-268.
- González- Bulnes A. Patrones y mecanismos de control del desarrollo folicular y la ovulación en pequeños rumiantes. En: XXIX Curso internacional de reproducción animal. Impreso en el Dpto de Publicaciones de la E.U.I.T.A. Julio de la Fuente Martínez y Fernando Saiz Cidoncha (editores). INIA-AECI. 2006.
- Hafez ESE. In: *Reproduction in farm animals*, Hafez B/Hafez- ESE ( ed ). Lippincott Williams and Wilkins, USA 2000.
- Kleeman D.O, Walker SK. Fertility in South Australian commercial Merino flocks: relationships between reproductive traits and environmental ewes. *Theriogenology*, 2005. 63: 2416-2433.
- López Sebastián A, Cognié Y, Cocero MJ, De la Fuente J, Poulin N. Effect os season and duration of FSH treatment on embryo production in sheep. *Theriogenology* 1990; 34: 175-180.
- Mac Donnell HF, Mullins S, Gordon AC. Radioimmunoassay and enzymeimmunoassay of plasma progesterone as monitors of progesterone sponge treatment in ewes. *Theriogenology* 1988; 30: 303-321
- Marai IFM, El-Darawany AA, Fadiel A, Abdel-Hafez HAM. Physiological traits as affected by heat stress in sheep-a review. *Small Rumin Res* 2007,71:1-12.

- Mitchell LM, King ME, Aitken RP, Gebbie FE, Wallace JM. Ovulation, fertilization and lambing rates, and peripheral progesterone concentrations, in ewes inseminated at a natural oestrus during November or February. *J Reprod Fertil* 1999;115, 133-140.
- Mitchell LM, King ME, Gebbie FE, Ranilla MJ, Robinson JJ. Resumption of Oestrus and ovarian cyclicity during post-partum period in autumn-lambing ewe is not influenced by age or dietary protein content. *Anim Sci* 1998;67:65-72.
- Mukasa-Mugerwa E, Mutiga ER, Girma A. Studies on the reproductive performance of Ethiopian sheep by means of an enzyme immunoassay technique; a review. *Reprod Fertil Dev* 1992a;4:523-532.
- Mukasa-Mugerwa E, Viviani P. Progesterone concentrations in peripheral plasma of Menzsheep during gestation and parturition. *Small Ruminant Res* 1992b;8:47-53.
- Ortavan R., Pelletier J., Ravault J.P., Thimonier J., Volland-Nail P. Photoperiod: main proximal and distal factor of the circannual cycle of reproduction in farm animals. En: J.R. Clarke (Editor) *Oxford Reviews of Reproductive Biology*, Oxford University Press, Oxford, 1985; 7: 305-345.
- Parra MD, Garcia AJ, Bernal LJ, Landete-Castillejos T, Ceron JJ. Progesterone determination in Iberian red deer by time-resolved fluorometry: an alternative method to RIA. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 2004; 301: 472-476.
- Peris B, Corpa JM, García A, Rodríguez M, Ibor I, López S, Lainez M. Situación sociocultural de los rebaños de la raza Guirra en la Comunidad Valenciana. XXVII Jornadas científicas y Jornadas internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC), Valencia, 2002:897-901.
- Soltner D. La reproduction des animaux d'élevage. *Zootecnie générale*. Tomo 1. Collection Sciences et techniques Agricoles, 1989:229.

- Solti L., Crichton EG, Loskutoff NM, Cseh S. Economical and ecological importance of indigenous livestock and application of assisted reproduction to their preservation. *Theriogenology* 2000; 53: 149-162.
- Torres S, Cognié Y, Colas G. Transfer of superovulated sheep embryos obtained with different FSH-P. *Theriogenology* 1987; 27: 407-419.
- Thibier M., Guérin B. Embryo transfer in small ruminants: the method of choice for health control in germplasm exchange. *Livestock Prod Sci* 2000; 62: 253-270.
- Wallace JM, Aitken RP, Cheyne MA, Humblot P, 1997: Pregnancy-specific protein B and progesterone concentrations in relation to nutritional regimen, placental mass and pregnancy outcome in growing adolescent ewes carrying singleton fetuses. *J Reprod Fertil* 109, 53-58.
- Wallace JM, Robinson JJ, Wigzell S, Aitken RP. Effects of melatonin on the peripheral concentrations of LH and progesterone after oestrus, and on conception rate in ewes. *Journal of Endocrinology* 1988;119:523-530.
- Wheeler AG, Blackshaw AW. Effect of cold and hot ambient temperatures on plasma progesterone concentrations in ewes with intact and denervated ovaries containing experimentally maintained corpora lutea. *J Reprod Fertil.*1986. 78: 353-360.
- Xia Y, O`Shea T, Murison R, McFarlane JR. Concentrations of progesterone, follistatin, and follicle-stimulating hormone in peripheral plasma across the estrous cycle and pregnancy in merino ewes that are homozygous or noncarriers of the Booroola gene. *Biol Reprod* . 2003, 69: 1079-1084.
- Zarkawi M. Monitoring the reproductive performance in Awassi ewes using progesterone radioimmunoassay. *Small Ruminant Res* 1997;27:291-294.