

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA  
FACULTAD DE CIENCIAS



"INMUNONEUTRALIZACION DE ESTEROIDES OVARICOS  
EN OVEJAS RASA ARAGONESA. INCIDENCIA EN LOS  
PARAMETROS REPRODUCTIVOS"

Tesis para aspirar al grado  
de Doctor, presentada por  
D. JOSE LUIS ALABART ALVAREZ  
Licenciado en Ciencias Químicas

Edita: Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias  
Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación  
ISSN: 0210-3362  
ISBN: 84-7498-391-6  
NIPO: 252-91-007-4  
Depósito Legal: M-8280-1991  
Diseño: INIA  
Imprime: INIA José Abascal 56 28003 MADRID

V<sup>o</sup> B<sup>o</sup>

EL DIRECTOR DE LA TESIS

Dr. D. José Folch Pera

ZARAGOZA, 1988



***A mis padres, profesores y amigos,  
así como a todos aquellos que a lo  
largo de mi vida han confiado en mí.***

## **AGRADECIMIENTOS**

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a las siguientes personas e Instituciones:

A los Dres. D. XAVIER ALIBES ROVIRA, Director del Servicio de Investigación Agraria (Diputación General de Aragón) y D. FRANCISCO COLOMER-ROCHER, Jefe de la Unidad de Producción Animal del citado Centro, por los medios y facilidades que han puesto a mi disposición en la realización del presente trabajo, así como por sus palabras de ánimo y confianza a lo largo del mismo.

Al Dr. D. JOSE FOLCH PERA, Investigador de dicho Centro, director de esta Tesis, verdadero profesor y compañero de trabajo al mismo tiempo, por su entusiasmo y disponibilidad en todo momento.

Al Prof. Dr. D. ANDRES PIÑEIRO ANTON, del Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza, de quien recibí los primeros conocimientos de Inmunología e Inmunoquímica, por sus acertados consejos así como por las múltiples gestiones realizadas.

Al Dr. D. MICHEL TERQUI, Investigador de la Station de Physiologie de la Reproduction (INRA de Tours, Francia), por la cesión de materiales de vital importancia para la realización de este trabajo, así como por su paciente dedicación en mi aprendizaje de las técnicas radioinmunométricas y sus aspectos estadísticos de la reducción de datos.

Al Dr. D. YVES COGNIE, Investigador del citado Centro, por haber puesto a nuestra disposición la técnica de recuperación de embriones, así como su orientación durante la realización de este trabajo.

Al Dr. D. ANTONIO LOPEZ SEBASTIAN, Investigador del Centro de Reproducción Animal del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias de Madrid, por habernos facilitado la estancia en su laboratorio de RIA para la realización de las determinaciones de progesterona.

A Ma JESUS COCERO, Investigadora del citado Centro, por su inestimable trabajo de evaluación de la viabilidad embrionaria, así como por sus oportunas sugerencias y palabras de ánimo.

A los Dres. D. JUAN BADIOLA DIEZ y D. MANUEL LOPEZ PEREZ, Decano y Catedrático de Bioquímica de la Facultad de Veterinaria

de Zaragoza, respectivamente, por las facilidades recibidas a la hora de utilizar el laboratorio de Bioquímica.

A todos aquellos investigadores del Servicio de Investigación Agraria de la Diputación General de Aragón, y en particular a la Unidad de Producción Animal de dicho Centro, que han colaborado de una u otra forma en la consecución del presente trabajo.

A cuantos profesores han contribuido en mi formación científica, a quienes no sería justo olvidar en este capítulo.

A ISABEL BLASCO, CLARA Ma MARIN, GUSTAVO MARIA y Ma PILAR JIMENEZ, por su compañerismo y desinteresada ayuda, así como a los demás compañeros becarios por el grato ambiente que han sabido crear.

A los miembros del personal laboral, y especialmente a D. FIDEL LAHOZ y D. ELIAS ECHEGOYEN, por su interés y eficiencia probadas una vez más durante la realización práctica de las experiencias, sin cuya paciencia y dedicación no hubiera sido posible la realización de esta Tesis.

A D. PEDRO BERNAL, por la realización mecanográfica de esta memoria, quien ha sufrido las prisas de última hora que caracterizan este tipo de trabajos.

La presente Tesis ha podido realizarse gracias a la colaboración de los siguientes Organismos:

**Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias**, que me concedió una Beca INIA para la realización de Tesis Doctoral en las Comunidades Autónomas y que financió parte de las experiencias a través del Proyecto Nº 5525.

**Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica**, que financió la mayor parte del trabajo experimental a través del Proyecto Nº 688.

**Servicio de Investigación Agraria (Diputación General de Aragón)**, en cuyas instalaciones se ha realizado este trabajo.

# INDICE

	Pág.
<b>1. INTRODUCCION</b> .....	1
<b>2. REVISION BIBLIOGRAFICA</b> .....	5
2.1. Endocrinología del ciclo sexual de la oveja .....	7
2.2. Control hormonal del desarrollo folicular y la ovulación .....	9
2.3. Regulación de la tasa de ovulación .....	14
2.4. Métodos de inmunoneutralización hormonal .....	19
<b>3. ANTECEDENTES, PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS</b> .....	39
3.1. Antecedentes .....	41
3.2. Planteamiento del trabajo .....	42
3.3. Objetivos .....	43
<b>4. MATERIAL Y METODOS UTILIZADOS</b> .....	45
4.1. Inmunización de los animales .....	47
4.2. Extracciones de sangre .....	47
4.3. Determinación del nivel de inmunización .....	48
4.4. Determinaciones de progesterona .....	58
4.5. Determinaciones de LH .....	62
4.6. Determinación de peso y condición corporal .....	62
4.7. Determinación de la tasa de ovulación .....	62
4.8. Recuperación de embriones .....	62
4.9. Evaluación de la viabilidad embrionaria .....	63
4.10. Transferencia de embriones .....	63
4.11. Métodos estadísticos .....	63
<b>5. EXPERIENCIAS REALIZADAS</b> .....	65
5.1. Experiencia 1 .....	67
5.2. Experiencia 2 .....	75
5.3. Experiencia 3 .....	85

	Pág.
5.4. Experiencia 4 .....	99
6. DISCUSION GENERAL .....	109
7. CONCLUSIONES .....	115
8. RESUMEN .....	119
9. SUMMARY .....	125
10. BIBLIOGRAFIA .....	131
11. GLOSARIO DE TERMINOS Y DEFINICIONES .....	147
12. ANEJOS .....	153

## 1. INTRODUCCION

## 1. INTRODUCCION

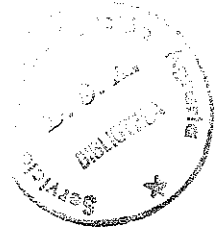
En la mayoría de las razas ovinas españolas y especialmente en la Raza Aragonesa, el número de corderos nacidos por parto es el factor técnico que más influye en el resultado económico de las explotaciones. Por consiguiente, el aumento de la tasa de ovulación en las ovejas es uno de los objetivos prioritarios en investigación sobre producción animal.

Se ha utilizado el cruce con razas prolíficas (Romanov, Finesa) con buenos resultados productivos (VALLS ORTIZ *et al.*, 1977) pero la poca adaptación de dichas razas foráneas y las complicaciones que implican en el manejo, hacen que sea una práctica de difícil utilización en muchos casos.

Los tratamientos hormonales de superovulación (aplicación de PMSG después de un tratamiento progestativo) dan también buenos resultados, pero son caros, exigen un nivel técnico y organizativo importante en las explotaciones y tienen una respuesta muy variable.

La inmunización contra hormonas esteroides presenta una respuesta más uniforme dentro de una misma raza, y mucho más moderada que la PMSG, siendo raros los partos triples. Por ello se ha convertido en una técnica muy interesante que se ha utilizado con éxito en muchas razas de diversos países.

De ahí el interés de estudiar las condiciones de utilización de dicha técnica en la raza Raza Aragonesa.



## 2. REVISION BIBLIOGRAFICA

## 2. REVISION BIBLIOGRAFICA

### 2.1. Endocrinología del ciclo sexual

#### 2.1.1. Generalidades

Tras el inicio de la actividad sexual (pubertad), la oveja presenta ciclos sexuales (intervalo entre dos celos consecutivos) cuya longitud varía entre 16 y 19 días según las razas (normalmente 17), que se suelen dividir convencionalmente en dos fases: lútea (días 2 al 13 después del celo) y folicular (días 14 a 1). La duración del celo (día 0) es de 24 a 70 horas según el genotipo (normalmente 24-40 h.) y la ovulación se produce 24-32 horas después del comienzo del celo.

El mantenimiento de la ciclicidad viene determinado fundamentalmente por mecanismos de **retroregulación hormonal (feed-back)** en el eje hipotalámico-hipofisario-ovárico, si bien no pueden descartarse otras interacciones de tipo neuroendocrino. La comprensión del papel que juegan las diferentes hormonas en el mantenimiento del ciclo sexual es básicamente la que se describió hace ahora unos 10 años, si bien, se han producido importantes avances en este terreno posteriormente.

La actividad reproductora de la oveja está condicionada por el medio ambiente, principalmente por la época del año, o de una forma más precisa, por el ritmo de luz que incide sobre la retina. En primavera, el tiempo de luz (fotoperíodo) aumenta de un día a otro, lo que provoca la desaparición de la ciclicidad en gran parte de los individuos durante un tiempo más o menos prolongado, dependiendo de la raza y el ambiente. Este período, caracterizado por la ausencia de celo y ovulación, se denomina **época de anoestro estacionario**.

#### 2.1.2. Fase lútea

La concentración plasmática de progesterona (P) en la fase folicular precedente se hallaba en niveles basales (0,1-0,3 ng/ml) y su procedencia era fundamentalmente adrenal. A partir del segundo o tercer día del ciclo comienza a elevarse a consecuencia de la secreción creciente del cuerpo lúteo, recientemente formado tras la ovulación, hasta alcanzar valores de 1 a 3 ng/ml entre los días 7 y 12. A partir de entonces desciende paulatinamente hasta los niveles basales de la nueva fase folicular, a causa de la regresión del cuerpo lúteo. (Ver anejo 1).

Durante esta fase los folículos crecen y se atresian sin que existan unas "ondas de desarrollo" determinadas y la secreción de  $17\beta$ -estradiol (E2) por parte de los folículos en crecimiento origina unos niveles sanguíneos fluctuantes de esta hormona (DRIANCOURT *et al.*, 1985a). Estradiol y progesterona actúan sinérgicamente, de manera fundamental a nivel del hipotálamo, ejerciendo un

feed-back negativo sobre la secreción pulsátil de LH proveniente de la hipófisis (HARESIGN, 1985). Por ello la LH se mantiene en niveles basales, originándose descargas a frecuencias bajas (una cada 3-10 h) (CLARKE, 1984) y de amplitud relativamente grande (HANSEL y CONVEY, 1983), siempre en comparación con la fase folicular.

La FSH, procedente también de la hipófisis, sufre fluctuaciones sujetas a gran variabilidad individual, sin períodos fijos, que pueden ser cortos (3,5-6 días), largos (más de 10 días) o alternados (DRIANCOURT *et al.*, 1985a). Este perfil hormonal de la FSH puede ser debido al efecto inhibitorio del E2 y/o inhibina foliculares sobre la secreción de FSH (HARESIGN, 1985), si bien no se descarta algún mecanismo intrínseco del sistema hipotálamo-hipófisis (DRIANCOURT *et al.*, 1985a).

Hacia el día 13 comienza la regresión del cuerpo lúteo, con la consiguiente disminución progresiva del nivel de progesterona plasmática. La prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) de origen uterino es la principal responsable, si bien la oxitocina puede jugar también algún papel (PETERSON *et al.*, 1986). Esta prostaglandina llega al ovario desde el útero por medio de los vasos linfáticos adyacentes y/o a través de la arteria ovárica, transferida desde la vena útero-ovárica mediante un mecanismo de contracorriente (HEAP *et al.*, 1985; DRIANCOURT *et al.*, 1985a).

### 2.1.3. Fase folicular

A medida que descienden los niveles de P, la frecuencia de LH aumenta progresivamente, hasta alcanzar el ritmo de una pulsación (descarga) por hora aproximadamente. Como consecuencia de dicho incremento en la frecuencia, la concentración plasmática de LH es cada vez mayor, lo que permite la progresiva maduración de los folículos activos presentes al comienzo de la luteolisis y la consiguiente secreción de cantidades crecientes de E2. Esta hormona, en presencia de niveles basales de P, ejerce un feed-back positivo sobre la secreción de LH, siendo así posible la maduración final de los folículos en crecimiento (HARESIGN, 1985). Como consecuencia directa de esto se produce una descarga prolongada de E2 (unos 30 pg/ml) (RAWLINGS *et al.*, 1984) manifestándose los signos externos del celo a lo largo de todo este pico. La exposición constante de la hipófisis a los pulsos de GnRH generados por el hipotálamo, bajo niveles altos de E2 y basales de P, incrementa la magnitud de las descargas de LH, desencadenando el pico preovulatorio LH-FSH (HANSEL y CONVEY, 1983). Ambas hormonas, junto con la prolactina, alcanzan sus valores máximos simultáneamente (HARESIGN, 1985; DRIANCOURT *et al.*, 1985a) entre 1 y 9 h. después del comienzo del celo (HAUGER *et al.*, 1977).

A lo largo de la fase folicular, androstenodiona y testosterona tienden a incrementar sus niveles a partir del comienzo del celo observable. Sin embargo, ambos andrógenos no parecen estar relacionados con cambios en los niveles de

LH o FSH en ovejas enteras, ni tampoco en ovariectomizadas. Al parecer, estos andrógenos no juegan un papel directo y decisivo en el control del comportamiento sexual de la oveja (STANKOV y KANCHEV, 1984). Las variaciones observadas en la concentración de andrógenos al comienzo del celo podrían explicarse teniendo en cuenta que los andrógenos son los sustratos precursores inmediatos de los estrógenos.

Después del pico preovulatorio de LH, los folículos dejan de segregar estradiol, manteniéndose las gonadotropinas y esteroides en niveles basales (HANSEL y CONVEY, 1983). Se mantiene, no obstante, la frecuencia de descargas de LH en aproximadamente una cada hora (CLARKE, 1984).

Unas 18-24 h. después del pico LH-FSH, pero antes de la ovulación, se produce otro pico de FSH que llega a alcanzar los niveles del pico preovulatorio, pero su duración es mayor. Probablemente se debe al cese de la retroinhibición de la inhibina folicular (HANSEL y CONVEY, 1983). El significado fisiológico de este segundo pico está relacionado en otras especies animales con el desarrollo folicular del ciclo siguiente, pero en la oveja no parece guardar gran relación (DRIANCOURT *et al.*, 1985a).

Poco más tarde se produce la ovulación, con la consiguiente formación de un nuevo cuerpo lúteo.

## 2. 2. Control hormonal del desarrollo folicular y la ovulación

### 2.2.1. Aspectos morfológicos y cronológicos

Los folículos primordiales ocupan el estadio menos desarrollado del crecimiento folicular. Ya presentes en la vida fetal, constan de un ovocito rodeado únicamente por 2 ó 3 células basales y sus dimensiones rondan las 60μ. En la oveja adulta se estima que el intervalo de tiempo transcurrido hasta alcanzar el tamaño preovulatorio (8 mm aproximadamente) es de unos 6 meses (CAHILL, 1981; HARESIGN, 1985).

El crecimiento folicular se inicia con la proliferación de las células que rodean al óvulo, formando varias capas, y dando origen a la granulosa. Conforme avanza el crecimiento, los folículos son desplazados hacia el centro del ovario, la teca se diferencia del tejido conectivo que la rodea y aparecen dos capas: interna y externa, adquiriendo a la vez el óvulo la membrana pelúcida (HANSEL y CONVEY, 1983). Esta fase tiene una duración de unos 4,3 meses (CAHILL, 1981).

Cuando los folículos alcanzan un tamaño de 0,2-0,4 mm de diámetro aparece en ellos el antro, cavidad llena de líquido folicular, generado por coalescencia de las pequeñas cavidades de líquido que se forman entre las células de la granulosa. El óvulo ha duplicado para entonces su tamaño inicial. Cuando los

foliculos han alcanzado este estadio se les denomina foliculos antrales (TURNBULL *et al.*, 1977; HANSEL y CONVEY, 1983).

La velocidad de crecimiento en la fase preantral es lenta, independientemente del día del ciclo, pero a partir de la formación del antro el desarrollo se acelera, alcanzando un máximo entre 0,7 y 1,5 mm. Este crecimiento se debe tanto a la proliferación celular como al incremento del volumen del líquido folicular. Posteriormente, la velocidad de crecimiento vuelve a reducirse progresivamente hasta anularse prácticamente en los grandes foliculos preovulatorios (TURNBULL *et al.*, 1977; CAHILL, 1984).

A partir de un tamaño de 1,5 mm, comienza a aparecer un proceso degenerativo en todos los foliculos excepto en los que llegarán a ovular. Dicho proceso se denomina atresia y puede ocurrir en foliculos de cualquier tamaño mayor de 1,5 mm. La atresia se caracteriza morfológicamente por la regresión folicular (disminución de tamaño con signos de desintegración celular) y funcionalmente por la pérdida de la capacidad de síntesis de estradiol (TURNBULL *et al.*, 1977). Sin embargo, los ovocitos extraídos de foliculos atrésicos no parecen poseer ninguna deficiencia o anomalía letal, ya que se ha conseguido obtener descendencia de ellos mediante fertilización *in vitro* (CAHILL, 1981). El fenómeno de la atresia parece estar relacionado con la relación estrógenos/andrógenos en el fluido folicular, que es mayor que 1 en foliculos normales y menor que 1 en los atrésicos (BAIRD y McNEILLY, 1981). Además, los andrógenos y particularmente la dihidrotestosterona, aceleran la atresia en ratas (BAIRD y McNEILLY, 1981).

Mediante medidas del índice mitótico en células de foliculos no atrésicos se estima que los foliculos tardan unos 5 días en crecer desde 0,55 a 2,1 mm y unas 48 h más hasta alcanzar el tamaño de la ovulación (TURNBULL *et al.*, 1977; DRIANCOURT *et al.*, 1985a). El tiempo total transcurrido desde la formación del antro hasta la ovulación se estima en 25-43 días (BAIRD y McNEILLY, 1981; CAHILL, 1981).

Los foliculos que logran ovular suelen medir poco antes de la ovulación, entre 5 y 10 mm. En ellos, el óvulo está rodeado de una capa de células de granulosa que se denomina corona radiada. Tras la expulsión del ovocito el foliculo se transforma en cuerpo hemorrágico y posteriormente en cuerpo lúteo.

### 2.2.2 Aspectos funcionales

A pesar del considerable esfuerzo realizado en los últimos años, siguen sin conocerse muchos aspectos relacionados con las interacciones entre las distintas hormonas y el crecimiento folicular. Sin embargo, algunos aspectos endocrinos relacionados con el desarrollo folicular se han ido conociendo a partir de fechas más o menos recientes. Asimismo, la función folicular se va comprendiendo a

partir de experiencias *in vitro* e *in vivo*, si bien aún es preciso identificar muchos de los compuestos segregados por el foliculo y presentes en el fluido folicular, cuya función no siempre se conoce.

El estímulo que provoca el crecimiento de los foliculos primordiales, aparentemente en estado de latencia durante largo tiempo, no se sabe si procede del óvulo o de las células contiguas. En la fase preantral la presencia de gonadotropinas no parece fundamental para el crecimiento folicular, si bien se acelera en presencia de éstas, ya que se han encontrado foliculos de 5 ó más capas de granulosa en ovejas hipofisectomizadas.

A partir de un determinado estadio de desarrollo, quizá algo anterior a la formación del antro, parece necesaria la exposición de los foliculos a la FSH para quedar sensibilizados a la LH. Así, es necesario un tratamiento con FSH y LH para inducir la ovulación en ovejas con marcado anoestro estacionario, siendo insuficientes la LH o GnRH por sí solas (HARESIGN, 1985). Además, un tratamiento progestativo previo es obligatorio para conseguir una buena calidad de la ovulación (MOORE, 1985).

La síntesis de hormonas esteroides en los foliculos antrales mayores de 3 mm se lleva a cabo por cooperación de la teca interna y la granulosa bajo el estímulo de las gonadotropinas. De este modo, el estradiol se produce en las células de la granulosa a partir de la androstenodiona procedente de la teca interna, previa reducción a testosterona. La FSH ejerce un feed-back positivo sobre la aromatización de la testosterona a estradiol (ver anejos 2 y 3). La androstenodiona se sintetiza en la teca interna a partir del colesterol, fundamentalmente por la vía  $\Delta 5$  y la transformación del colesterol en pregnenolona está activada por la LH. Por otra parte, el  $17\beta$ -estradiol producido ejerce un efecto autocrino inhibiendo la síntesis de progesterona a partir de pregnenolona en la granulosa y un efecto paracrino similar en la teca, obstaculizando así la vía  $\Delta 4$  en ambos tipos de células (HANSEL y CONVEY, 1983).

Poco antes del pico preovulatorio aumenta el número de receptores de LH en teca y granulosa, mientras que los de FSH disminuyen (HANSEL y CONVEY, 1983) o permanecen constantes (CAHILL, 1984). Por ello, los foliculos adquieren una mayor sensibilidad a la LH y una mayor capacidad de segregar estradiol. De estudios realizados *in vitro* se desprende que la LH es responsable, en mayor medida que la FSH, de esa elevada producción de estrógenos (HARESIGN, 1985), siendo su concentración en el líquido folicular mayor que la de los andrógenos en foliculos no atrésicos de ese tamaño.

El incremento de la concentración de receptores de LH en la teca y granulosa debe de ser un proceso importante para asegurar una correcta maduración folicular que permita la ovulación tras el pico de LH. Así, la presencia de dichos

receptores es un buen indicador del folículo ovulatorio desde el momento de la oleada LH-FSH (WEBB y ENGLAND, 1982a). En folículos no ovulatorios, la concentración de andrógenos es mayor que la de estrógenos, lo que se interpreta como una situación en la que el sistema enzimático aromatasa se halla inactivo debido a la ausencia de receptores para la LH (BAIRD y McNEILLY, 1981).

Al menos aparentemente la oleada LH-FSH transforma los folículos activos en atrésicos desde el punto de vista funcional, ya que disminuye en ellos la concentración de estradiol y progesterona (HANSEL y CONVEY, 1983). Esto no es debido a la falta de los precursores respectivos, sino a la inactivación del sistema aromatasa que se asocia a la disminución de receptores de la LH en la teca y granulosa (WEBB y ENGLAND, 1982b). A consecuencia de esto, los niveles circulantes de estrógenos se hallan en niveles basales.

### **2.2.3. Dinámica folicular integrada en el ovario: crecimiento, reclutamiento y selección**

#### **2.2.3.1. Crecimiento**

Una vez revisado el crecimiento individual de los folículos y sus funciones principales, cabe plantearse el modo en que todo lo anteriormente expuesto se integra en la dinámica del ovario dentro del ciclo sexual.

En contra de lo que se pensó en un principio, parece que no existen "ondas de desarrollo" fijas en el ovario, sino que los folículos se desarrollan al azar, de forma no sincronizada, de manera que el crecimiento y la atresia se producen en cualquier día del ciclo. Esto se apoya en las siguientes experiencias: a) Los investigadores no coinciden en el número de "ondas" ni en los días del ciclo en que se producen. b) Las fluctuaciones de FSH y estradiol no ocurren a intervalos fijos. c) No hay una respuesta diferente a la PMSG dependiendo del día que se aplica, cerca del final de la fase lútea (DRIANCOURT *et al.*, 1985a). Probablemente el recambio folicular está regulado parcialmente por factores intraováricos (HANSEL y CONVEY, 1983).

Se asume que existen dos procesos en el ovario que llevan a la maduración final de los folículos: reclutamiento y selección (DRIANCOURT *et al.*, 1985b)

#### **2.2.3.2. Reclutamiento**

Se entiende por reclutamiento el proceso por el cual un grupo de folículos, en el que está(n) incluido(s) el (los) que ovulará(n) posteriormente, se desarrolla bajo la influencia de los perfiles hormonales del ciclo sexual.

Se cree que este proceso ocurre unas 48 h antes del pico preovulatorio de LH, coincidiendo tal vez con la luteolisis, ya que la eliminación o regresión forzada de un cuerpo lúteo lleva consigo la aparición de un folículo unas 48 h más tarde, que es capaz de generar otro pico preovulatorio. Además, el intervalo entre el tratamiento con LH en anoestro estacionario y el pico preovulatorio es de 30 a 55 h (DRIANCOURT *et al.*, 1985a).

El tamaño de los folículos que son reclutados se estima que es mayor de 2 mm, basándose en numerosas experiencias. El número de dichos folículos reclutados depende de la FSH circulante durante las 24 horas anteriores a la luteolisis, ya que se ha obtenido una tasa de ovulación de 8 tratando con FSH desde 24 h antes de la luteolisis hasta 60 h después, y solamente de 3 comenzando el tratamiento en la luteolisis (DRIANCOURT *et al.*, 1985a).

#### **2.2.3.3. Selección**

Se denomina selección al mecanismo que lleva a la determinación del folículo(s) que ovulará(n) y la regresión de los restantes folículos reclutados.

Este proceso se cree que es posterior al reclutamiento, ya que tanto la ovariectomía unilateral como la cauterización de parte de los folículos reclutados o la irradiación con rayos X durante el comienzo de la fase folicular no alargan el intervalo luteolisis-ovulación.

Mediante la técnica de marcado con tinta china, se ha observado que parece ser que el folículo que ovula es el mayor existente unas 30-54 h después de la regresión del cuerpo lúteo anterior (DRIANCOURT, 1984).

Sin embargo otros hechos apuntan que puede situarse en una fecha más temprana. Así, 10 h después de la inyección de prostaglandina se observa una mayor secreción de estradiol por parte del ovario que después ovulará (DRIANCOURT *et al.*, 1985a). Recientemente, se ha observado un pulso de estradiol, segregado por el ovario destinado a ovular, tan sólo 30 minutos después de la inyección de prostaglandina. Dicho pulso fue precedido por otro de LH en la mayor parte de los casos, lo que sugiere una preselección del folículo destinado a ovular antes de la luteolisis (ATKINSON *et al.*, 1986).

El mecanismo bioquímico implicado en la selección no se conoce. Existen, no obstante, varias hipótesis que tratan de explicar este proceso. Las siguientes son teorías pasivas:

- En los folículos que se atresian están ausentes las señales hormonales necesarias para proseguir el crecimiento a partir de una fase determinada o puede que no exista un aporte de gonadotropinas suficiente para permitir el mantenimiento de una

completa actividad de los receptores en todos los folículos (HARESIGN, 1985).

- Cuando un folículo alcanza un determinado nivel de desarrollo, adquiere un estado de equilibrio que le impide atresarse a pesar del descenso de los niveles de FSH circulante (DRIANCOURT *et al.*, 1985a).

Sin embargo, existe también otra teoría "activa", según la cual el folículo dominante, al alcanzar un estadio concreto, segrega sustancias que inhiben el crecimiento de los demás folículos. Esta última se apoya en que: a) En ovejas hipofisectomizadas tratadas con PMSG, el tratamiento con fluido folicular ovino causó un cese del crecimiento folicular, una reducción de la división mitótica en la granulosa y un incremento de la atresia (CAHILL, 1984). La inmunización de ovejas enteras contra una fracción del líquido folicular bovino incrementó la tasa de ovulación sin afectar a la FSH, lo que sugiere la existencia de un "inhibidor del crecimiento folicular" o una "proteína inductora de la selección" en el fluido folicular (DRIANCOURT *et al.*, 1985a).

El mantenimiento del folículo dominante podría explicarse según las teorías "pasivas" por el alto contenido de estradiol y/o FSH en el líquido folicular, así como por un mayor flujo sanguíneo en ese folículo.

Resumiendo, parece que el (los) folículo(s) que logrará(n) ovular se encuentra(n) entre un grupo de folículos activos que, por azar, se hallan en un estadio del crecimiento en el que su diámetro es de al menos 2 mm en un momento cercano a la luteolisis. El número de estos folículos depende de los niveles de FSH circulante durante las 24 h anteriores a la luteolisis. Estos folículos "reclutados" continúan su crecimiento bajo la acción hormonal y sólo uno o unos pocos se librarán de convertirse en atrésicos y conseguirán ovular, debido a que poseen cierta sensibilidad especial a la acción hormonal o una capacidad de inducir la atresia de los demás folículos. Esta mayor o menor capacidad para ovular está muy relacionada con el genotipo.

## 2.3. Regulación de la tasa de ovulación

### 2.3.1. Correlaciones hormonales con la tasa de ovulación

#### 2.3.1.1. Planteamiento y dificultades encontradas

Los principales factores que influyen sobre la tasa de ovulación en la oveja son: raza, peso, condición corporal, edad, alimentación y época del año. Por otra parte, el empleo de determinados productos farmacológicos puede modificar también la tasa de ovulación. Usualmente se realizan trabajos en los que se estudia la dinámica folicular y/o se miden determinados parámetros

hormonales, variando los factores anteriormente indicados, con el fin de conocer los mecanismos que regulan la tasa de ovulación y poder así incrementarla.

A pesar de los numerosos estudios comparativos realizados hasta la fecha en este terreno, los resultados no son totalmente satisfactorios. La causa puede encontrarse en la baja sensibilidad de las determinaciones hormonales, incapaces de detectar diferencias inferiores al 10%. Como la tasa de ovulación es una variable discontinua, pequeñas variaciones de los perfiles hormonales pueden ser responsables de variaciones de una unidad en la respuesta (SCARAMUZZI y RADFORD, 1983; HARESIGN, 1985). También puede pensarse que los análisis hormonales, que son mediciones instantáneas de la liberación total de esas hormonas, pueden ser estimadores poco apropiados a la hora de interpretar el papel que juegan dichas hormonas en la dinámica folicular (HARESIGN, 1985). Además, las hormonas que hacen posible la ovulación no tienen por qué ser las determinantes de la tasa de ovulación (SCARAMUZZI y RADFORD, 1983) que podría estar regulada por factores intraováricos de tipo no endocrino. Por último, la diferente sensibilidad del ovario y/o la hipófisis a las distintas hormonas bajo condiciones diversas puede enmascarar los hechos reales (HARESIGN, 1985) dando lugar a resultados aparentemente paradójicos e inconsistentes.

No obstante, pasamos a continuación a exponer los avances realizados, con las limitaciones anteriormente explicadas.

#### 2.3.1.2. Hormona Luteinizante (LH)

Puede esperarse a priori que las gonadotropinas sean las principales hormonas determinantes de la tasa de ovulación, ya que su concentración se incrementa notablemente en las horas anteriores a la ovulación. Sin embargo, no siempre se encuentra una buena relación entre ambas variables.

Así, el intervalo entre el comienzo del celo y el pico de LH es mayor en razas prolíficas, asociándose el retraso de la oleada de LH con un aumento en la tasa de ovulación. Sin embargo, la raza Merino Booroola parece salirse de dicha norma al compararla con la Merina, a pesar de que existe una notable diferencia en tasa de ovulación entre ambas razas (HARESIGN, 1985). Además, dicho retraso no pudo demostrarse entre ovejas con ovulación simple y múltiple, trabajando en diferentes niveles de peso y/o condición corporal dentro de una misma raza (RHIND *et al.*, 1985b; RHIND y McNEILLY, 1986; RHIND *et al.*, 1986a) ni tampoco en ovejas seleccionadas por tasa de ovulación (THOMAS *et al.*, 1984).

En algunos trabajos se ha observado que el pico de LH es significativamente menor en ovejas con ovulación simple (RHIND *et al.*, 1985b; RHIND y McNEILLY,

1986), pero en otro trabajo posterior (RHIND *et al.*, 1986a) no se ha confirmado este hecho.

En las ovejas con ovulaciones múltiples se ha podido demostrar un incremento de la frecuencia de pulsaciones de LH sólo en la fase folicular (RHIND *et al.*, 1986a) o en la lútea (THOMAS *et al.*, 1984) observándose tendencias en el mismo sentido en fase folicular (THOMAS *et al.*, 1984; RHIND *et al.*, 1985b) o en ambas fases (RHIND y McNEILLY, 1986), así como un incremento significativo de la amplitud de dichas pulsaciones en este último trabajo.

### 2.3.1.3. Hormona Folículo-Estimulante (FSH)

No se han encontrado diferencias en la concentración de FSH a lo largo de la fase folicular asociadas a una mayor tasa de ovulación entre las razas Finesa y Suffolk, ni en la raza Merina entre los portadores de una o dos copias del gen Booroola de alta prolificidad (gen F) y los que no poseen ninguna, pero sí entre las D'man y Timahdite (HARESIGN, 1985). Sin embargo, sí se han constatado mayores niveles de FSH durante la fase lútea en Merinos portadores del gen F en homocigosis o heterocigosis respecto a los Merinos normales (DOWNING *et al.*, 1986).

Tampoco se han hallado diferencias significativas en la concentración de FSH en fase folicular o lútea relacionadas con diferente tasa de ovulación bajo distinta alimentación y/o condición corporal (RHIND *et al.*, 1985b; RHIND y McNEILLY, 1986; RHIND *et al.*, 1986a), si bien el pico de FSH fue mayor en las ovejas que tuvieron una sola ovulación (RHIND y McNEILLY, 1986). En otros trabajos, las diferencias en el tamaño del pico fueron prácticamente nulas (RHIND *et al.*, 1985b; RHIND *et al.*, 1986a). Las causas de estas discrepancias pueden ser de origen racial.

### 2.3.1.4. Prolactina

El papel de la prolactina en el ciclo sexual no se conoce exactamente. Sin embargo, podría esperarse que influyese en la determinación de la tasa de ovulación, dado que alcanza valores pico en la fase folicular, coincidiendo con la oleada de LH-FSH.

Los resultados son una vez más contradictorios. Se han encontrado mayores niveles de esta hormona en la fase folicular de ovejas con ovulación simple, y tendencias en el mismo sentido en la fase lútea (RHIND y McNEILLY, 1986). Sin embargo, los valores pico no fueron diferentes. En otros trabajos el pico de prolactina fue mayor en las ovejas con ovulación múltiple (RHIND *et al.*, 1985b), pero no se constataron diferencias significativas en otros momentos de la fase folicular. Una vez más el factor raza, junto con otros, ha podido originar esas discrepancias.

En conclusión, los parámetros con que se ha caracterizado tradicionalmente la secreción hormonal parecen insuficientes a la hora de explicar totalmente la regulación de la tasa de ovulación. Sin embargo, a partir de los datos de que se dispone en la actualidad puede afirmarse que la variación de los citados parámetros suele acompañar a modificaciones en la tasa de ovulación, si bien la causa última de ambos fenómenos puede ser todavía desconocida.

### 2.3.2. Factores que condicionan la tasa de ovulación

El mecanismo de actuación de los principales condicionantes de la tasa de ovulación citados al comienzo del apartado 2.3.1.1. podría explicarse mediante parámetros endocrinos. A pesar de los considerables esfuerzos realizados en esta dirección, la situación general no es totalmente satisfactoria. La razón puede residir en que se pretende estudiar los mecanismos de un proceso que todavía no se conoce en profundidad (DRIANCOURT *et al.*, 1984).

No obstante, parece que algunas ideas se van reafirmando progresivamente.

#### 2.3.2.1. Raza

Es conocido que la tasa de ovulación está sujeta a grandes diferencias raciales. Así, las razas comúnmente llamadas "prolíficas" ovulan cuantitativamente de forma similar a como lo hacen otras bajo tratamientos superovulatorios (FSH, PMSG, etc.): Finesa (3,5), Romanov (3,4), Merino Booroola (4,2), Dahman (2,8), Cambridge (4,0), (BINDON *et al.*, 1986) HuYang (3,11) (HARESIGN, 1985) frente a, p. ej., Merino (1,49) (HANRAHAN, 1987).

Parece ser que existen diferencias en cuanto a la dinámica del crecimiento folicular, al menos entre algunas de dichas razas, que afectan al tamaño de los folículos preovulatorios, tasa de reclutamiento y de atresia, así como a las estrategias del desarrollo folicular (DRIANCOURT *et al.*, 1984; DRIANCOURT *et al.*, 1985b; FERNANDEZ ABELLA *et al.*, 1986). Se sabe también que existen diferencias raciales en la sensibilidad a la acción hormonal (HARESIGN, 1985; BINDON *et al.*, 1986). Por tanto, parece poco probable que las diferencias raciales en tasa de ovulación puedan explicarse sólo a partir de diferencias en los perfiles de secreción hormonal.

#### 2.3.2.2. Nutrición, peso y condición corporal

Es bien conocido que en algunas razas una mejora de la alimentación en el período anterior al comienzo de la cubrición (flushing) produce incrementos en la tasa de ovulación, pero a menudo las causas que provocan esta aumento se confunden entre sí.

Se sabe que un período mínimo de 3 semanas es necesario para que un "flushing" sea efectivo (25% de incremento en la tasa de ovulación) en condiciones de pastoreo, consiguiéndose pequeñas mejoras adicionales (30%) al duplicar dicho intervalo (SMITH *et al.*, 1983). Este efecto parece asociado a una mayor ingestión voluntaria en las ovejas de condición corporal moderadamente

baja (GUNN, 1983). Si el "flushing" se realiza con "lupinus", se pueden obtener respuestas similares en períodos de una semana (SCARAMUZZI y RADFORD, 1983; SMITH *et al.*, 1983) sin cambios en el peso vivo. La causa de este efecto está todavía sin aclarar.

En lo referente al factor peso, existe un efecto positivo "dinámico" (es decir, debido a la ganancia de peso) y otro "estético" (es decir, del peso por sí mismo) (THOMPSON *et al.*, 1985). Parece, no obstante, que esa correlación positiva no es totalmente independiente del estado de engrasamiento, pudiéndose observar esta variación sólo en determinados rangos de condición corporal (GUNN, 1983). Sorprendentemente, aparte de esta asociación fenotípica entre peso y tasa de ovulación, puede existir otra de orden genotípico, ya que la selección por peso ha llevado consigo el incremento de la tasa de ovulación, al parecer independientemente del peso (QUIRKE *et al.*, 1985). Además, la respuesta de las ovejas a la sobrealimentación varía según las razas. En el Reino Unido se ha visto que la sobrealimentación no aumenta la tasa de ovulación de la oveja Finesa o sus cruces, contrariamente a lo que ocurre en las demás razas inglesas (TREACHER, com. pers.). En la oveja Rasa Aragonesa no ha podido provocarse un aumento significativo de la tasa de ovulación en primavera sólomente con sobrealimentación (FOLCH *et al.*, 1985; FOLCH *et al.*, 1987).

De trabajos realizados bajo diferentes niveles de alimentación y/o condición corporal parece deducirse que la primera influye en la etapa de selección, mientras que la segunda actuaría sobre el reclutamiento. Así, condiciones corporales altas se asocian a una mayor proporción de folículos que entran en fase de crecimiento rápido, probablemente a consecuencia de mayores concentraciones de FSH en fase lútea y folicular. Por otra parte, una mayor alimentación conlleva frecuencias más altas en la pulsatilidad de la LH en la fase folicular, que permitirían la maduración final y ovulación de un mayor número de folículos (RHIND y McNEILLY, 1986; RHIND *et al.*, 1986a).

#### 2.3.2.3. Edad

La tasa de ovulación es menor en las corderas (hasta un año y medio aproximadamente) y se incrementa progresivamente hasta alcanzar valores máximos a los 3-5 años de edad, que se mantienen hasta los 10 (CAHILL, 1984).

#### 2.3.2.4. Época del año

Los máximos valores se observan en otoño y los mínimos cerca de primavera. Esta tendencia no se puede constatar en corderas o en ovejas de muy bajo peso (SCARAMUZZI y RADFORD, 1983).

En muchas ocasiones la disponibilidad de alimentación de buena calidad a lo largo del año es la causa principal de las variaciones observadas. Sin embargo, existe también un efecto independiente de la dieta, del que serían responsables la estación del año y el fotoperíodo, actuando posiblemente sobre la incidencia de la atresia folicular (CAHILL, 1984). También se han descrito variaciones poco

lógicas entre ciclos consecutivos dentro de la época de actividad sexual (THOMPSON *et al.*, 1985).

## 2. 4. Métodos de inmunoneutralización hormonal

### 2.4.1. Generalidades

Estos métodos se basan en la reducción de la concentración de hormona biológicamente activa por ligación mediante anticuerpos específicos generados por el propio animal (en la inmunización activa) o procedentes de otro animal que se ha hiperinmunizado anteriormente (en la inmunización pasiva). La inmunoneutralización hormonal se ha utilizado a menudo como ayuda en la investigación sobre endocrinología. Sin embargo, recientemente, se ha considerado la posibilidad de su utilización práctica en el campo de la producción animal. Así, se ha inmunizado contra la somatostatina para acelerar el crecimiento de los corderos (SPENCER *et al.*, 1985), contra la GnRH como alternativa reversible a la castración quirúrgica (QUIRKE, 1985), contra los fitoestrógenos para anular sus efectos perjudiciales sobre la reproducción (COX y WILSON, 1976), o contra esteroides ováricos (SCARAMUZZI *et al.*, 1977) o inhibina (HENDERSON *et al.*, 1984) con el fin de aumentar la tasa de ovulación. El término "inmunofisiología" se ha acuñado recientemente para englobar y describir los fenómenos relacionados con la inmunoneutralización hormonal y sus repercusiones sobre las funciones de los organismos en que se aplica (COX y WILSON, 1984b; SCOTT, 1984); el aprovechamiento de estos métodos a gran escala es lo que se ha denominado "regulación inmunofisiológica de la producción animal" (QUIRKE, 1985). Si bien los resultados no siempre han sido tan buenos como cabría esperar (HOSKINSON y DJURA, 1984), las posibilidades de aplicación de esta técnica son muy numerosas.

### 2.4.2. Mecanismo de la respuesta inmunitaria

La entrada de determinadas sustancias extrañas en el organismo de los animales superiores provoca la aparición de una respuesta inmunitaria humoral y celular. La inmunidad humoral se caracteriza por la aparición de anticuerpos en la sangre y otros líquidos corporales, que son inmunoglobulinas capaces de unirse específicamente a la sustancia que ha provocado la respuesta inmunitaria (inmunógeno). El término "antígeno" se aplica a compuestos que se unen reversible y específicamente a anticuerpos, sean o no aptos para desencadenar la respuesta inmunitaria. Así, existen compuestos que debido a su bajo peso molecular, no son capaces de provocar dicha respuesta pero sí que se unen específicamente a determinados anticuerpos por su elevada similitud estructural con el inmunógeno que indujo la formación de esos anticuerpos. La inmunidad celular se caracteriza por la aparición de procesos dirigidos contra células portadoras en su membrana de antígenos estrechamente relacionados con el inmunógeno. Respuestas de este tipo son el rechazo de trasplantes, la

hipersensibilidad retardada y los fenómenos de citotoxicidad. Ambos tipos de respuesta (humoral y celular) van encaminados a la eliminación de antígenos.

Después de una primera exposición a un inmunógeno existe un período variable de latencia, tras el cual se inicia una respuesta humoral en términos de inmunoglobulinas de la clase M. Cuando el organismo se somete a una segunda sensibilización con la misma sustancia se acorta la fase latente, se obtiene una mayor respuesta en título de anticuerpos específicos que es más duradera que la anterior y los anticuerpos son fundamentalmente de la clase G. Estas exposiciones crean una "memoria inmunológica", en virtud de la cual es necesario un solo contacto con el inmunógeno, para que se produzcan respuestas similares o mayores. Sin embargo, si se realizan sensibilizaciones repetidas con dosis bajas durante períodos cortos, o altas durante largos períodos de tiempo, se produce el fenómeno de la tolerancia o "parálisis inmunológica", que se caracteriza por la disminución o supresión de la respuesta humoral específica contra ese inmunógeno.

#### 2.4.3. Base celular de la respuesta inmunitaria

El sistema inmunitario está formado por linfocitos T, linfocitos B y células accesorias. Los linfocitos T y B están presentes en la circulación sanguínea, así como en el timo, los nódulos linfáticos y el bazo. Las células accesorias se encuentran en casi todos los órganos, en los órganos linfoides y en menor medida en la sangre y linfa. Los linfocitos T proceden de la médula ósea y acaban su maduración en el timo, aunque pueden sufrir otra posterior en los órganos linfoides. Las células B también se originan en la médula ósea y completan su maduración en la bolsa de Fabricio (en las aves) o en el tejido linfático asociado al intestino (mamíferos).

Los macrófagos fagocitan el inmunógeno, lo degradan parcialmente y exhiben fragmentos del mismo en su membrana celular con el fin de que sean reconocidos por los linfocitos T coadyuvantes (helper). Esta operación se denomina "presentación" de los antígenos y pueden realizarla también las células accesorias. Los linfocitos T coadyuvantes reconocen los antígenos exhibidos y quedan activados. A continuación éstos son capaces de activar aquellos linfocitos B que tienen unido el antígeno en su membrana, que son los que han quedado comprometidos desde su formación en la médula para el reconocimiento de ese grupo estructural específico. Estas células B activadas inducen la maduración de células T citotóxicas que destruyen las células portadoras de dichos antígenos, (células "infectadas"). Además, las células B activadas se reproducen formando un clon de células B que exhiben el anticuerpo a modo de receptor de membrana y constituyen las células de memoria circulantes. Otros miembros del clon sufren una diferenciación terminal pasando a llamarse células plasmáticas. Las células plasmáticas son de mayor tamaño, dejan de reproducirse y dedican todos sus recursos a la

producción de anticuerpos. A pesar de que viven sólo unos pocos días, producen cantidades considerables de anticuerpos específicos. La información correspondiente a estos dos últimos apartados puede encontrarse en las siguientes revisiones: ROITT, 1979; McCONNELL, 1982; SIMPSON, 1984; OUTERIDGE, 1985.

#### 2.4.4. Inmunización contra conjugados esteroide-proteína

Las moléculas de bajo peso molecular (como los esteroides o la mayoría de los fármacos) deben unirse covalentemente a proteínas para que puedan inducir la formación de anticuerpos específicos. Dado que los anticuerpos son más específicos para la parte de la molécula más accesible a los linfocitos circulantes, es conveniente unirlos a través de otra molécula que haga de "puente" o "brazo espaciador" entre la proteína y el hapteno. Son normalmente empleados el hemisuccinato, carboximetiloxima o carboxietiltioéter. El sitio de conjugación en los esteroides debe elegirse en función de la especificidad que se desee, ya que, en general el lugar de conjugación suele ser mal detectado por los anticuerpos. En cuanto al número de residuos por molécula de proteína, el óptimo parece entre 15 y 30 (WEBB et al., 1984), o entre 8 y 30 (NIESCHLAG y WICKINGS, 1978), bajando considerablemente la respuesta inmunológica si son 10 o menos (NISWENDER et al., 1971). La proteína puede ser albúmina sérica bovina (BSA), albúmina sérica humana (HSA),  $\gamma$ -globulinas ( $\gamma$ -G), ovoalbúmina, poli-L-lisina, tiroglobulina o hemocianina (KLH). Al parecer, es conveniente que la distancia filogenética entre el animal que se va a inmunizar y el del que procede la proteína sea lo mayor posible (WEBB et al., 1984).

Normalmente se utiliza, además del inmunógeno, un coadyuvante, con el fin de obtener una mayor respuesta inmunitaria. Para ello normalmente se emplean paredes celulares de bacterias que exaltan dicha respuesta. También se utilizan sustancias sintéticas como el sulfato de dextrano o del tipo del poliacrilato que reemplazan parcialmente la función celular del timo y exaltan la memoria celular de la médula ósea (SCARAMUZZI y HOSKINSON, 1984). El coadyuvante de Freund o el Drakeol producen respuestas elevadas y de gran duración (COX, 1984; COX y WILSON, 1984), mientras que el dietil-aminoetil-dextrano (DEAE-dextrano) provoca respuestas más agudas y de menor duración (SCARAMUZZI y HOSKINSON, 1984), al menos en la inmunización contra hormonas esteroides.

#### 2.4.5. Inmunización contra hormonas esteroides

##### 2.4.5.1. Inmunización activa

Los primeros antígenos se sintetizaron en los años 40, pero se trataba de conjugados lábiles a través de grupos éster, que probablemente eran hidrolizados antes de suscitar la respuesta inmunológica. Sin embargo, 10 años más tarde se conseguirían derivados estables (ERLANGER et al., 1957; ERLANGER

et al., 1959) y la inmunización se utilizaría para aclarar el papel de algunas hormonas y/o para poner a punto técnicas radioinmunoanalíticas, con el fin de cuantificar dichas hormonas. (Para una revisión sobre el tema, ver NIESCHLAG y WICKINGS, 1978).

Pero fue a mediados de los 70 cuando se observó, durante unas endoscopias de rutina, que la inmunización activa de ovejas contra androstenodiona (AD) incrementaba la tasa de ovulación (SCARAMUZZI et al., 1977; GELDARD y SCARAMUZZI, 1983). Resultados similares se obtuvieron por inmunización activa contra testosterona (T) (SCARAMUZZI et al., 1981), estrona (E<sub>1</sub>) (MARTIN et al., 1979; SMITH et al., 1981), 17 β-estradiol (E<sub>2</sub>) (SCARAMUZZI et al., 1980b) o progesterona (P) (HOSKINSON et al., 1982b). Sin embargo, la ausencia de celo y ovulación acompañaba normalmente a los tratamientos de inmunización contra AD (SMITH et al., 1981), T (SCARAMUZZI et al., 1981), E<sub>1</sub> (COX y WILSON, 1976; SCARAMUZZI et al., 1980b), E<sub>2</sub> (COX y WILSON, 1976; SCARAMUZZI et al., 1980b) y P (HOSKINSON et al., 1982b), debido a los altos títulos de anticuerpos alcanzados con el adyuvante de Freund. El protocolo de inmunización consistía en la inyección de unos 0,37-1,5 mg del conjugado (dependiendo del tipo de inmunógeno) en 3 ml de una emulsión a partes iguales de suero fisiológico y adyuvante de Freund completo (FCA) o incompleto (FIA) para la primera dosis o las de refuerzo, respectivamente. Esta emulsión se distribuía en 2 inyecciones (I.M.) de 0,9 ml en las patas traseras y otras 6 (S.C.) a lo largo del lomo. A partir de 1979 se sustituyó el adyuvante de Freund por el dietil-aminoetil-dextrano (DEAE-Dextrano) con lo que se consiguieron respuestas inmunológicas menores y más uniformes entre animales, así como subidas y bajadas más rápidas del título de anticuerpos (COX y WILSON, 1976; COX et al., 1984a) resolviéndose así los problemas de ausencia de ovulación y celo. En 1981 se simplificó el protocolo notablemente, siendo necesarias sólo 2 dosis de 1,5 ml (S.C.) en el cuello en cada inmunización, que se redujeron posteriormente a una sola dosis de 2 ml (S.C.) en el cuello por cada inmunización. En octubre de 1983 se comercializó el inmunógeno androstenodiona-7α-carboxietiltioéter: HSA (0,6 mg/ml) en disolución fisiológica de DEAE-dextrano (50 mg/ml) y tiomersal (preservativo, 0,2 mg/ml) con el nombre de FECUNDIN (Glaxo). Parece ser que la reducción de la cantidad de producto inyectado a la mitad en cada dosis produce resultados mejores (CROKER et al., 1986) o parecidos (SMITH y MCGOWAN, 1986). El intervalo entre la primera dosis y el refuerzo suele ser de 3-4 semanas cuando se inmuniza por vez primera. En sucesivas ocasiones, una sola dosis es suficiente debido a la memoria inmunológica creada previamente.

El intervalo de tiempo entre la dosis de recuerdo y el comienzo de la cubrición sincronizada determina el título de anticuerpos en el período anterior a la ovulación y condiciona por tanto las características de la respuesta en términos reproductivos. Al parecer, un período mayor de 2 semanas se requiere para conseguir una fertilidad aceptable mientras que un período superior a 5 semanas reduciría considerablemente la prolificidad (GELDARD, 1984; CROKER

et al., 1984; CROKER et al., 1987b). Dado que los niveles de inmunización se mantienen durante el citado período, la sincronización no es necesaria.

#### 2.4.5.2. Inmunización pasiva

La inmunización pasiva permite reducir las fuentes de variabilidad individual a lo largo de las experiencias. Así, las características del suero inyectado (título, constante de afinidad, especificidad) son las mismas para todos los animales tratados y pueden conocerse a priori. Además, la variabilidad del título circulante es mucho menor debido a que se inyectan cantidades conocidas, que pueden ajustarse por el peso vivo o por el peso vivo metabólico si se desea. Al tratarse normalmente de inyecciones intravenosas, se evita la variabilidad del tiempo de absorción que normalmente acompaña a los tratamientos por vía S.C. o I.M., pudiendo fijar con más precisión el momento de actuación del antisuero. Por otra parte, al tratarse de anticuerpos que no han sido generados por el propio animal, la caída del título es mucho más rápida (vida media de unos 15 días, WEBB et al., 1984) que en la inmunización activa. Por ello se trata de un procedimiento que actúa perturbando la fisiología de los animales tratados durante períodos cortos y sin implicar directamente la respuesta inmunitaria del animal. Además, existe la posibilidad de efectuar tratamientos con mezclas de sueros contra diversos esteroides en proporciones definidas. Finalmente, la inmunización pasiva no provoca interferencias en los esquemas de selección por tasa de ovulación o prolificidad, debido a su corto período de actuación.

Sin embargo, desde el punto de vista de una posible aplicación tecnológica existen varias desventajas, como son el peligro de contaminación del suero, la relativamente gran cantidad de suero que hay que inyectar I.V. (entre 7,5 y 40 ml, dependiendo del título del antisuero inyectado y del que se pretende alcanzar en el animal) y la necesidad de disponer de grandes cantidades de antisuero de características uniformes. La producción de anticuerpos monoclonales de oveja contra esteroides resolvería en gran medida estas dificultades.

La inmunización pasiva contra AD, T, E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> o una mezcla de los cuatro produjo incrementos en la tasa de ovulación (LAND et al., 1982; LAND et al., 1983) comparables a los obtenidos por inmunización activa (WEBB et al., 1984; RHIND et al., 1986b). El tratamiento consiste en la aplicación de aproximadamente 1 "dosis standard" (definida como 32 ml de suero 1/100.000: RHIND et al., 1987b) I.V. a la retirada de la esponja (RHIND et al., 1985a; RHIND et al., 1986b) o 1,5 "dosis standard" en cubrición no sincronizada (RHIND et al., 1987a; RHIND et al., 1987b).

#### 2.4.6 Efectos producidos por la inmunoneutralización de esteroides ováricos en ovejas

#### 2.4.6.1. Generalidades

Los estudios realizados para conocer los efectos de la inmunización se han realizado fundamentalmente sobre ovejas hiperinmunizadas activamente, con el fin de exacerbar las diferencias. Unos trabajos se han centrado fundamentalmente en aspectos morfológicos como el tamaño y peso de los ovarios, cuerpo lúteo, glándulas adrenales o hipófisis; un lote de animales inmunizados, o no, contra la proteína portadora de los esteroides como determinantes hapténicos (normalmente BSA) se han utilizado como controles. Otros trabajos incluyen aspectos funcionales como las concentraciones hormonales en plasma y/o líquido folicular, o el desarrollo de los folículos bajo los niveles moderados de inmunoneutralización que se utilizan para incrementar la prolificidad. Finalmente, otros artículos se centran en la mortalidad embrionaria o en los efectos sobre la descendencia.

#### 2.4.6.2. Sobre glándulas endocrinas

##### Ovario

El ovario aumenta significativamente de peso en ovejas hiperinmunizadas contra E1 o E2 (SCARAMUZZI *et al.*, 1980b), AD (SCARAMUZZI *et al.*, 1980a) y T (SCARAMUZZI *et al.*, 1981). También se encontraron incrementos significativos de peso tanto en los cuerpos lúteos como en el resto del ovario en ovejas hiperinmunizadas contra E1 o AD (SCARAMUZZI y HOSKINSON, 1984), lo que indica una mayor actividad ovárica. Ausencia de ovulación y folículos luteinizados son frecuentes en ovejas hiperinmunizadas contra los estrógenos y, en menor medida, contra los andrógenos. En ovejas hiperinmunizadas contra P se produjeron ovulaciones aun en presencia de cuerpos lúteos.

##### Utero

El útero puede incrementar su tamaño hasta el correspondiente a la cuarta semana de gestación, al menos en un 20% de las ovejas hiperinmunizadas contra E1 (MARTIN *et al.*, 1979). Otro trabajo anterior no señala estas diferencias (SCARAMUZZI *et al.*, 1980b).

##### Glándulas adrenales e hipófisis

Las glándulas adrenales tienen un peso significativamente superior en ovejas hiperinmunizadas contra E1, pero no contra E2 (SCARAMUZZI *et al.*, 1980b) o AD (SCARAMUZZI *et al.*, 1980a). La hipófisis no experimenta cambios aparentes relacionados con la inmunización contra E1, E2 o AD.

En conclusión, la hiperinmunización contra los esteroides ováricos citados provoca hipertrofia en algunas glándulas endocrinas. Este efecto no se ha

escrito para los niveles más bajos de inmunización que se emplean con fines reproductivos.

#### 2.4.6.3. Sobre el ciclo sexual

Cuando el título de anticuerpos es elevado, se produce ausencia de celo y ovulación independientemente del tipo de esteroide neutralizado, si bien esto ocurre de manera especial en el caso de los estrógenos.

Algunas experiencias muestran que a títulos moderados la inmunización contra AD no afecta a la longitud del ciclo, ni a la duración del celo, si bien el intervalo: comienzo del celo-pico de LH es mayor que en los controles (SCARAMUZZI *et al.*, 1977), pero no siempre de forma significativa (SCARAMUZZI y HOSKINSON, 1984). Por otra parte, el intervalo entre la regresión del cuerpo lúteo (concentración de  $P < 1$  ng/ml) y el comienzo del celo es menor en las inmunizadas (SCARAMUZZI y HOSKINSON, 1984). Consecuentemente con esto, se ha observado que el celo se adelanta en la cubrición de ovejas Merino inmunizadas que se sincronizaron con MAP en estación sexual (SCARAMUZZI *et al.*, 1987), sobre todo para títulos altos (MURRAY *et al.*, 1985a). Sin embargo, se observó el hecho contrario en la cubrición de ovejas Border-Leicester x Merino en primavera, sincronizadas con FGA y PMSG (ROBINSON y SCARAMUZZI, 1986) sobre todo en el lote de título alto (SCARAMUZZI *et al.*, 1987). En otra experiencia, la sincronización con prostaglandinas sintéticas retrasó el celo de las inmunizadas (SCARAMUZZI y HOSKINSON, 1984), pero no siempre (SCARAMUZZI *et al.*, 1987). Es difícil saber si las discrepancias observadas se deben a la raza, método de sincronización o época del año.

La inmunización activa contra P produce acortamientos del ciclo (HOSKINSON *et al.*, 1982b), consecuentemente con el papel que dicha hormona juega en el ciclo sexual.

#### 2.4.6.4. Sobre el desarrollo folicular

La inmunización activa contra AD, en los niveles moderados que se emplean con fines reproductivos, no afecta al número de folículos totales, antrales o atrésicos, ni a su distribución por tamaños (SCARAMUZZI y HOSKINSON, 1984; DRIANCOURT *et al.*, 1985b). Tampoco modifica su velocidad de crecimiento, ni la talla al comienzo de la madurez (respuesta a la hCG) (SCARAMUZZI y HOSKINSON, 1984) ni al número de folículos que regresan entre los días 13 y 15 del ciclo anterior, el número de folículos preovulatorios del día 17 que se reclutan el día 13 o el tamaño de dichos folículos (DRIANCOURT *et al.*, 1985b). Por el contrario, la inmunización activa contra AD provoca una reducción de la proporción de folículos que se atresian entre los días 15 y 17 (DRIANCOURT *et al.*, 1985b). Al parecer, la atresia podría presentarse en folículos algo menores en las inmunizadas (SCARAMUZZI y HOSKINSON, 1984).

Estos hechos parecen indicar una actuación casi exclusivamente en la etapa de selección a través de la neutralización de los andrógenos, que parecen estar relacionados con la atresia (BAIRD y McNEILLY, 1981).

#### 2.4.6.5. Sobre el equilibrio hormonal

##### Consideraciones generales

La inmunoneutralización de hormonas esteroides perturba notablemente el equilibrio hormonal que existe en animales no inmunizados. La comprensión de la nueva situación de equilibrio que se establece resulta bastante difícil, habida cuenta de las interacciones entre las diversas hormonas y el sistema inmunitario. Así, los esteroides ejercen su acción en las células efectoras controlando la expresión génica, tanto a nivel de la transcripción como en etapas posteriores (BECHET, 1986). Dado su carácter hidrófobo, penetran libremente en las células a través de la membrana, debiendo unirse a receptores citoplasmáticos y/o nucleares para poder actuar.

El control de la entrada a la célula lo realizan proteínas plasmáticas ligadoras de esteroides, siendo la fracción libre la que puede penetrar en la célula. Los anticuerpos tienen una constante de afinidad unas 100 veces superior a la de dichas proteínas (NIESCHLAG y WICKINGS, 1978) por lo que la fracción biológicamente activa puede ser 100 veces menor a pesar de que la concentración total del esteroide se haya triplicado (FAIRCLOUGH *et al.*, 1976). Como los receptores celulares tienen constantes de afinidad iguales o mayores que los anticuerpos (FAIRCLOUGH *et al.*, 1976) los efectos de la inmunización contra un esteroide sobre un tipo concreto de células dependerá del grado de competición existente, que vendrá determinado por la cantidad y afinidad relativa de anticuerpos o receptores, así como por la concentración de dicho esteroide.

A la complejidad inherente al feed-back entre esteroides y gonadotropinas, deben añadirse relaciones no muy bien conocidas entre esteroides ováricos y sistema inmunitario: los estrógenos parecen exaltar la respuesta inmune, mientras que andrógenos o progestágenos la atenúan.

Además, los órganos inmunocompetentes pueden tomar parte en la regulación del eje hipotalámico-hipofisario-gonadal en animales no inmunizados (GROSSMAN, 1985).

##### Esteroides

Las concentraciones plasmáticas de hormonas esteroides se han medido en la vena ovárica y/o yugular de ovejas hiperinmunizadas contra dichas hormonas y se ha visto que son muy superiores, al menos en una de las dos venas, a las

encontradas en las correspondientes controles. Así, los niveles plasmáticos en fase lútea de AD, T, E1, E2 y P fueron significativamente mayores, independientemente del esteroide contra el que se hiperinmunizaron (AD, T, E1 o E2). Esto parece debido a un incremento en la secreción neta de esteroides (calculada a partir de la diferencia de concentraciones entre ambas venas) (SCARAMUZZI *et al.*, 1980a; SCARAMUZZI *et al.*, 1980b; SCARAMUZZI *et al.*, 1981) así como a una mayor vida media de estas hormonas (NIESCHLAG y WICKINGS, 1978) y una menor velocidad de eliminación metabólica (MCR) (HODGKINSON *et al.*, 1986), como consecuencia de su ligación a los anticuerpos.

Debe tenerse en cuenta que, aunque la especificidad de los anticuerpos es muy satisfactoria cuando se determina "in vitro" a diluciones altas (PATHIRAJA *et al.*, 1984; LAND *et al.*, 1982), no tiene por qué ser así "in vivo", donde la dilución es mucho más baja, como se deduce de los análisis "in vitro" realizados a diluciones menores (MARTENSZ *et al.*, 1979; SCARAMUZZI *et al.*, 1980a; WEBB *et al.*, 1984).

##### Hormona luteotrópica (LH)

La hiperinmunización contra AD o E1 incrementó significativamente los niveles basales y medios de LH a lo largo de todo el ciclo sexual, así como la frecuencia de pulsaciones en la fase lútea, si bien de forma no significativa; por otra parte, la amplitud de las descargas a lo largo de todo el ciclo se incrementó por hiperinmunización contra E1, pero no contra AD (SCARAMUZZI y HOSKINSON, 1984). La hiperinmunización contra T causó incrementos en los niveles basales de LH (MARTENSZ y SCARAMUZZI, 1979), así como en la frecuencia y amplitud de las pulsaciones (SCARAMUZZI y HOSKINSON, 1984). Estos niveles elevados de LH no parecen ser debidos a una mayor vida media de la LH en los animales hiperinmunizados, al menos contra E2 (PANT *et al.*, 1978), sino más bien a un aumento de la amplitud y/o frecuencia de las pulsaciones de LH. De hecho, se ha encontrado una mayor frecuencia de la pulsatilidad en la fase lútea de ovejas inmunizadas pasivamente contra AD, T, E1 o E2 a niveles moderados de inmunización (PATHIRAJA *et al.*, 1984).

La elevación de la concentración plasmática de LH puede ser la causa, al menos en parte, del incremento de la síntesis de esteroides así como de las alteraciones morfológicas observadas en el ovario (SCARAMUZZI *et al.*, 1980a; SCARAMUZZI *et al.*, 1980b; SCARAMUZZI *et al.*, 1981).

##### Hormona foliculoestimulante (FSH)

La concentración de FSH se incrementa por hiperinmunización contra E1 o E2 (SCARAMUZZI *et al.*, 1980b), mientras que no se altera por hiperinmunización contra T y disminuye en la fase lútea de ovejas hiperinmunizadas contra AD (MARTENSZ y SCARAMUZZI, 1979). La inmunización pasiva a dosis moderadas produce incrementos transitorios de FSH para los antisueros contra E1 o E2

mientras que para los sueros anti-T o anti-AD no se observan cambios, o tal vez una ligera disminución en la concentración de FSH en la fase lútea (PATHIRAJA *et al.*, 1984).

#### 2.4.6.6. Sobre la fertilización y la mortalidad embrionaria

Se considera que entre 30-40% de las ovulaciones observadas en rebaños de explotaciones normales no llegan a producir los corderos correspondientes (MOORE, 1985). Estas pérdidas reproductivas durante la época de celo se deben fundamentalmente a la mortalidad embrionaria ya que los fallos de fertilización se producen tan solo en un porcentaje del 4-14% en condiciones normales (KELLY, 1984).

Hacia el día 12 (unos 4-5 días antes de la implantación) el blastocisto debe producir una señal que evite directa o indirectamente la regresión del cuerpo lúteo: es lo que se llama "reconocimiento materno de la gestación" (FINDLAY, 1984; THATCHER, 1985). La mortalidad anterior a este día se traduce en un retorno en celo en la fecha esperada, mientras que en caso contrario el cuerpo lúteo se mantiene durante un período de hasta 40-50 días (FINDLAY, 1984). Basado en esto, la mortalidad embrionaria ocurre mayoritariamente antes del día 12 (KELLY, 1984). La incidencia de anormalidades cromosómicas sólo es responsable de un 6-11% de la mortalidad embrionaria (MURRAY *et al.*, 1985b; ROBINSON, 1986).

La inmunización contra hormonas esteroideas ha incrementado de forma significativa la tasa de ovulación en todos los casos (SCARAMUZZI y HOSKINSON, 1984; WEBB *et al.*, 1984) y la prolificidad y fecundidad en muchas ocasiones (HARDING *et al.*, 1984; SMITH *et al.*, 1985a; CROKER *et al.*, 1987b) pero no siempre (ALIFAKIOTIS, 1986; RHIND *et al.*, 1986b). Con objeto de estudiar estas pérdidas reproductivas se han realizado estudios basados en la recuperación y evaluación de embriones procedentes de ovejas inmunizadas activamente contra AD, en diferentes estadios durante el primer mes a partir de la concepción. En estos trabajos se ha observado una menor tasa de recuperación en el día 2 en ovejas inmunizadas contra AD (BOLAND *et al.*, 1984; BOLAND *et al.*, 1986b), sobre todo cuando el título es alto en la cubrición (BOLAND *et al.*, 1986a). En los días 5 (SCARAMUZZI *et al.*, 1987) y 13 también se observó una menor tasa de recuperación cuando el título es elevado (BOLAND *et al.*, 1986a). Estos hechos se relacionan en todos los trabajos con una captación fimbrial defectuosa en las ovejas inmunizadas o una pérdida posterior a lo largo del oviducto. El número de óvulos fertilizados fue significativamente menor en ovejas inmunizadas (BOLAND *et al.*, 1984; BOLAND *et al.*, 1986a) así como la proporción de animales con óvulos fertilizados (BOLAND *et al.*, 1986b). Sin embargo, las aberraciones cromosómicas se situaron cerca de un 11% en el día 2, similares a las observadas en los controles (MURRAY *et al.*, 1985b; BOLAND *et al.*, 1986a). La composición cromosómica en los días 13-14 y 24-32 de gestación

tampoco fue significativamente diferente (MURRAY *et al.*, 1986) y la relación de sexos no se apartó sustancialmente de 1:1 en ningún caso. En los días 5 (SCARAMUZZI *et al.*, 1987), 13 y 24-32 se constató un menor número de blastocistos morfológicamente normales por cuerpo lúteo en las inmunizadas a título alto (BOLAND *et al.*, 1986b). La longitud de los embriones en el día 13 fue menor en los animales inmunizados (BOLAND *et al.*, 1986a), así como el índice mitótico, independientemente del título de anticuerpos (BOLAND *et al.*, 1986b). Además, el peso de los embriones hacia el final del primer mes de gestación fue mayor en las ovejas control (BOLAND *et al.*, 1986a; BOLAND *et al.*, 1986b). Esto se asocia con un retraso del desarrollo embrionario en los citados estadios de gestación.

Se concluye que, a pesar de que los incrementos en la tasa de ovulación conllevan siempre un cierto aumento de la mortalidad embrionaria (KELLY, 1984), existe además un efecto negativo adicional del tratamiento sobre la fertilización y el desarrollo embrionario, al menos en inmunización activa contra AD. La captación fimbrial podría también resultar afectada.

#### 2.4.6.7. Sobre la descencia

Las inmunoglobulinas no pueden atravesar la barrera placentaria de los rumiantes por lo que deben adquirirlas durante el primer día de vida a través del calostro, quedando así protegidos pasivamente de las enfermedades en el período anterior a la maduración del sistema inmunitario (WILLIAMS y HALLIDAY, 1978). Aunque los títulos circulantes son bajos en las ovejas inmunizadas activamente contra AD en el día del parto, se produce una transferencia enriquecida a los corderos a través del calostro. De esta forma, los títulos de anticuerpos anti-AD circulantes de los corderos en el día 2 es significativamente mayor que el de sus madres (WILSON *et al.*, 1984).

A pesar de esto, no se han encontrado influencias negativas del tratamiento sobre los parámetros reproductivos de las hembras nacidas de ovejas inmunizadas contra AD o E1, ni sobre el crecimiento o peso al nacimiento de los corderos de ambos sexos (SMITH *et al.*, 1984; COX *et al.*, 1984b).

Sin embargo, en una experiencia, los machos descendientes de ovejas hiperinmunizadas contra AD mostraron una menor actividad sexual que los correspondientes controles (MATTNER *et al.*, 1984). Como esto no se confirmó por inmunización pasiva contra AD de corderos nacidos de ovejas control, se concluyó que el efecto fue debido a la reducción de la concentración de andrógenos libres que atraviesan la placenta durante la gestación en las ovejas inmunizadas, que tendría efectos negativos sobre la organización del sistema nervioso central del feto.

#### 2.4.7. Posibles mecanismos de actuación

Como se ha visto anteriormente, algunas de las perturbaciones hormonales son comunes para la inmunización contra andrógenos y estrógenos, mientras que otras no lo son. Así, en ambos tipos de inmunización la tasa de ovulación podría incrementarse a consecuencia de los aumentos en la frecuencia de pulsos de LH (HARESIGN, 1985), si bien esto no parece ser suficiente. Se postulan otras hipótesis basadas en la diferente actuación de alguna "proteína inductora de la selección" o del "inhibidor del crecimiento folicular" (FGI) presentes en el líquido folicular, (CAHILL, 1984; DRIANCOURT *et al.*, 1985b). Si bien se tienen pruebas indirectas de la existencia de estos compuestos, todavía no se han aislado ni se han podido por tanto estudiar sus concentraciones ni su metabolismo.

##### 2.4.7.1. Inmunización contra andrógenos

La AD no tiene ningún efecto directo sobre el control de la tasa de ovulación (SCARAMUZZI y HOSKINSON, 1984) ni sobre la liberación de gonadotropinas (MARTIN *et al.*, 1983), a pesar de la existencia de receptores para los andrógenos en la pituitaria (WEBB *et al.*, 1984), por lo que la reducción de la concentración de AD libre no puede ser directamente responsable del aumento de la tasa de ovulación observada a través de los mecanismos mencionados. Sin embargo, la incidencia de la atresia, que es menor durante los 3 días anteriores a la ovulación en ovejas inmunizadas contra AD, parece estar mediada por los andrógenos. En efecto, en los folículos de 1-3 mm de diámetro la concentración de andrógenos es superior a la de estrógenos y es en este tipo de folículos donde existe una mayor incidencia de la atresia (CAHILL, 1984). Dado que los anticuerpos contra hormonas esteroideas penetran en el líquido folicular (SCARAMUZZI *et al.*, 1980a; SCARAMUZZI *et al.*, 1980b), la reducción de la fracción de AD libre a nivel local puede haber sido responsable de la menor incidencia de atresia observada en los últimos días del ciclo y por tanto, de una mayor tasa de ovulación en estos animales (SMITH, 1985).

Otra posible explicación no excluyente es que, a pesar de que los niveles de FSH son similares a los controles (SMITH *et al.*, 1986), la sensibilidad del ovario a las gonadotropinas podría estar incrementada. Así se ha observado un efecto sinérgico entre la inmunización contra AD y la dosis de PMSG sobre la tasa de ovulación en primavera (ROBINSON y SCARAMUZZI, 1986), aunque no en un trabajo posterior (SCARAMUZZI *et al.*, 1987). En cualquier caso, la LH y FSH puede que no se comporten del mismo modo que la PMSG, por lo que esta hipótesis debería ser confirmada en posteriores trabajos.

##### 2.4.7.2. Inmunización contra estrógenos

No se han realizado hasta la fecha estudios sobre la dinámica folicular en ovejas inmunizadas contra estrógenos. Los incrementos observados en las concentraciones de FSH y LH podrían inducir el crecimiento de más folículos antrales y permitir la maduración de un número mayor de folículos

preovulatorios (SCARAMUZZI, 1984; HARESIGN, 1985). También podría explicarse por una mayor sensibilidad del ovario a las gonadotropinas, a juzgar por la sinergia entre PMSG e inmunización contra E1 (HOSKINSON *et al.*, 1982a; SCARAMUZZI y HOSKINSON, 1984), si bien esto puede ser dudoso (SMITH, 1985) y no se ha ensayado con FSH.

#### 2.4.8. Resultados reproductivos obtenidos por inmunización activa contra AD o pasiva contra T

En los cuadros 1 y 2, se recopilan datos pertenecientes a diferentes países, épocas del año y razas. Como puede observarse, la tasa de ovulación se ve incrementada en la práctica totalidad de los casos recopilados (hacia un 80%). En estas condiciones, la incidencia de anoestro rara vez es significativa (un 5% de veces). La fertilidad del lote inmunizado (normalmente al primer ciclo) tiende a ser menor en el 70% de los casos, aunque de manera no significativa. A pesar de todo esto, la prolificidad y fecundidad se ven incrementadas significativamente solo en un 47 y un 41% de las experiencias, respectivamente.

Trabajos de recopilación sobre experiencias realizadas a gran escala en condiciones reales de explotación (no incluidas en estos cuadros) señalan incrementos de fecundidad que oscilan entre -13,9% y +37,5% sobre los controles en Australia (CROKER *et al.*, 1987b), entre 0 y 45% en Nueva Zelanda (SMITH *et al.*, 1985a), de 17 a 40% en el Reino Unido (media de 29%), un  $22,2\% \pm 11,8\%$  ( $X \pm D.E.$ ) (Rango desde -2 a +53%) (SMITH, 1985) y un  $25,5\% \pm 2,6\%$  ( $X \pm D.E.$ ), con una probabilidad de obtener beneficios entre un 70 y un 80% en Nueva Zelanda (SCOBIE y BIRCHAM, 1985), dependiendo de las condiciones de explotación.

#### 2.4.9. Factores que condicionan la respuesta en términos reproductivos

##### Raza

No parece que existan grandes diferencias raciales en la respuesta a la inmunización en términos de tasa de ovulación y se considera que sus efectos son aditivos al genotipo (SMITH, 1985), al menos en razas de prolificidad intermedia. En razas más prolíficas, como Finnish Landrace y heterocigotos del Booroola, parece haber una sinergia entre ambos factores, ya que dichas razas presentan una respuesta excesiva a la inmunización (DAVIS y CROSBIE, 1985; SMITH, 1985).

CUADRO 1  
Resultados reproductivos en diferentes razas y países (Inmunización activa  
contra AD), (1)

N	RAZA	PAIS	EST.	AN %	T.O.	P.	F%	FEC	REFERENCIA
197	CR	AUS.	O	1,5	-	-	91	1'04	GELDARD y SCARAMUZZI, 1983
194				3'6	-	-	92	0'93	
123	CR	AUS.	O	1'6	-	-	87	1'42	
127				0'8	-	-	92	1'22	
103	M	AUS.	O	-	-	-	94	1'04	
102				-	-	-	96	0'94	
86	BLM&R	AUS.	O	9'3	-	-	94	1'33	
94				7'4	-	-	96	1'15	
99	R	AUS.	O	7'1	-	-	93	1'24	
113				3'5	-	-	99	1'03	
147	PW	AUS.	O	0'0	-	-	95	1'31	
141				0'7	-	-	94	1'17	
52	CR	AUS.	O	3'8	-	-	90	1'38	
52				0'0	-	-	94	1'10	
-	BLM&R	AUS.	O	-	-	-	-	1'43	
-				-	-	-	-	1'06	
8GR	M	AUS.	V-O	-	-	-	-	1'13*	GELDARD, 1984
								0'95	
5GR	CR	AUS.	V-O	-	-	-	-	1'58*	
								1'33	
13GR	BLM	AUS.	V-O	-	-	-	-	1'47*	
								1'16	
5GR	R+P&CW	AUS.	V-O	-	-	-	-	1'89*	
								1'49	
50	M	AUS.	O	2'0	1'82*	1'57	94	1'48*	COK et al., 1984a
50				2'0	1'46	1'33	92	1'22	
50	M	AUS.	O	4'0	1'10	1'07	92	0'98*	
50				18'0	1'02	1'00	68	0'68	
45	M	AUS.	O	2'2	-	1'46	82	1'33*	
43				2'3	-	1'24	88	1'09	
49	M	AUS.	O	2'0	1'43*	1'16	77	0'90	
48				4'2	1'14	1'05	83	0'88	

CUADRO 1 (continuación)  
Resultados reproductivos en diferentes razas y países (Inmunización activa  
contra AD), (1)

N	RAZA	PAIS	EST.	AN %	T.O.	P.	F%	FEC	REFERENCIA	
143	R	N.Z.	O	-	-	-	-	1'78*	GELDARD et al., 1984	
142				-	-	-	-	1'36		
192	CW	N.Z.	O	-	-	-	-	1'83*		
196				-	-	-	-	1'49		
187	PL	N.Z.	O	-	-	-	-	1'74*		
178				-	-	-	-	1'34		
194	CW	N.Z.	O	-	-	-	-	2'01*		
193				-	-	-	-	1'67		
124	CW	N.Z.	O	-	-	-	-	2'21*		
111				-	-	-	-	1'76		
48	MA	FRA.	P-V	30'0	2'00*	1'62*	81	-	COGNIE et al., 1984	
48				33'0	1'26	1'16	90	-		
24	CHR	FRA.	O	0'0	2'04*	1'60*	96	-		
23				0'0	1'17	1'10	100	-		
29	PS	FRA.	I	0'0	2'17*	1'60	86	-		
20				0'0	1'75	1'60	95	-		
47	PS	FRA.	I	15'0	1'98*	1'63*	64	-		
48				14'0	1'34	1'33	69	-		
95	BLM	AUS.	P	12'0	1'7*	1'70*	39	0'66		ROBINSON y SCARAMUZZI, 1986
98				6'0	1'3	1'43	48	0'68		
168	BLM	AUS.	P	6,0	2'9*	1'80*	26	0'47		
168				2'0	2'2	1'42	34	0'48		
193	BLM	AUS.	P	3'0	2'8*	1'81*	64	1'16*		
199				2'0	1'8	1'34	66	0'88		
79	BLM	AUS.	P	6'0	2'2	1'53	69*	1'05*		
75				12'0	1'8	1'47	48	0'70		
124	BLM	AUS.	P	3'0	1'7*	1'45	66	0'95		
110				6'0	1'3	1'35	61	0'82		
9	G	U.K.	O	11'0	2'44	1'89*	55'6	1'05	QUIRKE et al., 1986	
10				0'0	1'40	1'30	70'0	0'91		
9	FL	U.K.	O	0'0	3'89	2'44	77'8	1'90		
9				0'0	3'33	2'89	77'8	2'25		
96	G	U.K.	O	26'0*	2'52*	1'89*	90'5	1'71*		
63				0'0	1'75	1'48	92'1	1'36		

CUADRO 1 (continuación)  
Resultados reproductivos en diferentes razas y países (Inmunización activa contra AD), (1)

N	RAZA	PAIS	EST.	AN %	T.O.	P.	F%	FEC	REFERENCIA	
31 29	BLxSBF	U.K.	O	3'2 3'4	2'03* 1'41	1'67 1'75	29'9 28'6	0'50 0'50	RHIND et al., 1986b	
26 22	BLxSBF	U.K.	O	23'1 0,0	2'69* 1'82	2'14 1'87	35'0 68'4	0'75 1'28		
23 27	BLxSBF	U.K.	O	8'7 11'1	3'18* 2'00	3'00* 1'90	33'3 83'2	1'00 1'58*		
38 37	BLxSBF	U.K.	O	13'2 10'8	3'46* 2'29	2'54* 1'92	66'5 77'1	1'69 1'48		
100 100	KK	GRE.	-	- -	2'5* 1'6	1'67 1'50	- -	- -		
100 100	S	GRE.	-	- -	2'06* 1'46	1'43 1'23	- -	- -		
100 100	V	GRE.	-	- -	2'2* 1'5	1'58 1'45	- -	- -		ALIFAKIOTIS, 1986
100 100	F	GRE.	-	- -	3'2* 2'5	1'56* 1'28	- -	- -		
100 100	K	GRE.	-	- -	4'2* 2'5	2'61* 2'04	- -	- -		
100 100	CH	GRE.	-	- -	4'8* 2'9	2'45 2'45	- -	- -		
214 212	RA	ESP.	O	- -	1'86* 1'59	1'49 1'46	78'5 79'7	1'17 1'16	FOLCH, 1986	
23 24	RA	ESP.	O	- -	- -	1'11 1'00	39'1 62'5	0'43 0'63		
77 64	RA	ESP.	O	- -	- -	1'45* 1'27	83'1 87'5	1'21 1'11		
168 168	BLxM	AUS.	P	6'5* 1'8	2'92* 2'23	1'80* 1'42	26'2 33'9	0'47 0'48		SCARAMUZZI et al., 1987
193 199	BLxM	AUS.	P	2'6 1'5	2'82* 1'84	1'81* 1'34	64'2 65'5	1'16* 0'88		
34 35	NOC	U.K.	O	2'9 0'0	- -	1'45 1'17	91'0 85'5	1'32 1'00	RHIND, 1987	
34 35	SBF	U.K.	O	8'8 2'9	- -	1'55* 1'26	96'8 88'1	1'50* 1'11		
30 30	EFxNOC	U.K.	O	3'3 0'0	- -	1'66 1'48	94'6 96'6	1'57 1'43		

CUADRO 1 (conclusión)  
Resultados reproductivos en diferentes razas y países (Inmunización activa contra AD), (1)

N	RAZA	PAIS	EST.	AN %	T.O.	P.	F%	FEC.	REFERENCIA
23 24	SBF	U.K.	O	0'0 0,0	2'35* 1'69	1'91* 1'48	95'7 87'5	1'87* 1'33	LAND et al., 1982
31 31	SBF	U.K.	O	0'0 0'0	2'42 2'08	2'00 1'86	90'3 93'5	1'81 1'74	
18 27	WM	U.K.	-	- -	1'78* 1'26	1'61 1'20	100'0 70'4	1'61 0'84	
36 35	SBF	U.K.	O	2,8 2'9	1'67* 1'07	1'63* 1'13	88'9 68'6	1'47* 0'80	
37 29	BLxSBF	U.K.	O	5'4 3'4	1'67* 1'41	1'54 1'75	37'0 28,6	0'57 0'50	RHIND et al., 1986b
23 22	BLxSBF	U.K.	O	21'7 0'0	2'14* 1'82	1'63 1'87	44'2 68'4	0'72 1'28	
26 27	BLxSBF	U.K.	O	0'0 11'1	2'40 2'00	2'33 1'90	69'1 83'2	1'61 1'58	
31 37	BLxSBF	U.K.	O	9'7 10'8	2'73* 2'29	2'33* 1'92	75'1 77'1	1'75 1'48	
148 148	SBF	U.K.	O	- -	2'31* 1'86	1'82* 1'62	- -	- -	
73 87	RA	ESP.	O	- -	1'41* 1'23	1'24 1'15	77'0 71'0	0'95 0'82	FOLCH, no pub.
48 87	RA	ESP.	P	- -	1'51* 1'23	1'32 1'15	77'0 71'0	1'02 0'82	

(1) Los datos de las líneas superior e inferior corresponden a los grupos inmunizado y control, respectivamente (ambos cuadros 1 y 2). El asterisco (\*) indica que existe significación estadística, al menos al nivel de riesgo del 5%. Abreviaturas utilizadas en ambos cuadros: N, número de animales; GR, granjas; CR, corriedale; M, merino; BLM, border-leicester merino; R, romney; PW, polwarth; CW, coopworth; PL, perendale; MA, merino d'Arles; CHR, charmoise; PS, préalpes du sud; G, galway; FL, finnish landrace; SBF, scottish blackface; KK, kargouniko; S, serres; V, vlachico; F, florinis; K, kimis; CH, chios; RA, rasa aragonesa; NOC, north country cheviot; EF, east friesland; WM, welsh mountain; AUS, Australia; N.Z., Nueva Zelanda; FRA., Francia; U.K., Reino Unido; GRE., Grecia; ESP., España; EST., estación del año; O, otoño; V, verano; I, invierno; P, primavera; AN%, porcentaje de ovejas sin celo; T.O., tasa de ovulación; P., prolificidad; F%, porcentaje de ovejas fértiles; FEC, fecundidad.

En términos de fecundidad, el Merino australiano parece responder menos que sus híbridos, y a su vez estos responden menos que otras razas de Nueva Zelanda (GELDARD, 1984). Sin embargo, estos resultados pueden estar sesgados por efectos del peso, nutrición, manejo y situación geográfica (SMITH, 1985).

#### Edad

La respuesta en términos de tasa de ovulación no difiere significativamente entre los 6 meses y los 7 años (SMITH, 1985). En términos de fecundidad tampoco se observan diferencias significativas entre 18 meses y 7 años (SMITH, 1985), si bien hay una tendencia a verse incrementada la respuesta con la edad (GELDARD, 1984).

#### Peso

No se ha observado interacción significativa entre el efecto peso y la inmunización en lo que se refiere a la tasa de ovulación (SMITH *et al.*, 1985b), si bien hay una cierta tendencia a actuar sinérgicamente (RHIND *et al.*, 1986b).

En lo referente a la fecundidad, los dos factores tienden a actuar de manera sinérgica, dado el efecto beneficioso del peso sobre la fertilidad y mortalidad embrionaria (SMITH *et al.*, 1985b; SMITH, 1985).

#### Condición corporal

Los efectos de la inmunización sobre la tasa de ovulación son aditivos a los correspondientes a la condición corporal (HARDING *et al.*, 1984; RHIND *et al.*, 1986b; RHIND *et al.*, 1987a; RHIND *et al.*, 1987b), siempre que no se haya alcanzado el límite genético típico de cada raza (RHIND *et al.*, 1985a). Existe, no obstante, una tendencia hacia respuestas más elevadas para valores más altos de la condición corporal (RHIND *et al.*, 1986b).

La fertilidad en el primer ciclo de cubrición tiende a disminuir a consecuencia de la inmunización en ovejas de condición corporal intermedia y baja, en ocasiones significativamente (RHIND *et al.*, 1986b), sobre todo si el título de anticuerpos es alto (RHIND *et al.*, 1987b).

En ovejas de muy alta condición corporal la prolificidad y fecundidad no aumentan demasiado debido quizás a que se alcanza el límite genético (RHIND *et al.*, 1985a).

#### Nutrición

El flushing y la inmunización actúan de forma aditiva sobre la tasa de ovulación (SMITH, 1985; SMITH *et al.*, 1985b), al menos para niveles altos de condición

corporal (RHIND *et al.*, 1987a). Estos incrementos en la tasa de ovulación se reflejan generalmente, al menos de forma parcial, en un aumento de la prolificidad (RHIND *et al.*, 1987a) y fecundidad (SMITH, 1985). Se ha descrito, sin embargo, un caso en que ambos factores interfirieron en términos de prolificidad y fecundidad, a través de incrementos aditivos de los fallos parciales en las ovulaciones múltiples (SMITH *et al.*, 1985b).

La inmunización potencia los efectos perjudiciales de los fitoestrógenos sobre la fertilidad. A pesar de que la tasa de ovulación aumenta, la prolificidad y fecundidad se mantienen (LITTLE *et al.*, 1984).

#### Epoca del año

Este factor no parece ser importante, al menos en lo referente a la respuesta en términos de tasa de ovulación en la raza Coopworth, ni en fecundidad en Merino y Border-Leicester x Merino. Tampoco influye sobre la efectividad del efecto macho (SMITH, 1985).

#### Nivel de inmunización

La inmunización contra AD o T consigue estimular la productividad en los casos en que factores endocrinos suprimen la expresión completa del potencial genético del animal (HOSKINSON y DJURA, 1984). Sin embargo, al contrario de la PMSG, no es capaz de incrementar la tasa de ovulación por encima de dicho límite genético, de forma que una vez alcanzado éste por medios naturales (mejora de la condición corporal, estación favorable, etc.) el efecto de la inmunización es poco marcado (RHIND *et al.*, 1985a).

La tasa de ovulación está correlacionada con el título de anticuerpos (COX Y WILSON, 1984; QUIRKE *et al.*, 1986; RHIND *et al.*, 1986b), si bien de forma curvilínea, de tal manera que aumenta conforme aumenta el título hasta alcanzar un máximo y disminuye para títulos superiores (WEBB *et al.*, 1984), llegando a bloquearse la ovulación y el celo en ovejas hiperinmunizadas (SMITH *et al.*, 1981; SCARAMUZZI *et al.*, 1981). Sin embargo, existe un amplio margen de valores del título de anticuerpos en el que se obtienen respuestas adecuadas (RHIND *et al.*, 1987a; RHIND *et al.*, 1987b).

La fertilidad también está relacionada con el título de anticuerpos, siendo éste significativamente mayor en las ovejas vacías que en las que paren (QUIRKE *et al.*, 1986). Los niveles altos de inmunización asociados a intervalos inferiores a 4 semanas entre la dosis de recuerdo y la cubrición disminuyen el porcentaje de ovejas en celo y la fertilidad (CROKER *et al.*, 1984; GELDARD, 1984; SMITH, 1985; CROKER *et al.*, 1987a; CROKER *et al.*, 1987b) así como la tasa de fertilización y de viabilidad y crecimiento embrionarios (BOLAND *et al.*, 1986b). Estos efectos perjudiciales se acentúan en animales de peso y condición corporal bajos (SMITH *et al.*, 1985c; RHIND *et al.*, 1987b).

### **3. ANTECEDENTES, PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS**

### 3. ANTECEDENTES, PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

#### 3.1. Antecedentes

El Departamento de Producción Animal del Servicio de Investigación Agraria realizó una serie de experiencias sobre inmunización activa contra androstenodiona (FOLCH, 1986) y pasiva contra testosterona (FOLCH, *et al.*, no publicado) con anterioridad al comienzo del presente trabajo. Los resultados de dichas experiencias, que pasamos a comentar brevemente, indicaron la necesidad de estudiar los factores que pueden influir en la respuesta a la inmunización en términos reproductivos y poder así optimizar esta técnica.

En el trabajo sobre inmunización activa contra AD se utilizaron un total de 426 ovejas adultas y 46 corderas de raza Rasa Aragonesa procedentes de 9 explotaciones. Las cubriciones se realizaron en otoño, tras la inmunización de aproximadamente la mitad de las ovejas. En el primer año se vio que el tratamiento no afectaba al porcentaje de ovejas en celo ni a la proporción de partos típles (1,8 vs. 1,2% en el control, N.S.). La tasa de ovulación aumentó (+17%,  $p < 0,01$ ) debido fundamentalmente al incremento del porcentaje de ovulaciones dobles, pero la prolificidad sólo aumentó en una de las explotaciones (+127%,  $p < 0,05$ ). En ésta, la fertilidad no se redujo significativamente por el tratamiento (-1,3%) pero mermó el aumento de la fecundidad a un +6,5% sobre el control. Se observó que parte de las ovejas que tuvieron ovulaciones múltiples (dobles o triples) sólo consiguieron llevar a término una parte de dichas ovulaciones (fallo parcial de las ovulaciones múltiples, FPOM). El FPOM aumentó a consecuencia de la inmunización (+20,6%,  $p < 0,01$ ), siendo la razón fundamental de que la prolificidad no aumentase significativamente en la mayor parte de las explotaciones. La fertilidad global no se afectó significativamente a consecuencia de la inmunización (-1,2%, N.S.). En las corderas los incrementos de prolificidad fueron algo menores (+11%) y la fertilidad disminuyó considerablemente en el lote tratado (-23%) si bien no se consiguió significación estadística debido al bajo número de animales utilizados. Cuando parte de las ovejas se reinmunizaron en la cubrición siguiente, los incrementos en prolificidad sobre los controles (+14,2%  $p < 0,05$ ) y fecundidad (+9%) fueron sensiblemente mayores que los obtenidos en la primera inmunización. El porcentaje de ovejas en celo y la fertilidad no variaron significativamente respecto de los controles, ni tampoco el porcentaje de partos triples (2,3% vs 3,2%, N.S.).

En el trabajo sobre inmunización pasiva contra T se utilizaron 195 ovejas adultas en dos experiencias realizadas en primavera y otoño, respectivamente. En ellas se comparó el tratamiento FGA + inmunización pasiva con el clásico tratamiento de FGA + PMSG o FGA sólo (control). Como los resultados de ambas experiencias fueron muy similares, los datos pudieron combinarse. La tasa de ovulación del lote inmunizado se incrementó significativamente respecto del

control (+22,8%,  $p < 0,05$ ) de manera similar al lote de PMSG (+32,5%,  $p < 0,05$ ). Sin embargo, el porcentaje de ovulaciones triples fue mayor en este último que en el inmunizado (14% vs 4%), así como la proporción de partos triples (9% vs 3%). La prolificidad de las ovejas inmunizadas se incrementó respecto de las controles (+14,8%) similarmente a las tratadas con PMSG (+16,5%). La fertilidad aumentó ligeramente en ambos grupos tratados (+8,4%), por lo que los incrementos en la fecundidad fueron de +22,8 y +32,5% en los lotes de FGA + IP y FGA + PMSG, respectivamente. El FPOM fue del mismo orden en los tres lotes (22, 25 y 23% para los lotes de IP, PMSG y control).

### 3. 2. Planteamiento del trabajo

Los resultados anteriormente expuestos indican que esta técnica no afecta significativamente a la proporción de ovejas en celo ni a su fertilidad. Es de señalar el hecho de que se consiga aumentar moderadamente la tasa de ovulación, reduciendo el porcentaje de partos triples respecto del tratamiento clásico con PMSG. Sin embargo, parece ser que el fallo parcial de las ovulaciones múltiples reduce considerablemente los incrementos de prolificidad en la inmunización activa contra AD en la mayor parte de las ocasiones. Esto deberá confirmarse en sucesivas experiencias ya que, de ser así, dicho tratamiento no sería aplicable en esta raza, al menos, bajo las condiciones en que se realizaron los trabajos precedentes. Dado que la intensidad de la respuesta inmunitaria está sujeta a gran variabilidad, es fundamental cuantificar la magnitud del nivel de inmunización en esta raza, así como su evolución temporal y la influencia que ejerce sobre los resultados reproductivos. Asimismo, es necesario poder medir parámetros hormonales relativos a la progesterona y la LH con el fin de conocer si existen en los mismos alteraciones importantes relacionadas con el nivel de inmunización que permitan explicar los hechos observados. Por otra parte, es posible que factores como la alimentación, edad, peso, condición corporal, tiempo transcurrido desde el último parto, etc, condicionen la respuesta al tratamiento en términos reproductivos, por lo que quizás habría que optimizar los resultados aplicando esta técnica en las condiciones más apropiadas. En concreto se consideró interesante conocer la influencia de una suplementación nutricional moderada sobre la respuesta al tratamiento en términos reproductivos, así como tener alguna estimación de cómo influyen las variables: peso, condición corporal y edad. Si se sigue observando un incremento del FPOM debido al tratamiento, habría que saber si se debe a fallos de captación fimbrial, fallos en la fertilización o mortalidad embrionaria, con el fin de aproximarse correctamente al problema y tratar de solventarlo en futuras experiencias.

En lo referente a la inmunización pasiva contra testosterona parece que los incrementos en prolificidad y fecundidad son mayores que en la inmunización activa contra androstenodiona debido a una mayor fertilidad y menor FPOM.

Aunque la inmunización pasiva contra esteroides cuenta con más problemas técnicos a la hora de una posible utilización a gran escala, constituye una herramienta muy útil en la investigación ya que permite controlar mejor el nivel de inmunización de los animales. Por ello, parece necesario confirmar estos datos mediante experiencias en que se ensayen ambos tipos de inmunización paralelamente con el fin de realizar estudios comparativos respecto de los parámetros fisiológicos que se han citado anteriormente.

### 3.3. Objetivos

Como consecuencia lógica de las consideraciones anteriormente expuestas, se plantean los siguientes objetivos para el presente trabajo:

1. Poner a punto una técnica que permita medir el nivel de inmunización en las ovejas.
2. Conocer la evolución de la respuesta inmunitaria en la inmunización activa contra androstenodiona y pasiva contra testosterona.
3. Tratar de hallar relaciones entre los parámetros reproductivos, la magnitud de la respuesta inmunitaria y los niveles plasmáticos de progesterona y hormona luteinizante.
4. Conocer la influencia de la alimentación, peso, edad y condición corporal sobre la eficacia de la inmunización activa contra androstenodiona en términos reproductivos.
5. Determinar si las pérdidas reproductivas encontradas se deben a fallos de fertilización o a degeneración embrionaria en ambos tipos de inmunización, y su relación con la magnitud de la respuesta inmunitaria.
6. Saber si la capacidad de las ovejas para soportar una gestación gemelar se ve alterada por dichos tratamientos y en su caso, la dependencia del nivel de inmunización.



## **4. MATERIAL Y METODOS**

## 4. MATERIAL Y METODOS UTILIZADOS

### 4. 1. Inmunización de los animales

#### 4.1.1. *Inmunización activa contra androstenodiona*

La inmunización activa contra AD se llevó a cabo con FECUNDIN (Cooper Zeltia). Este preparado está formado por 0,6 mg/ml del inmunógeno androstenodiona-7 $\alpha$ -carboxietil-tioéter: HSA (HSA = seroalbúmina humana) (Anejo 4), 50 mg/ml del coadyuvante dimetil-aminoetil-dextrano (DEAE-dextrano), 9 mg/ml de NaCl y 0,2 mg/ml de tiomersal en solución acuosa.

El tratamiento se realizó por inyección subcutánea de 2 ml del preparado en el cuello. Cuando los animales se inmunizaron por primera vez, se aplicó una segunda dosis análoga 4 semanas más tarde. El intervalo entre la última dosis y la cubrición está especificado en cada experiencia y fue de 2 a 4 semanas.

#### 4.1.2. *Hiperinmunización activa contra testosterona*

El inmunógeno utilizado fue testosterona-3-para- hidrazinobenzoil-BSA (BSA = seroalbúmina bovina) (Anejo 5). Dicho antígeno fue sintetizado y cedido amablemente por M. Terqui (TERQUI, 1978). El procedimiento de inmunización es el de VAITUKIAITIS ligeramente modificado (SCARAMUZZI *et al.*, 1975). Se tomaron 5 mg del inmunógeno, se disolvieron en 1,5 ml de suero fisiológico y se añadieron 0,5 ml de una vacuna triple, contra la difteria, tétanos y tosferina adsorbida sobre hidróxido de aluminio (WELLTRIVAX, Wellcome). A esta mezcla se añadieron, gota a gota, agitando en vortex, 2 ml de coadyuvante completo de Freund (Difco). La emulsión así formada se inyectó intradérmicamente en 20 sitios de la zona ventral. Este proceso se repitió otras 2 veces a intervalos de 1 mes, sustituyendo el coadyuvante de Freund completo por el incompleto (Difco). Se realizaron tomas de sangre semanales, a partir de cada dosis de recuerdo en las cuales se midió el título de anticuerpos. De un total de 8 ovejas hiperinmunizadas sólo se guardaron 3, que alcanzaron títulos de anticuerpos superiores a 1/10.000.

#### 4.1.3. *Inmunización pasiva contra testosterona*

El suero procedente de las ovejas hiperinmunizadas se inyectó por vía intravenosa en la yugular. La cantidad inyectada varió según la potencia del suero y el título de anticuerpos que se pretendía alcanzar en las ovejas tratadas (entre 20 y 40 ml de suero).

### 4. 2. Extracciones de sangre

Las extracciones de sangre se practicaron en la vena yugular, mediante tubos al vacío (VENOJECT, Terumo), con heparina de sodio en los casos en que había que

obtener plasma. Los tubos fueron centrifugados a 1.500 g (Hermle Z-364) y los plasmas recuperados se mantuvieron a -20°C hasta su análisis.

La obtención de suero en grandes cantidades de las ovejas hiperinmunizadas se realizó en matraz erlenmeyer de 500 ml mediante un sistema de vacío. Los sueros se dejaron coagular a temperatura ambiente durante 3 horas y después durante toda la noche a 4°C (unas 16 horas). Al día siguiente, se separaron los coágulos, se centrifugaron los sueros y se tomó una alícuota de 3 ml en tubo de poliestireno para su análisis. A continuación se congelaron a -20°C hasta que se analizaron y mezclaron en las cantidades apropiadas para tratar a las ovejas.

### 4. 3. Determinación del nivel de inmunización

#### 4.3.1 Introducción

El título de anticuerpos es el parámetro más comúnmente utilizado para medir la respuesta inmunitaria humoral específica de un animal tras la sensibilización contra un antígeno determinado. Su definición, así como el método de determinación, varían ligeramente con el tipo de antígeno considerado. En el caso de las hormonas esteroides, el título de anticuerpos se mide por RIA y se define, según ABRAHAM, 1970, cit. por SCARAMUZZI *et al.* (1975) como la dilución que es capaz de ligar el 50% de una cantidad determinada de hormona marcada añadida. El título de anticuerpos es, por definición, una estimación conjunta de la afinidad de los anticuerpos específicos y de su concentración. Definido así, el título de anticuerpos depende de las concentraciones de esteroide marcado y de antisuero en el volumen de la mezcla. Así, si mantenemos fijos el volumen total y el volumen de la dilución del antisuero, el aumento de la cantidad de esteroide marcado conlleva un incremento de la cantidad de hormona ligada en términos absolutos, pero el porcentaje de ligación sobre el total añadido disminuye. Como consecuencia de esto, al aumentar la cantidad de esteroide marcado disminuye el título y viceversa. Es, pues, muy importante especificar el protocolo de diluciones y volumen total empleado, así como la cantidad de esteroide añadido. Los métodos empleados por diferentes autores son bastante similares (SCARAMUZZI *et al.*, 1975; MARTIN *et al.*, 1979; LAND *et al.*, 1982). Las mayores diferencias residen en la cantidad de esteroide utilizado (entre 10 y 38 pg). Algunos autores (WEBB *et al.*, 1984) sugieren la transformación del título de anticuerpos en masa de esteroide ligado por ml de antisuero puro (sin diluir), con el fin de que los valores sean prácticamente independientes de la cantidad de esteroide añadido.

Para determinar el título de anticuerpos es necesario conocer el porcentaje de ligación de varias diluciones del antisuero, ya que la curva de esta variable frente a la dilución (o frente a su logaritmo) es de tipo logístico, con 2 asíntotas en las que antisueros de diferente potencia serían aparentemente muy similares. Sin embargo, en la zona del 50% de ligación (punto de inflexión) es donde mejor se

aprecian las diferencias entre sueros. La determinación de la dilución correspondiente es más fiable si procede de la interpolación entre al menos 2 diluciones, ya que los valores extrapolados suelen ser poco consistentes. Para realizar esta interpolación es necesario efectuar una serie de transformaciones. Dado el carácter sigmoidal de la curva, es aconsejable linealizarla mediante la transformación logit-log. A continuación, una simple regresión no es suficiente, ya que esta transformación es heteroscedástica, es decir, la varianza de la variable independiente (logit del cociente de ligación) depende de la variable independiente (logaritmo de la dilución). Por ello, es necesario ponderar por la varianza antes de realizar la regresión. Los datos del título de anticuerpos o de ligación plasmática (expresados, p. ej., como pmols ligados/ml de antisuero puro) presentan una gran variabilidad de un animal a otro. Por ello, es conveniente transformarlos en logaritmos con el fin de reducir la varianza antes de realizar comparaciones entre lotes de animales. La media geométrica y la media logarítmica se emplean con más frecuencia que la media aritmética y la media armónica.

Los datos del título de anticuerpos suelen ser muy poco reproducibles entre laboratorios. Esto es debido a que los valores de este tipo de determinación son muy sensibles a cualquier variación de condiciones experimentales que afectan a la ligación antígeno-anticuerpo: en particular, pH del tampón, temperatura y tiempo de incubación, temperatura y tiempo de contacto con el carbón-dextrano, capacidad de adsorción del carbón, degradación parcial del esteroide marcado, y elementos extraños que interfirieran en dicha interacción, como p. ej. la presencia de contaminación con el esteroide no marcado. Dentro de un mismo laboratorio también puede haber sustanciales variaciones de un día a otro, por lo que es importante incluir alguna referencia dentro de cada análisis.

Para conocer la masa de esteroide añadido por tubo es necesario conocer la actividad específica de la hormona marcada y la eficiencia del conteo. Mientras que la primera viene especificada por el fabricante (normalmente en Ci/mmol), la segunda depende del tipo de contador de centelleo, del tipo de vial utilizado, del líquido de centelleo y de la composición de la muestra. Para corregir la extinción (quenching) y poder transformar las cuentas por minuto (CPM) en desintegraciones reales por minuto (DPM) es necesario disponer de standards apropiados.

#### 4.3.2 Técnica utilizada

El método empleado en este trabajo es el descrito por SCARAMUZZI *et al.*, (1975) adaptado a nuestras condiciones de trabajo:

De cada muestra de suero o plasma se tomaron 100 µl y se añadieron 400 µl de tampón fosfato-gelatina (PBS 0,1 M, pH 7, 0,9% NaCl, 0,1% gelatina (Merck), 0,1% NaN<sub>3</sub>) en tubos eppendorff de 2 ml, etiquetados como 1/10. De cada uno

de éstos se tomaron 100 µl y se añadieron 900 µl de tampón, en tubos Eppendorff etiquetados 1/100, y así sucesivamente hasta 1/1.000.000 o una dilución menor, según el nivel previsto de inmunización de las muestras. De éstos se pipetearon 50 µl por duplicado en tubos de poliestireno (12 X 70 mm, Greiner) y se añadieron 250 µl de una disolución de unos 92 pg/ml de 1, 2, 6, 7-<sup>3</sup>H-androstenodiona (Amersham, 80-110 Ci/mmol) o 1, 2, 6, 7-<sup>3</sup>H-testosterona (Amersham, 80-105 Ci/mmol) en tampón fosfato, se agitaron en agitador de tipo vortex (Dinko-D-051) y se dejaron incubar durante toda la noche a 4°C (unas 16 horas). Otros tubos contenían 50 µl de tampón en vez de dilución de antisuero para estimar la cantidad total de hormona tritiada añadida (5 tubos cada 96) y la ligación no específica (4 tubos cada 96).

Al día siguiente, se añadió 1 ml de suspensión de carbón activo (2,5 mg/ml Norit A, Sigma) y dextrano T-70 (0,25 mg/ml, Sigma) en tampón fosfato a todos los tubos, por series de 96, excepto a los totales, que se les añadió 1 ml de tampón. Se agitaron los tubos y se incubaron a 4°C durante 15 minutos, se centrifugaron a 2.000 g (Selecta-Macrofriger) durante otros 15 minutos (excepto los totales) y se decantaron los sobrenadantes en viales de centelleo (15 x 55 mm, Greiner). Se añadieron 4,3 ml de líquido de centelleo [667 ml de tolueno (Merck), 333 ml de tritón X-100 (Merck), 2,67 gr PPO (Sigma) y 66,7 mg POPOP (Sigma) por litro], se agitaron y se contaron durante 1 minuto (LKB-Rackbeta). Las adiciones se realizaron con un diluidor semiautomático (Microlab 1000), mediante micropipetas (Socorex), un dispensador de repetición (Multipette, Eppendorff) o un dispensador acoplado a la botella del líquido de centelleo (Hirschmann-dispenser).

#### 4.3.3. Estimación de la eficiencia del conteo

Se prepararon dos series de standards de quenching, una con tritón en el líquido de centelleo (eficiencias más bajas) y otra sin tritón (eficiencias más altas). A 10 viales de centelleo de cada serie se añadieron 100 µl de una disolución de testosterona marcada (unas 12.000 CPM), 4,3 ml de líquido de centelleo (con o sin tritón) y 0, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 120 y 300 µl de cloroformo (Panreac). Otro vial de centelleo se llenó con sólo líquido de centelleo para estimar el ruido de fondo. Estos viales fueron contados y las DPM se estimaron mediante el número H, a partir de standards certificados, en 24035 ± 158 DPM. En cada ensayo, estos viales fueron contados a continuación de las muestras, determinando la relación de canales. La eficiencia con que se contó cada uno de los totales fue estimada por interpolación entre 3 standards, mediante un polinomio de interpolación de Lagrange. En el Anejo 6 se ofrece el programa de ordenador correspondiente (DIPIEM) redactado en BASIC. La eficiencia de las muestras fue cercana al 22% (Anejo 7). La masa de esteroide total por tubo (pg/tubo) se calculó mediante la fórmula:  $M = T \times P \times 1.000 / (2.220.000 \times A)$ , siendo A = actividad específica (Ci/mmol); P = peso molecular de esteroide marcado (gr/mol); T =

#### STANDARDS DE QUENCHING SIN TRITON

DPM DE LOS PATRONES DE EXTINCION : 24035  
 PERIODO DE SEMIDESINTEGRACION DEL ISOTOPO: 4478  
 TIEMPO TRANSCURRIDO: 32

Patron	H	Eficiencia	CPM
1	1124	51.95	12441
2	947	48.72	11669
3	834	47.09	11279
4	731	44.76	10720
5	649	44.26	10601
6	565	40.05	9595
7	376	34.60	8292
8	201	25.49	6113
9	41	9.71	2338

#### STANDARDS DE QUENCHING CON TRITON

DPM DE LOS PATRONES DE EXTINCION : 24035  
 PERIODO DE SEMIDESINTEGRACION DEL ISOTOPO: 4478  
 TIEMPO TRANSCURRIDO: 32

Patron	H	Eficiencia	CPM
1	505	38.93	9321
2	462	38.34	9180
3	396	36.53	8747
4	354	33.79	8091
5	325	32.94	7887
6	262	30.80	7377
7	127	21.29	5102
8	53	12.33	2960
9	36	1.22	302

Eficiencia y relación de canales en ambas series de standards de quenching. El número H se ha sustituido por la relación de canales multiplicada por mil (SCRx1000)

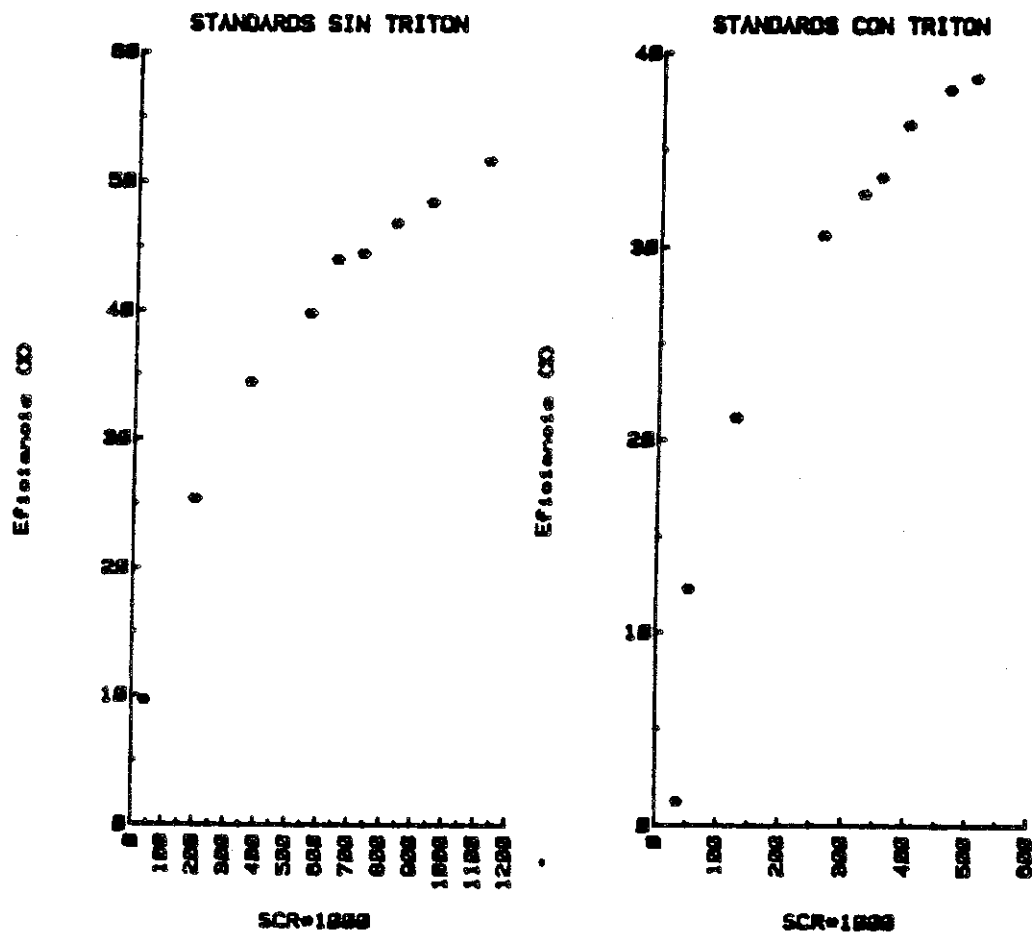


Figura 1. Curva de extinción en ambas series de standards. SCR es la relación de canales

radioactividad media de los totales (DPM); 1.000 y 2.220.000 son factores de conversión (pmols/mmol y DPM/ $\mu$ Ci), respectivamente).

La eficiencia y relación de canales en ambas series de standards de quenching está expresada en la página 51 y Figura 1.

#### 4.3.4. Reducción de datos

Para la reducción de datos se redactó un programa en BASIC que sirve también para la determinación de hormonas por RIA. Dicho programa (DOSTIF) se basa en un modelo de 3 parámetros a la hora de ajustar la curva logística:  $U = 1/(1 + D^{-c}/b)$ , siendo  $U = (B-N)/T$  (en el caso de determinaciones del título de anticuerpos) o  $U = (B-N)/(B_0-N)$  (en el caso de determinaciones hormonales);  $B$  = CPM ligadas al anticuerpo;  $N$  = ligación no específica (CPM);  $T$  = CPM totales añadidas por tubo;  $B_0$  = CPM ligadas al anticuerpo en ausencia de hormona no marcada;  $D$  = concentración o cantidad de hormona por tubo (en el caso de determinaciones hormonales) o el inverso de la dilución (para el título de anticuerpos). La linealización se realiza mediante la transformación logit-log:

$$\text{Logit } U = \text{Log} [U/(1 - U)] = \text{Log } b + c \text{ Log } D$$

siendo Log el logaritmo decimal o neperiano. En el modelo de los 2 parámetros,  $b$  y  $c$ , éstos se determinan mediante una regresión simple o ponderada por la varianza del logit. En el modelo de los 3 parámetros,  $N$  se optimiza en función del coeficiente de correlación. Esto es necesario porque la ligación no específica, que se determina mediante tubos sin anticuerpo o con un exceso de hormona fría, es distinta para cada tubo, pues depende de la cantidad de hormona marcada libre  $F = T - B$ . Así se consigue un valor optimizado entre cero y  $N$  que proporciona el coeficiente de correlación más alto y, por tanto, un mejor ajuste.

El inconveniente de la transformación logit-log es la heteroscedasticidad: la varianza del logit depende de la respuesta  $U$ , que a su vez depende de  $D$ , con lo que se viola uno de los principios en que se basa el análisis de regresión. Para solventar el problema de falta de uniformidad de la varianza se suele realizar una ponderación por la varianza, de manera que a cada  $D_i$  se asigna un "peso"  $W_i$ , que es inversamente proporcional a la varianza del logit para ese  $D_i$ :  $W_i = 1/\text{Var}(\text{Logit } U_i)$ , siendo  $\text{Var}(\text{Logit } U_i) = \text{Var}(U_i)/[U_i(1-U_i)^2]$ ,  $U_i$  la respuesta media de las repeticiones de  $D_i$ .

La estimación de la varianza de  $U_i$  a partir de las 2 o lo más 3 repeticiones que se hacen de cada  $D_i$  es bastante deficiente. Estudios más completos en este sentido indican que la varianza de  $U_i$  se ajusta bien a la ecuación:

$$\text{Var}(U_i) = S^2 U_i$$

siendo  $S^2$  la varianza de  $U_i = 1$  y  $h$  un número real que normalmente se situa entre 1 y 2. Los valores de estos parámetros dependen de cada tipo de análisis, y se recomienda utilizar valores medios obtenidos a partir de muchos ensayos. A falta de dichos valores, puede realizarse una estimación en cada ensayo por análisis de regresión de log ( $\text{Var } U_i$ ) frente a log  $U_i$ .

Una vez conocidos todos estos parámetros,  $D_i$  se obtiene a través de la determinación de la potencia correspondiente a la respuesta medida, en relación al  $D_i$  más cercano a la mediana de los  $D_i$ . Los niveles de confianza al 95% se obtienen a partir de los de la potencia.

El programa DOSTIF, que se presenta en el Anejo 8, realiza, pues, las siguientes operaciones:

1. Cálculo de las respuestas de cada tubo y de la respuesta media,  $U_i$ , para cada  $D_i$ , así como de su varianza,  $\text{Var}(U_i)$  suponiendo  $N = 0$ .
2. Cálculo de los parámetros  $S^2$  y  $h$ .
3. Estimación de la varianza del logit para cada  $D_i$ .
4. Asignación de los pesos  $W_i$  a cada  $D_i$ .
5. Regresión ponderada y determinación del coeficiente de correlación.
6. Realización de los pasos 1 a 5 suponiendo  $N = 1, 2, \text{etc.}$  CPM hasta llegar a la ligación no específica determinada en el análisis.
7. Guardar todos los parámetros referentes al  $N$  que ha conducido al máximo coeficiente de correlación.
8. Determinación de la potencia y de su intervalo de confianza al 95% mediante el teorema de Fieller.

En la salida del ordenador figuran impresos, por este orden: coeficiente de correlación ( $r$ ), CPM medias totales ( $T$ ),  $S$  (SIGMA),  $h$ , coeficiente de correlación de la recta de regresión del logaritmo de la varianza  $U_i$  frente al logaritmo de  $U_i$  ( $r$ ), ligación no específica optimizada (NSB optimizada), ligación no específica media medida en el ensayo en cpm (NSB), pendiente y ordenada en el origen de la recta logit-log, desviación standard residual, error standard de la pendiente y ordenada, así como la referencia de la muestra, el porcentaje de ligación y el valor buscado con los límites de confianza inferior y superior. En el caso de que se tratase de una determinación hormonal, aparecen también la sensibilidad, el "midrange", la ligación del blanco ( $B_0$ ) en CPM y el tanto por uno de ligación del blanco. En la página 55 y Figura 2 se muestra una típica salida de ordenador del programa DOSTIF.

TITULO DE ANTICUERPOS ANTI-T, MORUECOS Y OVEJAS HIPERINMUNES. 10/9/87.

TOTALES:

1	4744
2	4896
3	4671
4	4629
5	4436

LIGACIONES NO ESPECIFICAS:

1	B1
2	94
3	90
4	83
5	90
6	84

	DILUCION	LDIL.	B(CPM)	LOGIT
1 1	10	2.30258509	4155.000	1.98198760
1 2	10	2.30258509	4598.000	3.60951292
2 1	100	4.60517019	3795.000	1.39815422
2 2	100	4.60517019	3887.000	1.52701485
3 1	1000	6.90775528	2566.000	.15637537
3 2	1000	6.90775528	2300.000	-.07155687
4 1	10000	9.21034037	618.000	-1.97038344
4 2	10000	9.21034037	581.000	-2.04623263
5 1	100000	11.51292547	155.000	-3.73508875
5 2	100000	11.51292547	137.000	-3.91951138
6 1	1000000	13.81551056	66.000	-5.45000788
6 2	1000000	13.81551056	82.000	-4.85877828

CARACTERISTICAS DEL ANALISIS:

$r = -.992040878977$      $T = 4675.2$      $SIGMA = 3.49595117178E-2$   
 $h = 1.19222985116$      $r = .894373459949$   
 NSB optimizada = 46    NSB = 87  
 PENDIENTE (c) = -.771487062359  
 ORDENADA (Lb) = 5.19865888578  
 DESVIACION STANDARD RESIDUAL = .231312119669  
 ERROR STANDARD DE Lb = .152268278287  
 ERROR STANDARD DE c = .016980429753  
 695-7/7                      50                      887                      844                      825

Típica salida de ordenador del programa DOSTIF aplicado a la determinación del título de anticuerpos

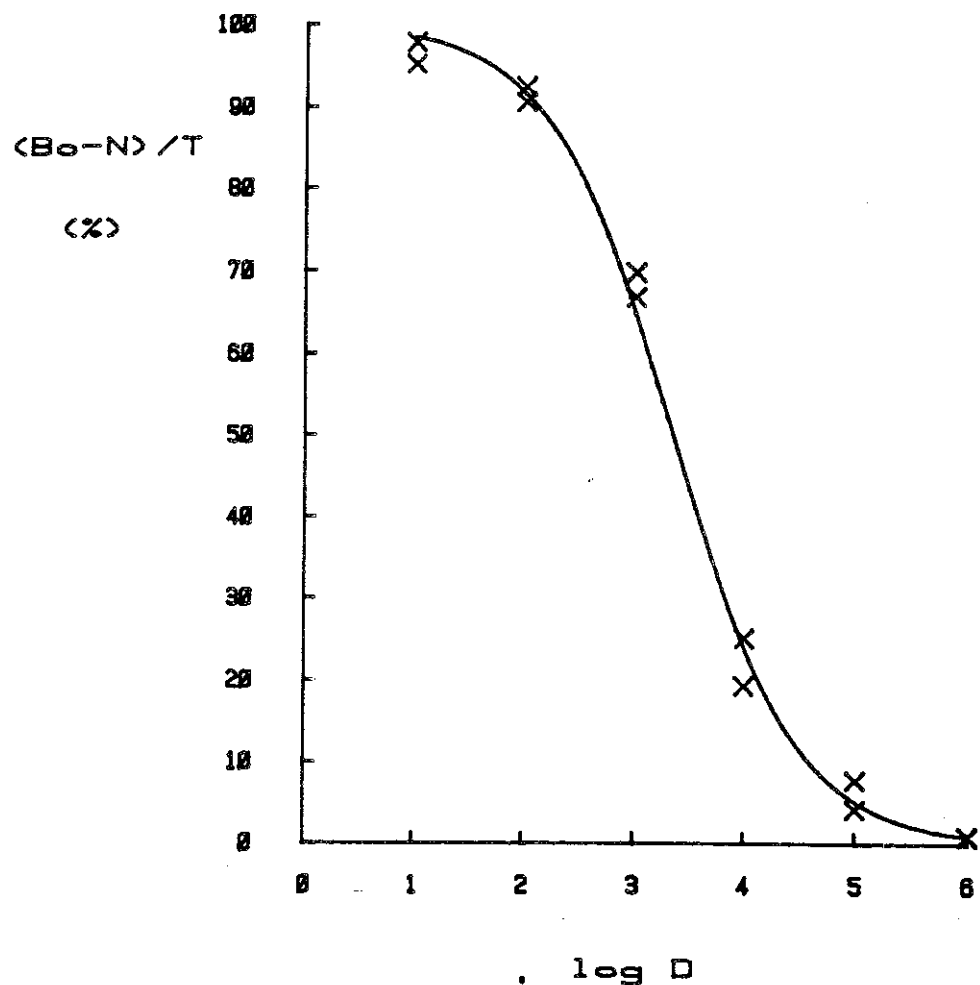


Figura 2. Evolución del porcentaje de ligación del esteroide marcado con el logaritmo decimal de la dilución.

Una explicación más detallada de estos conceptos y operaciones puede encontrarse en diversos trabajos publicados (FINNEY, 1964; RODBARD, 1971; FELDMAN y RODBARD, 1971; UKRAINCİK y PIKNOSH, 1981; RODBARD, 1974; LEJEUNE, 1979; HUET, 1984).

Los datos de título de anticuerpos fueron a menudo transformados en masa ligada por ml de antisuero puro. Teniendo en cuenta que el número de  $\mu\text{l}$  de antisuero puro en cada tubo es  $100/D_i$ , siendo  $D_i = 10, 100, 1.000$ , etc. para las diluciones  $1/10, 1/100$ , etc., la fórmula que relaciona ambos parámetros es:  $M_L = 5 \times M_T \times D_i/P$ , siendo  $M_L$  la masa ligada ( $\mu\text{mols/ml}$ );  $M_T$  la cantidad total de esteroide marcado añadido por tubo ( $\mu\text{g/tubo}$ );  $D_i$  el inverso del título de anticuerpos y  $P$  el peso molecular del esteroide marcado ( $\text{g/mol}$ ).

Estos datos, o los del título de anticuerpos, fueron transformados en logaritmos para casi todos los cálculos.

#### 4.3.5. Control de calidad

La realización del control de calidad se efectuó mediante la inclusión de varias referencias en cada análisis. Dos muestras de unos  $150 \mu\text{l}$  procedentes de dos ovejas inmunizadas contra AD y T respectivamente, fueron repartidas en alíquotas de  $1 \text{ ml}$  y congeladas a  $-20^\circ\text{C}$ . Los títulos de anticuerpos de estas referencias son del mismo orden que las que normalmente se analizan. En cada análisis se descongeló una alíquota que se introdujo cada  $96$  tubos, de manera que en cada centrifugación hubo una referencia.

Con objeto de poder comparar con mayor fiabilidad, todas las muestras de una misma experiencia fueron determinadas en un mismo análisis y sus posiciones dentro del mismo fueron aleatorizadas.

Para ver si existe algún efecto de la posición de las muestras dentro del análisis se consideraron 5 análisis de título de anticuerpos anti-testosterona en los que la referencia estaba incluida 4 veces, es decir, una en cada una de las 4 centrifugaciones realizadas a lo largo del análisis. Se realizó un ANOVA de 2 factores sin repetición (SOKAL y ROHLF, 1979) en el que la variación total del valor estimado para la referencia se descompuso en variación "entre días" (entre análisis) y "entre posiciones dentro del análisis". Los resultados de la referencia se transformaron en logaritmos decimales de la masa de esteroide ligado por ml de antisuero. Los resultados (Cuadro 3) muestran que existe una variación significativa entre análisis (entre sucesivos días) pero no entre las posiciones dentro de un mismo análisis, aunque está cerca del límite de significación.

Los coeficientes de variación intra e inter-análisis se calcularon según el procedimiento revisado por RODBARD (1974). Los valores de las referencias se

transformaron en logaritmos de la masa de esteroide ligado por ml de antisuero puro.

**CUADRO 3**  
ANOVA de dos factores sin repetición, mostrando la variación entre análisis (días) y entre posiciones

Fuentes de variación	G.L.	Media de cuadros	F	Significación
Entre días	4	0,101217	23,5	$p < 0,01$
Entre posiciones	3	0,020365	4,7	N.S.
Error	12	0,004302	—	---

Para determinar dichos coeficientes de variación se tomaron los resultados de las referencias de 7 análisis en los que se hicieron entre 2 y 6 repeticiones de la referencia en el caso de la testosterona y 4 análisis con 2-5 repeticiones en el caso de la androstenodiona. Los coeficientes de variación intra e inter-análisis de estos dos tipos de determinaciones fueron 5,7% (n = 20) y 9,7% (n = 6), 5,9% (n = 11) y 8,8% (n = 3) respectivamente. Los números entre paréntesis indican los grados de libertad de la media de cuadrados correspondiente. Las medias globales fueron 2,14 para la referencia anti-T y 2,38 para la referencia anti-AD.

#### 4.4. Determinaciones de progesterona

##### 4.4.1. Técnica utilizada

Todos los análisis de progesterona fueron realizados personalmente en el laboratorio de RIA del Departamento de Reproducción Animal del INIA de Madrid, según el método de LOPEZ SEBASTIAN *et al.*, (1980). Se trata de un RIA con extracción previa y la separación de las fracciones libre y ligada se lleva a cabo por adsorción con carbón-dextrano.

Se tomaron 200 µl de plasma y se agitaron con 3 ml de hexano (Merck) durante 1 minuto en tubos de vidrio (15x100 mm), mediante un agitador de tipo vortex (Heidolph-DSG 302). Tras la congelación de la fase acuosa en nitrógeno líquido, los extractos orgánicos fueron decantados en otros tubos de vidrio (12x75 mm), evaporados a 37°C por arrastre con aire y los extractos secos fueron reconstituidos en 200 µl de tampón fosfato-gelatina (0,1 M, pH = 7). Los 7 standards de progesterona (25-1600 pg/tubo) se prepararon en metanol (Merck) y se añadieron 200 µl de cada uno, en tubos de vidrio, donde fueron evaporados y reconstituidos de igual manera que las muestras. Se añadieron 100 µl de una

disolución de anticuerpo antiprogesteroa, generado en oveja, a todos los tubos, excepto a los no específicos. En las condiciones descritas, dicha dilución es capaz de ligar el 30-50% del total de progesterona marcada añadida, en ausencia de hormona no marcada. A continuación, se añadieron 100 µl de disolución de 1, 2, 6, 7, 16, 17-<sup>3</sup>H- Progesterona (Amersham, 100-130 Ci/mmol), aproximadamente 10.000 CPM/tubo. Los tubos se agitaron e incubaron durante toda la noche a 4°C (unas 16 horas). En cada análisis se incluyeron 3 totales, 3 no específicos, 3 tubos de máxima ligación (Bo) y los 7 standards por triplicado. Todas las muestras se analizaron por duplicado y se incluyeron 2-6 tubos de cada una de las 2 referencias de nivel alto de progesterona (oveja preñada) y bajo (oveja ovariectomizada) a lo largo del análisis.

Al día siguiente, se añadió a todos los tubos, a excepción de los totales, 500 µl de una suspensión de carbón activo (1,25 mg/ml) y dextrano T-70 (0,05 mg/ml). Pasados 15 minutos, fueron centrifugados a 4°C durante 15 minutos (2.000 g). Los sobrenadantes se decantaron en viales y se añadieron 6 ml de líquido de centelleo (PPO y POPOP, 4 gr y 100 mg/l de tolueno). Los viales se agitaron y fueron contados durante 1 minuto, al cabo de hora y media.

En la página 59 y Figura 3, se indica una típica salida de ordenador del programa DOSTIF aplicado a la determinación de progesterona así como las gráficas correspondientes.

##### 4.4.2. Control de calidad

En un total de 9 análisis realizados, el porcentaje de ligación del blanco (Bo) respecto del total osciló entre el 38,9-54,6% ( $47,1\% \pm 1,66\%$ ) y la ligación no específica representó un  $1,9\% \pm 0,03\%$ .

La ordenada en el origen fue  $5,86 \pm 0,133$  correspondiente a un porcentaje de ligación específica respecto al blanco del 99,7%. La pendiente fue de  $-1,33 \pm 0,022$ . La sensibilidad fue calculada mediante el programa DOSTIF según un procedimiento habitual (FELDMAN y RODBARD, 1971) y fue de  $0,09 \pm 0,014$  ng/ml en las condiciones de trabajo. El "midrange" se situó en  $0,92 \pm 0,025$  ng/ml.

La reproducibilidad se estimó por los coeficientes de variación intra e inter-análisis (RODBARD, 1974). En un total de 5 análisis, se incluyeron aleatoriamente entre las muestras 2-6 repeticiones de cada una de las 2 referencias. En el nivel alto (1,84 ng/ml) los coeficientes de variación intra e inter-análisis fueron 10,4% (n = 13) y 17,6% (n = 4), respectivamente. En el nivel bajo (0,19 ng/ml) fueron 36,1% (n = 15) y 58,1% (n = 4). La magnitud de los coeficientes de variación en el nivel bajo se debe a que la referencia correspondiente tiene una concentración próxima al límite de detección (RODBARD, 1974; HALFMAN, 1981).

RIA DE PROGESTERONA. 18/12/87

TOTALES:

1	9925
2	10133
3	10243

RESPUESTAS EN AUSENCIA DE HORMONA:

1	5579
2	5458
3	5504

LIGACIONES NO ESPECIFICAS:

1	189
2	297
3	203

PATRONES:

	CONC.	LCOMC.	B(CPM)	LOGIT
1 1	25	3.21888000	4787.000	1.83617000
1 2	25	3.21888000	5089.000	2.43749000
1 3	25	3.21888000	5053.000	2.34868000
2 1	50	3.91202000	4515.000	1.45669000
2 2	50	3.91202000	4456.000	1.38543000
2 3	50	3.91202000	4428.000	1.35265000
3 1	100	4.60517000	3560.000	0.53356500
3 2	100	4.60517000	3665.000	0.61984400
3 3	100	4.60517000	3845.000	0.77334400
4 1	200	5.29832000	2585.000	-0.21758200
4 2	200	5.29832000	2596.000	-0.21375300
4 3	200	5.29832000	2460.000	-0.31389300
5 1	400	5.99146000	1637.000	-1.01281000
5 2	400	5.99146000	1566.000	-0.99065200
5 3	400	5.99146000	1583.000	-1.06579000
6 1	800	6.68461000	967.000	-1.81821000
6 2	800	6.68461000	994.000	-1.77632000
6 3	800	6.68461000	1010.000	-1.75207000
7 1	1600	7.37776000	659.000	-2.42591000
7 2	1600	7.37776000	679.000	-2.37432000
7 3	1600	7.37776000	608.000	-2.56061000

CARACTERISTICAS DEL ANALISIS:

r = -997347    T = 10100.3    SIGMA = .0209451  
 RANGEO = 166.207  
 SENSIBILIDAD = 7.14807  
 h = 1.19904    s = .736341  
 Bp = 5313.67    Bp/T = .54589  
 MSB optimizada = 229    MSB = 229.667  
 PENDIENTE (c) = -1.11908  
 ORDENADA (Lb) = 5.72213  
 DESVIACION STANDARD RESIDUAL = .0186966  
 ERROR STANDARD DE Lb = .0161181  
 ERROR STANDARD DE c = 2.94305E-03

P	1.73	1.72	1.71	1852.000
D	0.22	0.22	0.22	4539.000
0	0.22	0.22	0.22	4526.000
P	2.14	2.13	2.12	1596.000
P	2.20	2.19	2.18	1566.000
V	0.88	0.87	0.87	2802.000
V	0.89	0.88	0.88	2775.000
2 A1	2.62	2.60	2.59	1382.000
2 A1	2.14	2.12	2.12	1599.000
18 P1	1.43	1.42	1.41	2195.000
18 P1	1.47	1.46	1.46	2061.000
22 C1	0.21	0.21	0.21	4577.000
22 C1	0.21	0.20	0.20	4605.000
57 A2	1.32	1.38	1.38	2141.000
57 A2	1.45	1.44	1.44	2083.000
148 C2	1.62	1.61	1.61	1934.000
148 C2	1.59	1.57	1.57	1965.000
135 C2	1.00	0.99	0.98	2616.000
135 C2	0.87	0.87	0.86	2816.000
P	2.44	2.42	2.42	1454.000
P	1.98	1.96	1.96	1689.000
0	0.27	0.27	0.27	4354.000
0	0.29	0.29	0.29	4271.000

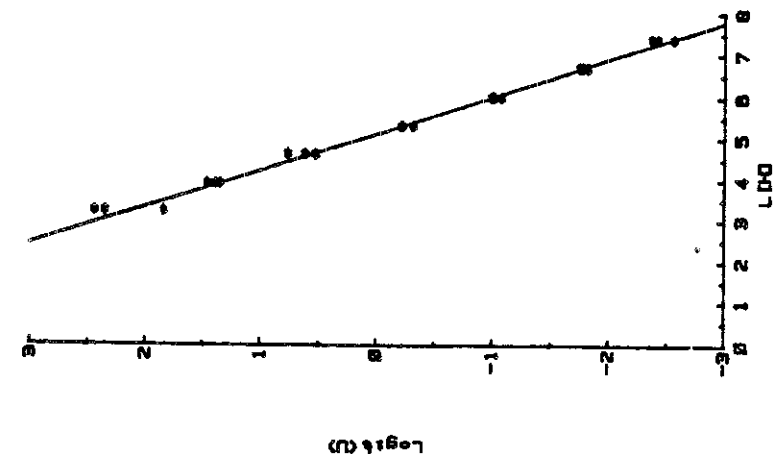
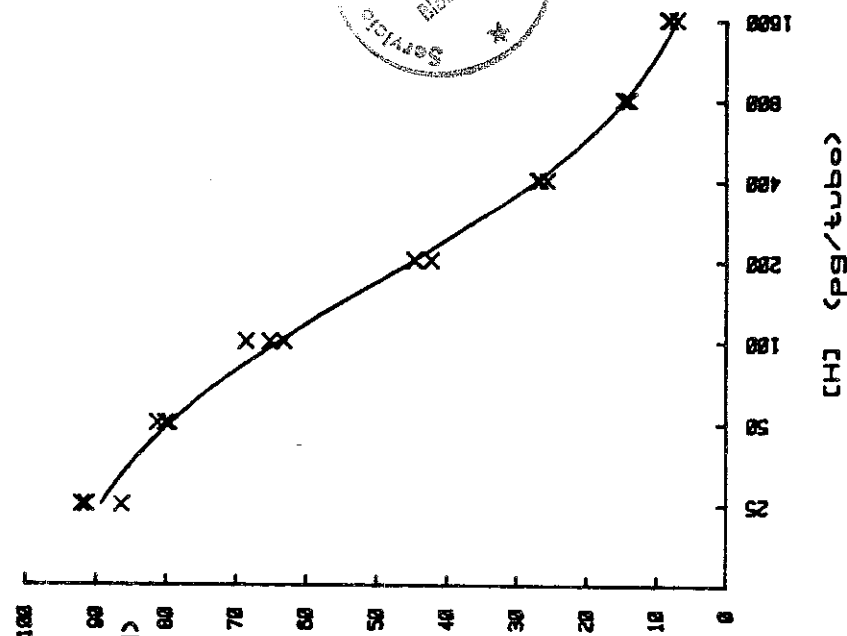


Figura 3. Evolución del porcentaje de ligación de progesterona marcada en función de la cantidad de progesterona fría añadida (pg/tubo, escala logarítmica) (Gráfica derecha) y linealización mediante la transformación logit-log (Gráfica izquierda)

Típica salida de ordenador del programa DOSTIF aplicado a la determinación de progesterona

Dentro de cada experiencia, las muestras que se debían comparar posteriormente se realizaron en un mismo análisis y los lotes de tratamientos fueron aleatorizados. Aquellas muestras cuyos duplicados diferían notablemente fueron reanalizadas.

#### 4.5. Determinaciones de LH

##### 4.5.1. Técnica utilizada

Los análisis de LH se realizaron en el laboratorio de RIA de la Station de Physiologie de la Reproduction del Centre de Recherches de Tours (Francia). Se trata de un método de competición (BLANC y POIRIER, com. pers.) y la separación de las fracciones libre y ligada se realiza por centrifugación, tras la adición de un segundo anticuerpo y polietilenglicol.

##### 4.5.2. Control de calidad

Todas las muestras fueron aleatorizadas y analizadas por duplicado en un mismo ensayo. Se incluyeron regularmente a lo largo del análisis dos referencias, de nivel alto y bajo. Los coeficientes de variación fueron 8,4% (n = 11) para la referencia de 2,2 ng/ml y 7,1% (n = 11) para la de 12,5 ng/ml.

#### 4.6. Determinación del peso y condición corporal

El peso y la condición corporal se tomaron por la mañana, estando las ovejas en ayunas. El peso se determinó con una precisión de 0,5 kg.

La condición corporal se midió siguiendo el baremo descrito por RUSSEL *et al.*, (1969).

#### 4.7. Determinación de la tasa de ovulación

La tasa de ovulación se determinó por endoscopia (endoscopio de 7 mm de diámetro marca STORZ) en las ovejas previamente tranquilizadas con 0,3 cc de ROMPUN. La determinación de la edad y tipo de cuerpos lúteos y folículos se realizó mediante la técnica de OLDHAM y LINDSAY (1980). En la realización de endoscopias colaboraron J.L. Alabart, I. Blasco y J. Folch.

#### 4.8. Recuperación de embriones

En la experiencia 3, se utilizó la técnica de HUNTER (HAFEZ, 1980) modificada (COGNIE, no pub.). La técnica consiste en:

- 1) Extraer los cuernos uterinos y oviductos por laparotomía ventral. Se realizó una incisión de unos 8 cm cerca de la línea alba en el animal previamente anestesiado mediante PENTOTAL.
- 2) Lavado de ambos cuernos mediante unos 30 cc de PBS-BSA que eran aplicados, mediante una aguja atraumática, en el cuerpo del útero y recuperados cerca de la unión útero-tubárica mediante una aguja apropiada.

Inmediatamente después de ser recuperado, el líquido de lavado era observado a la lupa binocular para la localización de los embriones.

En la experiencia 4, la recuperación se realizó lavando el oviducto desde la unión útero-tubárica y recuperando el líquido de lavado y los embriones por el Ostium del oviducto.

En la obtención de embriones colaboraron: J.L. Alabart, I. Blasco, M.J. Cocero, Y. Cognié y J. Folch.

#### 4.9. Evaluación de la viabilidad embrionaria

La viabilidad de los embriones recuperados se determinó atendiendo a criterios morfológicos (WINTERBERGER-TORRES y SEVELLEC, 1987). Este trabajo fue realizado por M.J. Cocero.

#### 4.10. Transferencia de embriones

Dos embriones de viabilidad morfológica comprobada eran introducidos mediante una pipeta capilar a través del Ostium ipsilateral del ovario que ha ovulado y depositados en el oviducto.

#### 4.11. Métodos Estadísticos

Los parámetros reproductivos como tasa de ovulación, prolificidad, fertilidad, fecundidad, etc. fueron analizados mediante test de Chi-cuadrado. En las tablas de 2 x 2 se aplicó la corrección de continuidad de Fisher-Yates cuando alguna de las frecuencias esperadas era menor de 10. Cuando alguna de éstas era menor de 5, se empleó el test exacto de Fisher.

El análisis de correlación-regresión se aplicó, en general, para relacionar variables continuas. Los títulos de anticuerpos se transformaron en logaritmos decimales antes de realizar correlaciones. Los coeficientes de regresión se compararon mediante la t de Student.

VARIABLES REPRODUCTIVAS

Variables como el peso, edad y condición corporal fueron comparadas entre lotes mediante el análisis de la varianza (ANOVA) o la t de Student, con la corrección de Behrens-Fisher cuando las varianzas diferían significativamente.

El análisis de la varianza-covarianza de clasificación múltiple se utilizó para estudiar la influencia neta de determinadas variables (nivel de inmunización, peso, edad, etc.) sobre los parámetros reproductivos. Los métodos estadísticos citados están detallados en obras convencionales (SNEDECOR y COCHRAN, 1967; DAGNELIE, 1970; SOKAL y ROHLF, 1979; CAULCUTT, 1983; CUADRAS *et al.*, 1984). Salvo que se especifique lo contrario, los resultados se expresan en este trabajo como la media aritmética  $\pm$  la desviación standard de la media (error standard). Las diferencias se consideraron significativas cuando el riesgo fue menor del 5%. Los tests de significación del coeficiente de correlación fueron de 2 direcciones.

Los métodos estadísticos relativos a los análisis hormonales y título de anticuerpos vienen especificados en las secciones correspondientes.

Para la mayor parte de los métodos paramétricos se utilizó el paquete estadístico SPSS en un ordenador PDP 11/23 PLUS. Los tests no paramétricos se ejecutaron en una calculadora programable (CASIO-fx-4000 P). Las transformaciones CPM-DPM se realizaron en un ordenador personal (Hewlett-Packard HP-80).

## 5. EXPERIENCIAS REALIZADAS

## 5. EXPERIENCIAS REALIZADAS

### 5.1. Experiencia 1: Resultados reproductivos de corderas inmunizadas contra AD y evolución temporal del nivel de inmunización en corderas inmunizadas pasivamente contra T o activamente contra AD

#### 5.1.1. Introducción

Los resultados comentados anteriormente indicaban una disminución de la fertilidad en corderas inmunizadas activamente contra AD respecto de los controles, que podría estar asociada al bajo peso de los animales tratados (FOLCH, 1986). Sin embargo, es también necesario conocer si el perfil del nivel de inmunización es similar al observado en otras razas (COX, 1984; SCARAMUZZI et al., 1987) o si, por el contrario, existe alguna irregularidad que pudiera explicar los resultados observados. Dado que la inmunización pasiva contra T se utilizaría en otras experiencias, es también importante determinar la evolución del nivel de inmunización contra dicha hormona en animales de condiciones similares.

La presente experiencia pretende comprobar si se repiten los parámetros reproductivos observados anteriormente, así como conocer la evolución del título de anticuerpos en ambos tipos de inmunización.

#### 5.1.2. Material y Métodos

##### Animales

Se utilizaron 40 corderas, de 10 a 12 meses, de similar peso y condición corporal. Un lote de 25 de dichas corderas elegido al azar, fue inmunizado con 2 dosis subcutáneas de 2 ml de inmunógeno anti-AD (FECUNDIN, Cooper-Zeltia) en el cuello a 4 semanas de intervalo, permaneciendo el resto de las corderas como lote control. La cubrición se realizó en otoño tras la introducción de 5 machos enteros con marcador, 4 semanas después de la última dosis. El celo fue sincronizado en ambos lotes mediante esponjas vaginales impregnadas de 40 mg de FGA (CHRONOGEST, Intervet) mantenidas durante 10 días y la cubrición se llevó a cabo en el celo siguiente al apareamiento tras la retirada de la esponja, con el fin de evitar posibles interferencias con el tratamiento. Se practicaron endoscopias a todas las ovejas 9-11 días después de la introducción de los machos.

En una muestra de 10 animales inmunizados elegidos al azar, se tomaron muestras de plasma sanguíneo (5 ml) con el objeto de seguir la evolución del título de anticuerpos. Las tomas se realizaron inmediatamente antes de la primera y segunda dosis de Fecundin y semanalmente hasta la introducción de los machos, así como al parto.

Otro lote de 8 corderas de similar peso y condición corporal que no se incluyó en la cubrición, fue inmunizado pasivamente contra T mediante inyección intravenosa (yugular) de 20 ml de antisuero de título 1/13.495 (Cuadro 4). Se extrajo sangre antes de la inyección y a los 15 minutos, 9 días y 20 días después de la misma. Las muestras fueron centrifugadas a 4°C inmediatamente y el plasma recuperado se congeló a -20°C hasta el día del análisis.

**CUADRO 4**  
Características del antisuero inyectado

T-1 (T)	13.495
T-1 (AD)	50
pmols ligados/ml (Testosterona)	5.329
pmols ligados/ml (Androstenediona)	21,3
pmols ligados/ml (Progesterona)	0,41

#### Análisis

La determinación del título de anticuerpos anti-AD y anti-T se realizó por RIA (SCARAMUZZI *et al.*, 1975) utilizando  $27,1 \pm 0,47$  y  $23,6 \pm 0,28$  pg de hormona marcada por tubo, respectivamente. El antisuero inyectado fue titulado también respecto a AD y P para conocer su especificidad en ausencia de otros esteroides. La capacidad de ligación plasmática de los diferentes esteroides se ha expresado en picomoles ligados por cada mililitro de antisuero puro y se calculó a partir del título de anticuerpos (Cuadros 4 y 5).

**CUADRO 5**  
Estimación del título de anticuerpos circulante a partir del peso ( $X \pm ES$ )

Peso (kg)	$32,4 \pm 0,88$
N	10
Volumen sanguíneo estimado (litros)	$2,3 \pm 0,06$
Ligación estimada (pmols/ml)	$48,4 \pm 1,32$
Ligación medida (pmols/ml)	$76,4 \pm 5,32$
T-1 estimado (Testosterona)	$123 \pm 3$
T-1 medido (Testosterona)	$189 \pm 13$

#### Análisis estadístico

Las comparaciones de los datos reproductivos se realizaron mediante el test de Chi-cuadrado con corrección de Yates. El cálculo de la ligación estimada a partir del peso se hizo suponiendo que el antisuero inyectado se diluye en un volumen sanguíneo que es el 6,75% del peso vivo del animal (GURLER *et al.*, 1976).

#### 5.1.3. Resultados

##### Evolución del nivel de inmunización activa contra AD

La ligación plasmática de AD es muy baja en los animales no inmunizados (tan sólo unas decenas de femtomoles por mililitro) y se incrementa significativamente a las 4 semanas de la primera inmunización. Tras la dosis de recuerdo, los niveles de anticuerpos se incrementan hasta alcanzar un máximo alrededor de la primera semana, descendiendo progresivamente durante las semanas siguientes. La capacidad de ligación plasmática a la cubrición representa aproximadamente un 42% de los valores máximos y existe una buena correlación entre los niveles de inmunización en el día de introducción de los machos y los de la primera semana después del recuerdo ( $r = 0,9875$ ;  $p < 0,001$ ).

Al parto, los niveles de inmunización son todavía detectables y similares a los encontrados antes de la segunda dosis (Cuadro 6 y Figura 4).

**CUADRO 6**  
Evolución de la ligación plasmática de AD en la inmunización activa contra AD

Días	M <sub>L</sub> (pmols/ml)	C.V. (% 9 (N = 10))
- 56 (1ª dosis)	$(29,3) \pm 4,0 \cdot 10^{-3}$	13,7
- 28 (2ª dosis)	$2,5 \pm 0,51$	20,4
-21	$48,6 \pm 19,0$	39,1
-14	$41,6 \pm 14,3$	34,4
-7	$27,3 \pm 6,47$	23,7
0 (cubrición)	$20,3 \pm 6,94$	34,2
149 (parto)	$3,0 \pm 6,94$	19,0

##### Evolución del nivel de inmunización pasiva contra T

El decrecimiento del título de anticuerpos siguió la ley exponencial ( $r = 0,9595$ ;  $p < 0,001$ ) (Cuadro 7 y Figura 5). El tiempo necesario para que se reduzca a la mitad de los valores iniciales fue estimado en  $5,1 \pm 0,34$  días ( $x \pm E.S.$ ).

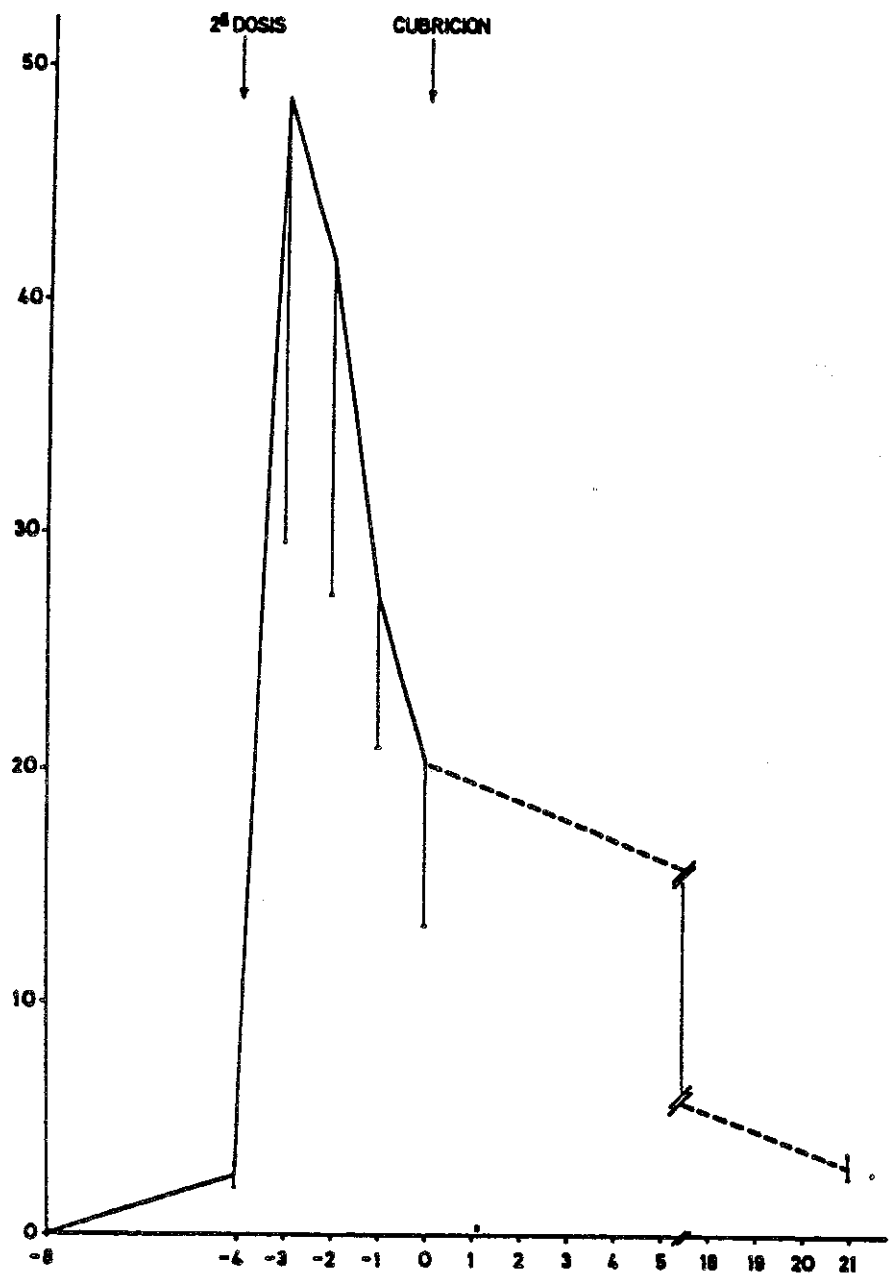


Figura 4. Evolución de la ligación plasmática de AD (pmols/ml) en corderas inmunizadas activamente contra AD en función del tiempo (semanas)

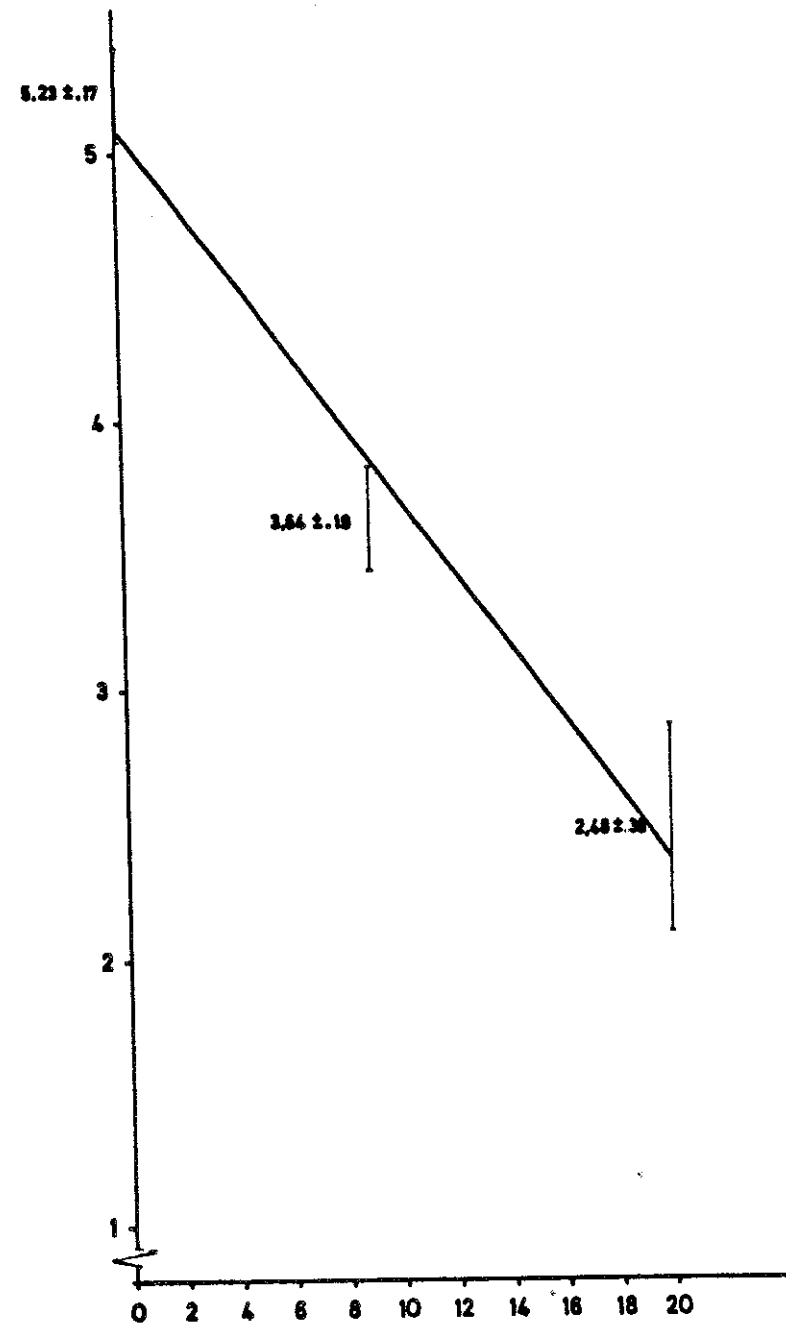


Figura 5. Evolución del logaritmo neperiano del inverso del título de anticuerpos en función del tiempo (días)

La ligación de AD y P del anticuerpo anti-T fueron del 0,37% y 0,08‰ respectivamente, respecto de la ligación de T, lo que da cuenta de su elevada especificidad (Cuadro 7).

**CUADRO 7**

Evolución de la ligación plasmática de T en la inmunización pasiva contra T ( $X \pm ES$ ) y coeficiente de variación (C.V.)

Días	$M_L$ (pmols/ml)	C.V. (%9 (N = 10))
0 (antes)*	$(189,5) \pm 5,1 \cdot 10^{-3}$	2,7
0 (después)*	$76,4 \pm 5,32$	7,0
9	$15,8 \pm 1,31$	8,3
20	$5,2 \pm 0,63$	12,1

\* Antes y después de aplicar el suero antitestosterona

Resultados reproductivos

Todas las corderas presentaron celo y ovulación, excepto una en el lote inmunizado (no incluida en los datos). La distribución de celos fue similar en ambos grupos, con un intervalo recuerdo-cubrición de 28 a 39 días (Cuadro 8 y Figura 6).

**CUADRO 8**

Parámetros referidos al primer ciclo de cubrición de corderas de raza Rasa Aragonesa

Lote	Inmunizadas	Control
N	25	15
Peso (kg)	$32,4 \pm 1,03$	$32,4 \pm 1,26$
Condición corporal	3,5	3,4
Intervalo recuerdo-cubrición	$31,2 \pm 0,6$	$30,9 \pm 0,6$
Ligación de AD en plasma (pmols/ml)	$20,3 \pm 6,94$	---
Fertilidad (%)	59,1	53,3
Tasa de ovulación	$1,52 \pm 0,14$	$1,10 \pm 0,13$
Prolificidad	$1,15 \pm 0,10$	$1,13 \pm 0,13$
Fecundidad	0,68	0,60
FPOM (N)	42,9 (14)	0,0 (2)

FPOM: fallo parcial de la ovulaciones múltiples

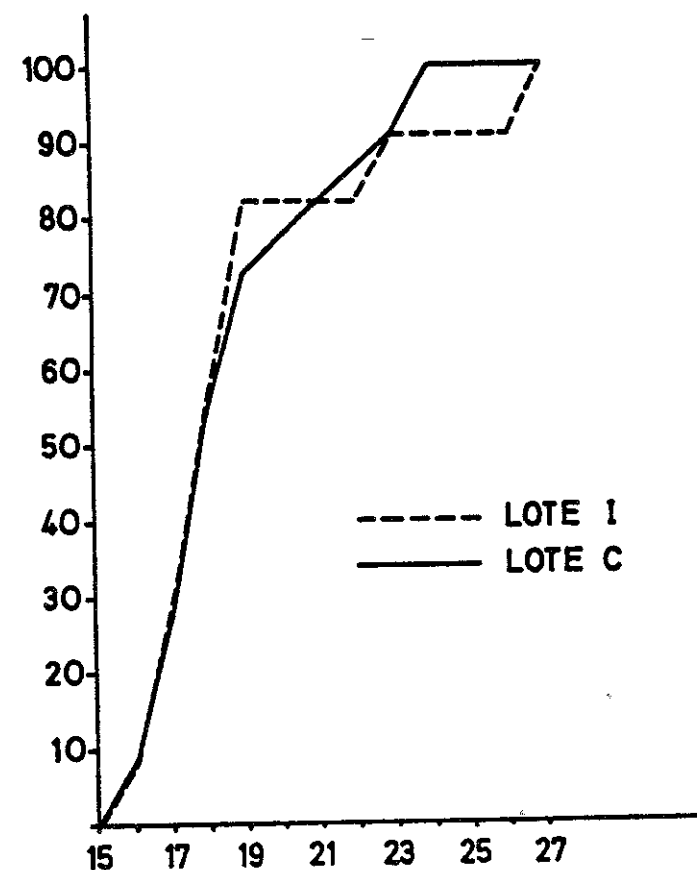


Figura 6. Frecuencias relativas acumuladas (%) de ovejatas cubiertas en diferentes días del segundo ciclo tras la retirada de las esponjas. I: lote inmunizado; C: lote control

La tasa de ovulación aumentó (+ 38%) a consecuencia del tratamiento, pero no se alcanzó significación estadística debido al bajo número de animales disponibles ( $p < 0,09$ ). El FPOM se vio incrementado considerablemente (+ 42,9%), pero no se pudo afirmar significativamente debido a la baja proporción de ovulaciones dobles en el lote control (Cuadro 7). La tasa de ovulación de las ovejas que no parieron (1,44) no fue mayor que las que sí lo hicieron (1,62).

La prolificidad apenas aumentó en el lote inmunizado (+ 1,8%, N.S.). La fertilidad fue algo mayor en el grupo tratado (+ 10,9%, N.S.) y la fecundidad aumentó ligeramente (+ 13,3g, N.S.).

#### 5.1.4. Discusión

La evolución del título de anticuerpos tras la inmunización activa contra AD coincide con la publicada en otras razas. Sin embargo, los valores encontrados por nosotros son sensiblemente inferiores a los aparecidos normalmente en la literatura consultada. Dado que los incrementos en tasa de ovulación son similares a los observados por otros autores, estas diferencias podrían ser debidas a que muchas medidas, y en especial los títulos de anticuerpos, no son comparables entre laboratorios. El nivel de anticuerpos al parto es todavía detectable, por lo que puede pensarse en su transferencia a los hijos a través del calostro, como se ha observado en otras razas (MATTNER *et al.*, 1984; COX *et al.*, 1984).

La evolución del título de anticuerpos en la inmunización pasiva es mucho más rápida que en la activa, como se esperaba. A partir de los datos obtenidos, puede predecirse una ligación a los 17 días de unos 6,5 pmols/ml, que representaría un 8,5% del valor inicial. Asimismo, se prevé que los niveles de anticuerpos específicos circulantes alrededor del día 43 sean prácticamente indetectables a estas dosis de antisuero. Esto sería importante si los anticuerpos resultasen ser perjudiciales para la implantación y/o desarrollo del embrión, en cuyo caso la inmunización pasiva contaría con mejores resultados reproductivos que la activa.

A pesar de que la tasa de ovulación se incrementó notablemente, la prolificidad aumentó muy poco debido sólo a la gran incidencia del FPOM en el lote inmunizado, ya que la tasa de ovulación de las ovejas preñadas y vacías fue similar. Las causas del FPOM observado no pueden conocerse a partir de los datos de esta experiencia, pero podrían ser: captación fimbrial defectuosa, fertilización parcialmente impedida o mortalidad embrionaria parcial.

La fertilidad del lote tratado fue incluso un poco superior a la del lote control, por lo que no se confirman los datos anteriores en que fue menor (FOLCH,

1986). El peso de estas corderas (32,4 kg) fue similar al de aquel trabajo (31,2), por lo que las diferencias observadas no pueden atribuirse al peso.

Concluyendo, no puede afirmarse que la inmunización activa contra AD disminuya la fertilidad en corderas. Sin embargo, sí parece claro que existe una gran incidencia de FPOM al igual que ocurre en ovejas adultas. Sería necesario conocer a qué es debido el FPOM en las ovejas inmunizadas y si dicho FPOM está relacionado con el nivel de inmunización o de alimentación. Por otra parte, sería interesante comprobar si ocurre algo similar en la inmunización pasiva, en que los anticuerpos desaparecen de la circulación mucho más rápidamente.

### 5. 2. Experiencia 2: Parámetros reproductivos de ovejas reinmunizadas en invierno sometidas a un ritmo intensivo de reproducción: influencia de una moderada suplementación nutricional y estudio del perfil hormonal de LH en el período periovulatorio

#### 5.2.1. Introducción

En experiencias anteriores realizadas con ovejas adultas sometidas a 3 partos en dos años (FOLCH, 1986) se vio que en el primer año de tratamiento la inmunización activa contra AD incrementó notablemente la tasa de ovulación, pero también el FPOM, de forma que la prolificidad y fecundidad apenas variaron. Sin embargo, se observó una tendencia a obtener mejores resultados en el segundo año de tratamiento. Cuando la alimentación no es suficiente, el acortamiento del intervalo parto-cubrición puede ocasionar que los animales no se encuentren preparados para soportar una gestación gemelar. Por ello, esta experiencia se diseñó para comprobar si una moderada suplementación nutricional puede reducir el alto FPOM observado en los animales inmunizados. Por otra parte, la existencia de picos preovulatorios de LH anormales se ha asociado con un mal funcionamiento posterior del cuerpo lúteo (RHIND *et al.*, 1986a) y los perfiles de secreción de LH parecen ser diferentes en las ovejas inmunizadas (SCARAMUZZI y HOSKINSON, 1984). Por dicha razón se decidió medir algunos de los parámetros más importantes relacionados con el pico preovulatorio de LH, con el objeto de saber si existen alteraciones a este nivel que pudieran justificar los hechos observados.

#### 5.2.2. Material y Métodos

##### Animales

Se utilizaron ovejas que habían estado sometidas a un ritmo de 3 partos en 2 años. Treinta y ocho ovejas que habían sido inmunizadas en una o varias cubriciones anteriores fueron reinmunizadas de nuevo en esta experiencia (Lote I) y 28, que no habían sido inmunizadas nunca, no se trataron y sirvieron de controles (Lote C). Se administraron 2 ml de FECUNDIN (Cooper-Zeltia) al Lote I

tres semanas después del parto, destetándose todas las ovejas 3 semanas más tarde. Ambos lotes fueron divididos al azar en 2 grupos: uno recibió una ración de mantenimiento consistente en 750 g de heno de alfalfa y 300 g de paja (Lotes M); el otro se alimentó con la misma ración más un suplemento de 250 g de cebada (140% de la ración de mantenimiento, lotes S) durante un mes. El celo se sincronizó mediante la inserción de esponjas impregnadas de FGA (40 mg, Intervet) durante 10 días y la cubrición se realizó con 6 machos enteros provistos de arnés marcador, en el celo aparecido tras la retirada de las esponjas (4 semanas después de la dosis de recuerdo).

#### Celos y tomas de sangre

Los controles de celo se realizaron cada 4 horas y se tomó una muestra de sangre (5 ml) en tubos heparinizados cada 4 h a partir del celo observable. Otra toma de sangre se realizó una semana después del parto a ovejas y corderos para conocer el título de anticuerpos en ese momento.

Las muestras fueron centrifugadas rápidamente a 1500 g y el plasma se congeló a -20°C hasta que pudo ser analizado.

#### Análisis

El título de anticuerpos se midió por RIA (SCARAMUZZI *et al.*, 1975) utilizando  $21,0 \pm 0,15$  pg de androstenodiona tritiada por tubo. La determinación de las concentraciones de LH se realizó por RIA mediante una técnica de doble anticuerpo (BLANC y POIRIER, *com. pers.*). Todas las muestras fueron analizadas en un mismo ensayo, siendo el coeficiente de variación 8,4% ( $n = 11$ ) para el nivel de 2,2 ng/ml y 7,1% ( $n = 1$ ) para el de 12,5 ng/ml.

#### Análisis estadístico

La comparación de los parámetros reproductivos entre grupos se realizó mediante el test de Chi-cuadrado, con corrección de Yates o el test de Fisher exacto cuando fue necesario. Las restantes variables se compararon mediante la *t* de Student. Los títulos de anticuerpos fueron transformados en logaritmos decimales y se expresaron como pmols ligados por ml de antisuero puro. Los niveles basales medios de cada animal se calcularon a partir de los valores anteriores hasta 8 h antes del pico preovulatorio y a partir de 12 h después del mismo.

### 5.2.3. Resultados

#### Título de anticuerpos

El título de anticuerpos en la cubrición no dependió del nivel de alimentación, peso, edad o condición corporal. El título de anticuerpos al parto estuvo fuertemente correlacionado con el alcanzado a la cubrición ( $r = 0,7713$ ,  $p < 0,01$ ).

El nivel de inmunización de los gemelos una semana después del nacimiento fue muy similar y existe una alta correlación entre el título de anticuerpos de los corderos y el de sus respectivas madres ( $r = 0,9827$ ,  $p < 0,001$ ), que tendió a ser superior al de éstas (Cuadro 13).

#### Parámetros reproductivos

La tasa de ovulación aumentó por un efecto neto del tratamiento (+25,4%,  $p < 0,01$ ), teniendo también influencia el peso ( $p < 0,01$ ) y la edad ( $p < 0,001$ ), pero no el nivel de alimentación ni la condición corporal en los rangos estudiados. La correlación con el peso fue significativa en los Lotes I ( $r = 0,3487$ ,  $p < 0,05$ ) y C ( $r = 0,7315$ ,  $p < 0,001$ ) pero la pendiente de la recta fue mayor en el Lote C (0,5946 vs 0,0357,  $p < 0,001$ ). En el lote inmunizado, la tasa de ovulación estuvo correlacionada con el título de anticuerpos ( $r = 0,3465$ ,  $p < 0,05$ ).

La prolificidad no se vio significativamente incrementada por el tratamiento (+5%) a consecuencia del FPOM, que se duplicó en el Lote I respecto al Lote C. La sobrealimentación no consiguió reducir significativamente el FPOM (-6,9%), que tendió a aumentar con el nivel de inmunización (Cuadros 9 y 10). No se apreciaron influencias significativas del peso, edad o condición corporal.

La fertilidad fue menor en el Lote I (-25,8%,  $p < 0,05$ ) pero no hubo diferencias significativas al considerar dos ciclos consecutivos de cubrición (-18,8%). Las pérdidas reproductivas completas y totales fueron también mayores en el Lote I (+29,4%,  $p < 0,01$ ). La fertilidad no mejoró apreciablemente en los lotes sobrealimentados (+3,1%) ni dependió del nivel de inmunización. La tasa de ovulación de las ovejas inmunizadas que no parieron al primer ciclo no fue significativamente mayor que las que si lo hicieron (1,62 vs 1,53, N.S.).

No hubo diferencias apreciables entre lotes en el porcentaje de ovejas en celo ni en su distribución (Cuadro 9 y Figura 7).

#### Parámetros hormonales

No se vieron diferencias significativas en el intervalo de tiempo transcurrido entre el comienzo del celo y el pico de LH entre grupos (Cuadro 11). Los valores máximos de LH fueron mayores en el Lote M ( $p < 0,05$ ), pero no existe un efecto neto del nivel de alimentación sobre dichos valores, sino de la edad ( $p < 0,05$ ) (Cuadro 12). Tampoco existe una dependencia del grado de inmunización dentro del Lote I ( $p < 0,05$ ).

CUADRO 9

Resultados reproductivos de ovejas reinmunizadas (I) o no (C) sometidas a sobrealimentación (S) o a una ración de mantenimiento (M)

LOTE	IM	IS	CM	CS	I	C	M	S
N	19	19	14	14	34	28	33	33
Peso (kg)	41,6 ± 1,2	40,7 ± 1,1	41,4 ± 1,5	40,9 ± 1,4	41,1 ± 0,8	41,1 ± 1,0	41,5 ± 1,0	40,8 ± 0,9
Condición corporal	3,2	3,3	3,2	3,4	3,3	3,3	3,2	3,4
Edad (años)	6,2	5,8	4,9	4,5	6,0	4,7	5,6	5,2
Ligación plasmática de AD (pmols/ml)	82,1 ± 21,1	100,3 ± 31,5	---	---	91,7 ± 19,0	---	---	---
Cielos (%)	94,7	94,7	100	100	94,7	100	97,0	97,0
Tasa de ovulación	1,72 <sup>c</sup>	1,61 <sup>cd</sup>	1,21 <sup>d</sup>	1,23 <sup>d</sup>	1,66 <sup>a</sup>	1,22 <sup>b</sup>	1,50	1,48
Prolificidad (primer ciclo)	1,29	1,25	1,22	1,20	1,27	1,21	1,24	1,22
Fertilidad (%) (primer ciclo)	42,1	42,1	64,3	71,4	42,1 <sup>c</sup>	67,9 <sup>d</sup>	51,5	54,6
Fecundidad (primer ciclo)	54,3	52,6	78,4	85,7	53,5	82,1	64,5	66,6
Prolificidad (2 ciclos)	1,25	1,25	1,20	1,20	1,17	1,20	1,23	1,22
Fertilidad (%) (2 ciclos)	63,2	42,1	71,4	71,4	52,6	71,4	66,7	54,6
Fecundidad (2 ciclos)	78,9	52,6	85,7	85,7	61,6	85,7	81,8	66,6
Pérdidas reproductivas (%)								
Completa	54,8	58,6	29,4	25,0	56,7 <sup>a</sup>	56,7 <sup>a</sup>	45,8	46,7
Parcial	12,9	13,8	5,9	2,5	13,3	13,3	10,4	13,3
Total	67,7	72,4 <sup>c</sup>	35,3 <sup>d</sup>	37,5 <sup>d</sup>	70,0 <sup>a</sup>	70,0 <sup>a</sup>	56,3	60,0
FPOM	58,3	40,0	16,7	33,3	50,0	50,0	44,4	37,5

(a,b: p < 0,01; c, d: < 0,05)

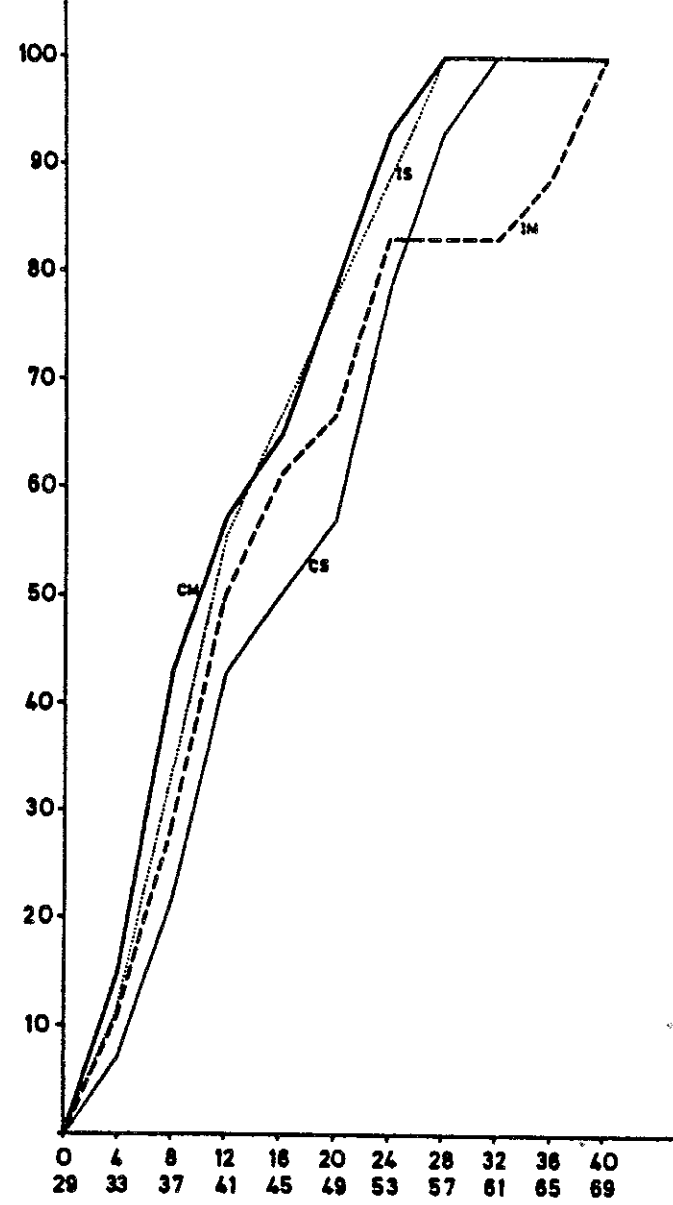


Figura 7. Frecuencias relativas acumuladas (%) de ovejas cubiertas a lo largo del tiempo. En la escala inferior del eje de abscisas se representa el tiempo en horas tras la retirada de las esponjas.

**CUADRO 10**  
Influencia del nivel de inmunización sobre los parámetros reproductivos

RANGO (pmols/ml)	<25,8	25,8 - 87,1	> 87,1	0 (control)
LIGACION (pmols/ml) (X ± ES)	12,5 ± 1,79	58,1 ± 6,45	210,7 ± 39,4	---
N	12	12	12	28
T.O.	1,58	1,58	1,83 <sup>b</sup>	1,22 <sup>a</sup>
PROLIFICIDAD	1,40	1,20	1,17	1,21
FPOM	28,6	25,0	41,7	25,0

a, b: p < 0,01

**CUADRO 11**  
Aplicación del celo y liberación de LH en ovejas inmunizadas o no con distinto nivel de alimentación

LOTE	IM	IS	CM	CS	Total I	Total C	Total M	Total S
Int. FGA-celo (h)	43,2	40,8	40,4	44,0	42,0	42,0	42,0	42,0
Int. celo-pico de LH (d)	6,0	5,2	4,0	4,0	5,6	4,0	5,2	4,8
Niveles máximos de LH (ng/ml)	42,6 ± 2,56	36,9 ± 3,40	45,2 ± 3,37	39,1 ± 4,50	39,8 ± 2,14	42,5 ± 2,75	43,7 ± 2,02 <sup>c</sup>	37,7 ± 2,66 <sup>d</sup>
Niveles basales de LH (ng/ml)	2,5 ± 0,18	2,6 ± 0,18	2,4 ± 0,19	2,2 ± 0,14	2,6 ± 0,12 <sup>c</sup>	2,3 ± 0,12 <sup>c</sup>	2,5 ± 0,12	2,4 ± 0,12

c, d: p < 0,05

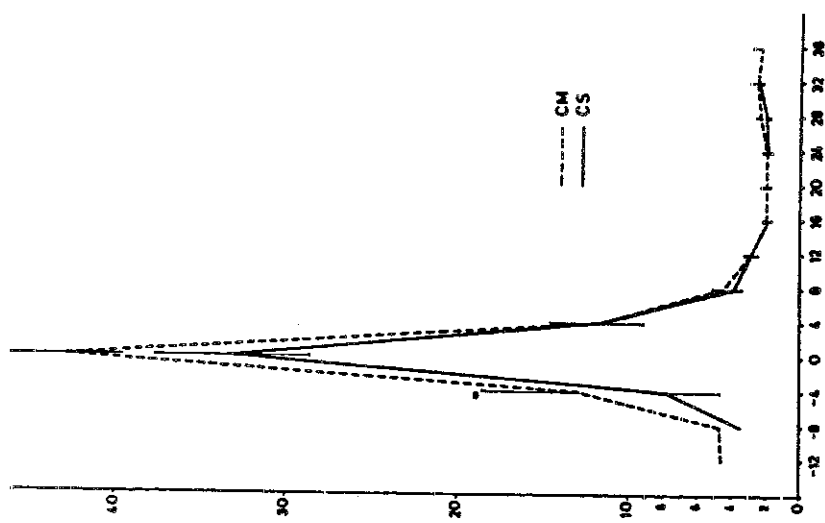
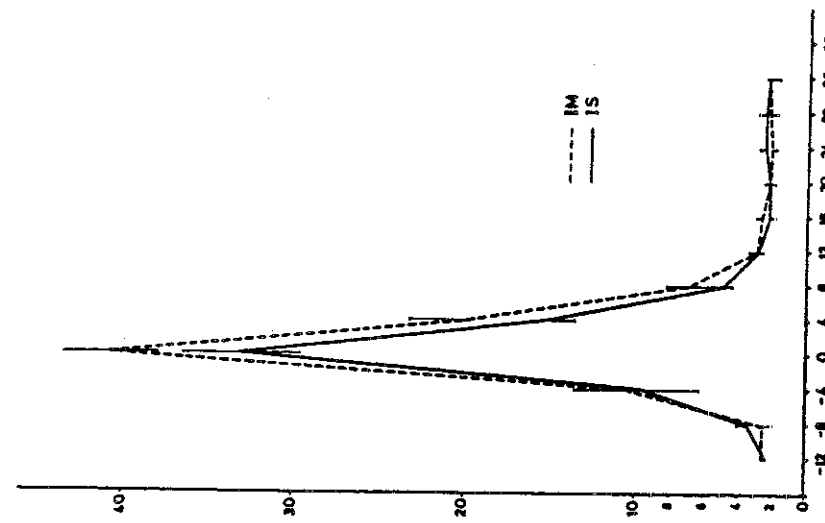


Figura 8. Concentraciones plasmáticas de LH (ng/ml) frente al tiempo (horas) en el pico preovulatorio. Se tomó como hora 0 el valor máximo de cada oveja

Los niveles basales de LH (Cuadro 11 y Figura 8) fueron mayores en el Lote I ( $p < 0,05$ ), pero no se vio un efecto neto del tratamiento sino de la edad  $< 0,01$ . Dentro del Lote I, estos niveles no dependen del grado de inmunización.

CUADRO 12

Influencia de la edad sobre la LH y la tasa de ovulación

RANGO (años)	2 - 6	7 - 10
EDAD (años)	$3,5 \pm 0,30$	$7,9 \pm 0,14$
N	36	29
LH BASAL (ng/ml)	$2,1 \pm 0,08a$	$2,9 \pm 0,13b$
LH PICO (ng/ml)	$36,5 \pm 1,91c$	$44,9 \pm 2,45d$
TASA DE OVULACION	1,22a	1,83b

, b:  $p < 0,01$ ; c, d:  $p < 0,05$

CUADRO 13

Nivel de inmunización (pmols/ml) de las ovejas y de su descendencia una semana después del parto ( $X \pm ES$ )

N	MADRES	HIJOS
13	$8,6 \pm 3,44$	$13,6 \pm 4,62$

5.2.4. Discusión

Los resultados que hemos obtenido indican que el nivel de inmunización depende sólo del individuo y no del peso, condición corporal, edad o régimen alimenticio. Según esto, el efecto de dichas variables actuaría por sí mismo y no a través del título de anticuerpos que adquiere el animal.

La ausencia de relación entre el título de anticuerpos y la condición corporal coincide con resultados de otros autores (RHIND *et al.*, 1986b). Los niveles de inmunización al parto están correlacionados fuertemente con los de la cubrición, como era lógico suponer. El hecho de que los corderos tengan un título más alto que el de sus madres coincide con un trabajo anterior (WILSON *et al.*, 1984), indicando una transferencia enriquecida de anticuerpos a través del calostro.

La tasa de ovulación aumentó por efecto del tratamiento, independientemente de los efectos que tuvieron otras variables y se vio correlación con el título de anticuerpos, como en otros trabajos (COX *et al.*, 1984b). En esta experiencia hemos demostrado que el incremento de la tasa de ovulación debido al peso es

significativamente menor en el lote inmunizado. Ello no debe interpretarse como una respuesta diferente al tratamiento según el peso del animal, sino más bien como que existe un "techo" en la tasa de ovulación para las condiciones de esta experiencia. Así, las ovejas cuya tasa de ovulación está próxima a dicho nivel debido a su elevado peso, no pueden incrementarla mediante esta técnica. Esto está en acuerdo con otros trabajos sobre inmunización pasiva contra testosterona (RHIND *et al.*, 1985a, RHIND *et al.*, 1987a), pero en contradicción con otro de inmunización activa contra AD (SMITH *et al.*, 1985b). En conclusión, posiblemente, el que exista o no interacción entre estos dos factores (peso y tratamiento) dependa de defectos raciales y/o medio ambientales, como por ejemplo la época del año o el intervalo parto-cubrición: este hecho no tiene por qué repetirse bajo otras condiciones.

Parece claro que una sobrealimentación de este tipo en las condiciones de la presente experiencia no es capaz de reducir el FPOM ni aumentar la fertilidad de forma significativa en las ovejas inmunizadas. Sin embargo, es posible que el régimen administrado haya sido insuficiente para llegar a una conclusión definitiva, pues quizá niveles más altos de nutrición y/o más prolongados en el período anterior a la cubrición hubieran mostrado resultados significativos en uno u otro sentido. Es interesante el hecho de que el FPOM tienda a aumentar con el título de anticuerpos, lo que deberá confirmarse en otras experiencias.

La explicación de la baja fertilidad en ambos lotes, pero especialmente en el inmunizado, puede atribuirse a que la cubrición se realizó en un momento demasiado cercano al parto anterior (unos 50 días), que es incluso inferior al que correspondería al sistema de 3 partos en 2 años (unos 90 días). El stress debido a las tomas de sangre pudo haber influido también en esta baja fertilidad.

El intervalo de tiempo entre el comienzo del celo y el pico de LH tendió a ser mayor en las ovejas inmunizadas, pero no se alcanzó significación estadística. Otros autores han encontrado resultados significativos en este sentido (SCARAMUZZI *et al.*, 1977), aunque no ha sido así en un trabajo posterior (SCARAMUZZI y HOSKINSON, 1984).

El incremento de la tasa de ovulación observado en las ovejas inmunizadas no parece estar mediado por la LH, ya que no se ha visto en esta experiencia un efecto neto del tratamiento sobre los niveles basales ni máximos de dicha hormona. Tampoco están correlacionados con el título de anticuerpos. Otros autores también han observado que el aumento de la tasa de ovulación en ovejas inmunizadas no está mediado por la LH (SMITH, 1985). El hecho de que los valores máximos del pico de LH sean menores en los lotes sobrealimentados coincide con otras experiencias (RHIND *et al.*, 1985b; RHIND *et al.*, 1986a), pero en estas las diferencias no fueron significativas. Puede que haya una tendencia en este sentido, pero en la presente experiencia se ha acentuado por un efecto de la edad.

No se observaron picos de LH que presentasen anomalías suficientemente importantes como para explicar la baja fertilidad y elevado FPOM del lote inmunizado.

En conclusión, los niveles moderados de sobrealimentación ofertados no sirven para reducir el FPOM ni incrementar la fertilidad de una forma apreciable en los animales tratados, siendo tal vez necesario incrementar la ración de suplemento y/o comenzarla varias semanas antes de la cubrición para conseguir los efectos deseados.

El FPOM, contrariamente a lo observado en otras experiencias, en esta raza, también ha aumentado en las ovejas reinmunizadas, por lo que deberá estudiarse su causa. El hecho de que se observe una tendencia a aumentar con el título de anticuerpos deberá ser confirmada en otras experiencias en que se compare la inmunización activa con la pasiva, así como la primera inmunización frente a las posteriores reinmunizaciones. Por otra parte, ha quedado bien demostrado que el nivel de inmunización que adquieren los animales tratados no depende de factores como el peso, edad, condición corporal o nivel de alimentación, dentro de los rangos estudiados. Finalmente, parece que los resultados obtenidos no pueden relacionarse con anomalías graves del pico preovulatorio de LH.

### 5. 3. Experiencia 3: Efectos del nivel de inmunización sobre los parámetros reproductivos, supervivencia embrionaria y concentración plasmática de progesterona en ovejas inmunizadas o reinmunizadas activamente contra AD o pasivamente contra T

#### 5.3.1. Introducción

En las experiencias anteriores hemos observado que los incrementos de la tasa de ovulación que se consiguen mediante las técnicas de inmunización vienen acompañadas por pérdidas reproductivas parciales y/o totales según los casos, que reducen considerablemente los beneficios que se pretenden conseguir. Se ha demostrado en el Merino Australiano que existen fallos de fertilización, degeneración embrionaria y retraso del desarrollo embrionario en ovejas inmunizadas activamente contra AD, sobre todo cuando el intervalo entre el recuerdo y la cubrición es corto (BOLAND *et al.*, 1984; BOLAND *et al.*, 1986a; BOLAND *et al.*, 1986b; SCARAMUZZI *et al.*, 1987).

Los objetivos de la presente experiencia son, en primer lugar, conocer si estos mismos problemas ocurren en la raza Rasa Aragonesa y en qué medida, tanto en inmunización activa contra AD como en inmunización pasiva contra T, comparando ambos métodos de inmunización. En segundo lugar, aclarar si esos efectos sobre el desarrollo embrionario son de igual intensidad en ovejas inmunizadas por vez primera que en las reinmunizadas. Finalmente, saber si los

resultados reproductivos en inmunización pasiva contra T dependen o no del tiempo que actúa el anticuerpo en el período anterior a la cubrición, con el fin de corroborar las diferencias observadas anteriormente.

Por otra parte, la progesterona es fundamental para el establecimiento de la gestación. Se sabe que los niveles de dicha hormona son superiores en ovejas hiperinmunizadas contra AD, desde los primeros días posteriores a la ovulación, que en ovejas no inmunizadas (SCARAMUZZI *et al.*, 1977), y que la elevación de la concentración de progesterona en los primeros días del ciclo induce la regresión prematura del cuerpo lúteo (PETERSON *et al.*, 1986). Por ello es fundamental conocer la evolución de la progesterona en el ciclo sexual y saber si existen alteraciones graves en los perfiles de esta hormona que pudieran explicar los hechos constatados.

En esta experiencia se pretende, pues, profundizar en las causas de las pérdidas reproductivas observadas, bajo diferentes protocolos, y conocer su dependencia del nivel de inmunización, así como la función del cuerpo lúteo en dichas condiciones.

### 5.3.2. Material y Métodos

#### Lotes y tratamientos

Se utilizaron 249 ovejas Rasa Aragonesa adultas que parieron 5-8 meses antes de la cubrición de la presente experiencia. Se sincronizaron los celos mediante la inserción de esponjas vaginales de FGA (30 mg, Intervet) que se mantuvieron durante 12-13 días y se formaron los siguientes lotes:

**LOTES AP:** Constituidos por ovejas que no habían sido inmunizadas anteriormente y que fueron tratadas con 2 dosis de 2 ml de FECUNDIN (Cooper-Zeltia) a 4 semanas de intervalo. El tiempo transcurrido entre la segunda dosis y la retirada de la esponja fue de 2 semanas (lote AP2, n = 33) o 4 semanas (lote AP4, n = 35).

**LOTES AR:** Formados por ovejas que habían sido inmunizadas contra AD en anteriores experiencias y que fueron reinmunizadas con 2 ml de FECUNDIN 2 semanas (lote AR2, n = 29) o 4 semanas antes de la retirada de la esponja (lote AR4, n = 31).

**LOTES P:** Compuestos por ovejas que no habían sido tratadas anteriormente y que recibieron antisuero anti-testosterona a la retirada de la esponja (lote P0, n = 32) o bien una semana antes (lote P1, n = 33). La dosis se ajustó al peso vivo del animal, recibiendo 0,8 ml/kg (I.V.) de un antisuero 1/131.500 (lote P0) o 1/199.900 (lote P1).

Los títulos de los sueros anti-testosterona inyectados y su capacidad de ligación de la AD y la P, están expresados en el Cuadro 14.

**LOTE C:** Lo formaron 56 ovejas que no se habían tratado en experiencias anteriores y sirvieron como controles. No recibieron ningún tratamiento, excepto la esponja de FGA.

**CUADRO 14**  
Características de los antisueros inyectados

	LOTE P0	LOTE P1
(TA)-1	131.500	199.900
CAPACIDAD DE LIGACION DE T (nmols/ml)	57,5	87,4
CAPACIDAD DE LIGACION DE AD (pmols/ml)	254,3	186,4
CAPACIDAD DE LIGACION DE P (pmols/ml)	0,97	0,89

#### Detección de celos

La retirada de las esponjas se realizó en 2 días consecutivos y los celos se observaron cada 6 horas mediante la introducción de un 2% de machos enteros provistos de marcadores. Las ovejas en celo se separaron y se realizó una monta dirigida a las 12 horas de la detección del celo. A partir de entonces se mantuvieron con un 4% de machos enteros.

#### Recuperación de embriones

Aproximadamente a la mitad de las ovejas de cada lote se les extrajeron los embriones en los días 5-7 del ciclo mediante el lavado del tracto uterino, mediante la técnica citada por HAFEZ (1980) y modificada por COGNIE (no pub.), previa anestesia con PENTOTAL. La viabilidad de los embriones recuperados se determinó atendiendo a criterios morfológicos. La valoración fue realizada por COCERO siguiendo el criterio descrito por WINTERBERGER-TORRES y SEVELLEC (1987). La otra mitad de las ovejas de cada lote se utilizó para obtener resultados reproductivos y seguir la evolución de la progesterona. La tasa de ovulación en éstas se determinó por endoscopia 5-7 días después de la retirada de las esponjas.

#### Tomas de sangre

Se practicó una toma de sangre en tubos heparinizados (5 ml) a todas las ovejas de los grupos AR y P a la retirada de la esponja, con el fin de determinar el título de anticuerpos. En los lotes AP, sólo se hizo un muestreo al azar de 10 ovejas por lote. Adicionalmente, se tomó otra muestra a todas las ovejas del grupo P1 a los 30 minutos de la inyección intravenosa del antisuero.

Con el fin de conocer la concentración de progesterona, se tomaron muestras de sangre a todas las ovejas de los lotes AR, P y C en los días 3, 5 y 13 del ciclo (día del celo = día 0). El plasma fue congelado a -20°C hasta que pudo ser analizado.

#### Análisis de las muestras

Los títulos de anticuerpos fueron determinados por RIA (SCARAMUZZI *et al.*, 1975) utilizando 21,5 ó 0,15 pg de androstenodiona tritiada ó 25,8 ± 0,12 pg de testosterona tritiada por tubo.

La progesterona fue analizada por RIA mediante una técnica de extracción (LOPEZ SEBASTIAN *et al.*, 1980). Los coeficientes de variación medios intra e inter-análisis fueron 10,4% (n = 13) y 17,6% (n = 4) para una referencia de 1,84 ng/ml y 36,1% (n = 15) y 58,1% (n = 4) para el nivel de 0,19 ng/ml.

#### Análisis estadísticos

Los parámetros reproductivos así como los correspondientes al estudio de la calidad embrionaria fueron comparados mediante el test de Chi-cuadrado o el test de Fisher exacto. Las variables continuas fueron comparadas mediante la t de Student, con la modificación de Behrens-Fisher cuando las varianzas eran significativamente diferentes. Los títulos de anticuerpos fueron transformados en sus logaritmos previamente al análisis con el objeto de reducir la varianza. Los efectos de las variables peso, edad y tasa de ovulación sobre otros parámetros fueron analizados por ANOVA y las medias se compararon mediante el test de Scheffé.

#### 5.3.3. Resultados

##### Nivel de inmunización

El título de anticuerpos no estuvo correlacionado con la edad o el peso en ninguno de los grupos. El nivel de inmunización fue mayor en las ovejas reinmunizadas que en las que se trataron por vez primera, y fueron asimismo mayores en las que se cubrieron a 2 semanas de la dosis de recuerdo. En las ovejas reinmunizadas, los niveles de inmunización de los lotes AR2 o AR4 no fueron significativamente distintos.

La ligación plasmática de las ovejas del grupo P1 tras la inyección fue de 671 ± 32,8 pmols/ml y se redujo al 41,7% en una semana, lo que supone un período de semirreducción de 5,3 ± 0,55 días.

##### Parámetros reproductivos (Cuadros 15,16,18 y 19)

Los incrementos en la tasa de ovulación fueron significativos en todos los lotes y no hubo diferencias apreciables entre los grupos en que se extrajeron los embriones y los destinados a observar parámetros reproductivos. La tasa de

CUADRO 15  
Variables medidas en el total de las ovejas utilizadas

LOTE	AP2	AP4	AR2	AR4	P0	P1	C
N	33	35	29	31	32	33	56
Peso (kg)	43,3 ± 1,2	46,0 ± 1,1	41,2 ± 1,2	42,1 ± 0,7	41,5 ± 1,2	40,7 ± 1,0	42,0 ± 0,7
Edad (años)	5,9 ± 0,5	6,8 ± 0,4	4,1 ± 0,4	5,5 ± 0,5	4,7 ± 0,5	5,4 ± 0,6	4,2 ± 0,3
Ligación plasmática (pmols/ml)	98,7 ± 40,7 <sup>c</sup>	20,5 ± 5,9 <sup>d</sup>	273,0 ± 58,7	220,5 ± 48,1	403,2 ± 40,2 <sup>a</sup>	280,7 ± 22,7 <sup>b</sup>	---
Ovejas cubiertas (%)	87,9	97,1	96,6	93,6	96,9	97,0	98,2
Intervalo Ret. FGA-celo (h)	38,7 ± 1,35	37,3 ± 0,95	47,4 ± 2,64 <sup>b</sup>	42,9 ± 2,41 <sup>d</sup>	54,7 ± 3,01 <sup>b</sup>	43,5 ± 2,24 <sup>b</sup>	36,3 ± 1,52 <sup>ac</sup>
Tasa de ovulación	2,0 <sup>b</sup>	2,0 <sup>d</sup>	2,1 <sup>b</sup>	2,1 <sup>b</sup>	2,1 <sup>d</sup>	2,3 <sup>b</sup>	1,7 <sup>ac</sup>

c,d: p < 0,05

CUADRO 16  
Resultados reproductivos (Sólo primer ciclo)

LOTE	AP2	AP4	AR2	AR4	P0	P1	C
N	12	17	13	18	10	13	27
Peso (kg)	41,8 ± 1,94	45,7 ± 1,42	42,5 ± 1,78	42,8 ± 0,89	41,2 ± 2,15	40,1 ± 1,44	40,7 ± 0,87
Edad (años)	5,3 ± 0,9	7,1 ± 0,6	4,1 ± 0,6	5,4 ± 0,7	4,5 ± 0,6	5,5 ± 0,8	4,2 ± 0,5
Ligación plasmática (pmols/ml)	81,5 ± 18,0	20,2 ± 7,0	211,7 ± 57,6	279,2 ± 71,9	407,1 ± 39,8	241,8 ± 23,2	---
Tasa de ovulación	2,2	1,9	2,2	2,3	2,3	2,3	1,7
Prolifididad	1,50	1,77	1,73	1,79	1,67	2,00 <sup>d</sup>	1,43 <sup>c</sup>
Fertilidad (%)	66,7	70,6	78,6	73,7	81,8	53,8 <sup>d</sup>	85,2 <sup>c</sup>
Fecundidad	1,00	1,35	1,36	1,32	1,36	1,08	1,22
Pérdidas reproductivas			ACTIVA-AD		PASIVA-T		CONTROL
Parcial (%)			16,5		12,8		9,3
Completa (%)			13,8		25,5		14,0
Total (%)			30,3		38,3		23,3
FPOM (%)			20,2		17,1		14,3

c,d: p < 0,05

CUADRO 17  
ESTUDIO DE CALIDAD EMBRIONARIA

LOTE	AP2	AP4	AR2	AR4	P0	P1	C
N	18	17	14	11	12	9	25
Peso (kg)	44,1 ± 1,59	46,2 ± 1,61	40,0 ± 1,56	41,0 ± 1,29	41,8 ± 1,30	41,5 ± 1,40	43,2 ± 1,05
Edad (años)	6,3 ± 0,7	6,6 ± 0,6	4,1 ± 0,7	5,7 ± 0,9	4,8 ± 0,8	5,3 ± 0,9	4,2 ± 0,4
Ligación plasmática (pmols/ml)	111,5 ± 87,3	20,5 ± 9,2	325,4 ± 97,2	132,4 ± 47,0	400,1 ± 67,8	327,1 ± 38,9	---
Tasa de ovulación	1,9	2,0	2,1	1,9	2,0	2,2	1,8
Tasa de recuperación (%)	69,7	66,7	60,0	76,2	65,2	84,2	75,0
Tasa de viabilidad (%)	30,4 <sup>b</sup>	33,3 <sup>d</sup>	50,0	62,5	46,7	50,0	66,7 <sup>ac</sup>

a, b: p < 0,01; c, d: < 0,05

**CUADRO 18**  
Influencia del nivel de inmunización sobre los parámetros embrionarios y reproductivos de ovejas reinmunizadas activamente contra AD

LOTE	CONTROL	RANGO DE LIGACION (PMOLS/ML)			
		<73	73-183	183-440	>440
N total	56	18	14	12	10
Ligación plasmática (pmols/ml)	---	31,9 ± 4,5	110,7 ± 4,9	275,3 ± 16,1	727,9 ± 74,4
Tasa de ovulación	1,7 <sup>a</sup>	1,7 <sup>c</sup>	2,2 <sup>b</sup>	2,4 <sup>bd</sup>	2,4 <sup>bd</sup>
Prolificidad (n)	1,4 <sup>c</sup> (27)	1,7 <sup>(8)</sup>	1,6 <sup>(8)</sup>	2,1 <sup>d</sup> (8)	1,5 <sup>(7)</sup>
Fertilidad (%)	85,2 <sup>a</sup>	87,5 <sup>c</sup>	87,5 <sup>c</sup>	100,0 <sup>a</sup>	28,6 <sup>bd</sup>
Fecundidad	1,2 <sup>c</sup>	1,5	1,4	2,1 <sup>ad</sup>	0,4 <sup>bd</sup>
Int. FGA-celo (h)	36,3 ± 1,52 <sup>ad</sup>	41,0 ± 2,22 <sup>c</sup>	43,3 ± 3,82	47,9 ± 4,75 <sup>bd</sup>	51,4 ± 3,97 <sup>b</sup>
Tasa de recuperación (%) (n)	75,0 (25)	75,0 (9)	66,7 (10)		57,1(6)
Tasa de viabilidad (%)	66,7	58,3	57,1		50,0

a, b:  $p < 0,01$ ; c, d:  $< 0,05$

ovulación estuvo correlacionada con el peso ( $r = 0,2623$ ,  $p < 0,001$ ) y con la edad ( $r = 0,1757$ ,  $p < 0,05$ ) y no hubo diferencias entre grupos en las pendientes de las rectas correspondientes (en conjunto, 0,0287 y 0,0308 para el peso y edad, respectivamente).

La tasa de ovulación se correlacionó significativamente con el título de anticuerpos en los lotes de inmunización activa ( $r = 0,4754$ ,  $p < 0,001$ ), pero no fue así en los de pasiva.

El porcentaje de ovejas en celo fue cercano al 100% en todos los grupos, sin diferencias significativas entre ellos (Figura 9). En los lotes AP2, AP4, AR2, AR4, P0 y P1 el celo se retrasó 2,4 h (N.S.), 1,0 h (N.S.), 11,1 h ( $p < 0,001$ ), 6,6 h ( $p < 0,05$ ), 18,4 h ( $p < 0,001$ ) y 7,2 h ( $p < 0,001$ ) respecto del lote C y se observó una correlación significativa entre dicho retraso y el título de anticuerpos en los lotes AR ( $r = 0,4063$ ,  $p < 0,01$ ) pero no en los lotes P.

La fecundidad se correlacionó significativamente con el peso ( $r = 0,2125$ ,  $p < 0,05$ ) pero no ocurrió lo mismo con la prolificidad. Ambas variables no se vieron significativamente afectadas por el hecho de que se tratase de la primera inmunización o porque el intervalo recuerdo-cubrición fuese 2 ó 4 semanas. La prolificidad fue mayor en los lotes inmunizados que en el control (de +4,9% a 25,2%) aunque sólo se consiguió significación estadística en el lote P1 (+39,9%,  $p < 0,05$ ); sin embargo, la fertilidad fue significativamente menor en dicho lote (-31,48,  $p < 0,05$ ) mientras que no fue así en los demás lotes (-3,4% a -18,5%, N.S.)

La prolificidad de los grupos AR se incrementó en todos los niveles de inmunización establecidos, pero alcanzó significación estadística en el nivel de 275 pmols/ml (+50%,  $p < 0,05$ ) sin afectar a la fertilidad, la cual, por el contrario, si se vio reducida significativamente en las ovejas de título muy alto (unos 728 pmols/ml; -56,6%,  $p < 0,01$ ).

En los grupos P, la prolificidad también se incrementó de manera significativa en los niveles de inmunización moderados (+42,9%,  $p < 0,01$ ), mientras que no lo hizo en el nivel alto. La fertilidad disminuyó ligeramente en todos los niveles, pero las diferencias no fueron significativas y no se observó tendencia alguna en relación con el nivel de inmunización.

Las pérdidas reproductivas totales, parciales y completas, así como el FPOM no difirieron significativamente entre los diferentes protocolos de inmunización.

Parámetros embrionarios (Cuadros 17, 18 y 19)

No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en el porcentaje de embriones recuperados. En las ovejas inmunizadas activamente contra AD

dicho porcentaje tendió a disminuir conforme aumentaba el nivel de inmunización, aunque no se alcanzó significación estadística. En las inmunizadas pasivamente contra T no se observó esta tendencia.

CUADRO 19

Influencia del nivel de inmunización sobre los parámetros embrionarios y reproductivos de ovejas inmunizadas pasivamente contra T

	CONTROL	RANGO DE LIGACIÓN (PMOLS/ML)		
		<262	262 - 372	>372
N	56	16	12	13
LIGACION PLASMÁTICA (pmols/ml)	---	151,2 ± 23,22	274,4 ± 9,93	528,1 ± 3918
TASA DE OVULACION	1,7 <sup>a</sup>	2,2 <sup>b</sup>	2,0 <sup>ab</sup>	2,2 <sup>b</sup>
PROLIFICIDAD (n)	1,4 <sup>ac</sup> (27)	2,0 <sup>b</sup> (7)	2,0 <sup>d</sup> (8)	1,4 <sup>ab</sup> (7)
FERTILIDAD %	85,2	71,4	62,5	71,4
FECUNDIDAD	1,2	1,4	1,3	1,0
TASA DE RECUPERACION (%)	75,0(25)	60,0(7)	81,8(6)	85,7(7)
TASA DE VIABILIDAD (%)	66,7 <sup>c</sup>	77,8	44,4	33,3 <sup>d</sup>

N: número total de animales; (n): número total de animales a que se refiere el valor de la variable.

a,b:  $p < 0,01$ ; c,d:  $p < 0,05$

El porcentaje de embriones viables fue inferior en todos los grupos tratados respecto del control, alcanzando significación estadística en los grupos AP2 (-36,3%,  $p < 0,01$ ) y AP4 (-33,4%,  $p < 0,05$ ). En ambos tipos de inmunización tendió a disminuir conforme aumentaba el nivel de inmunización, pero sólo se alcanzó significación en la categoría mas alta (528 pmols/ml) de los lotes de inmunización pasiva contra T (-33,4%,  $p < 0,05$ ).

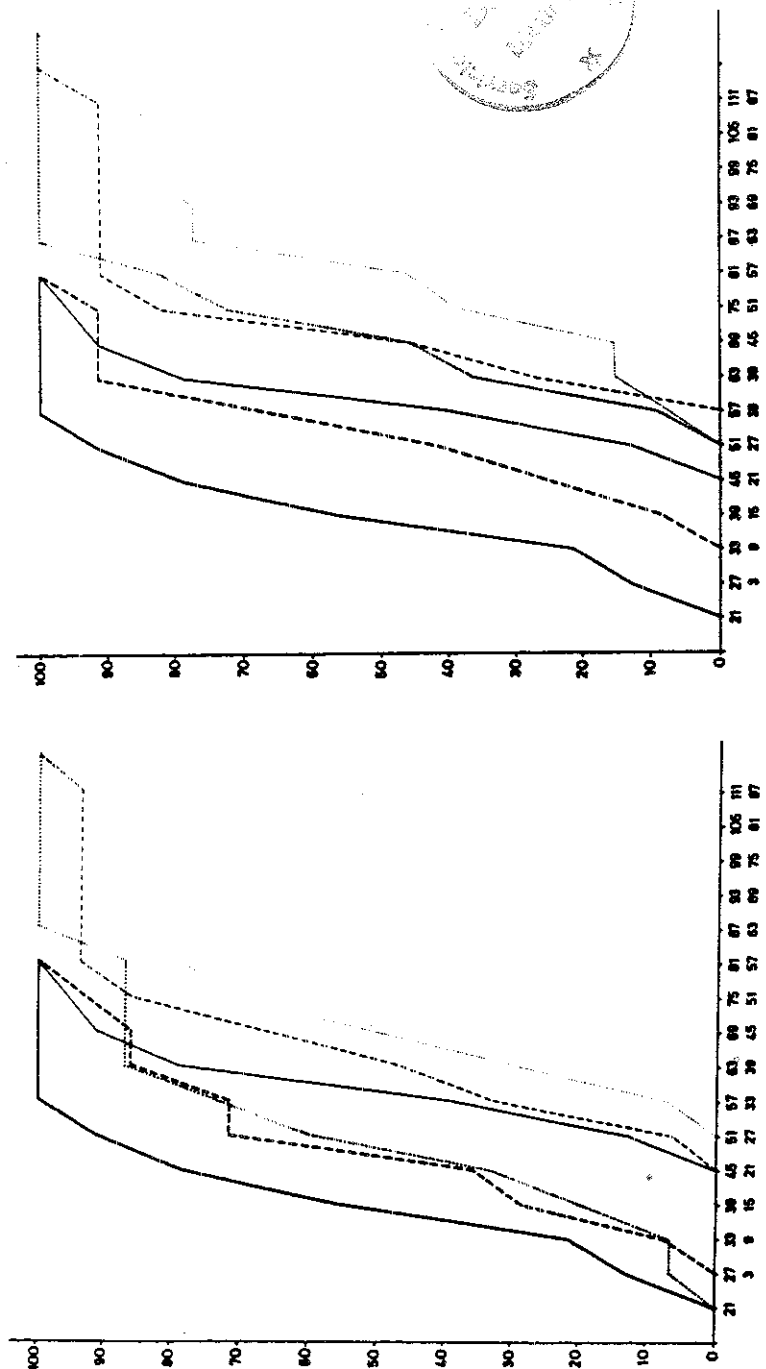


Figura 9. frecuencias relativas acumuladas (%) de ovejas cubiertas en función del tiempo (horas) tras la retirada de FGA. Las escalas superior e inferior, así como los trazos grueso y fino se refieren al primero y segundo día consecutivos en que se retiraron las esponjas, respectivamente. (Ver Material y Métodos). (—) lote C, (-----) lotes AR4 en la gráfica izqda. y P1 en la dcha., (.....) lotes AR2 en la izqda. y P0 en la dcha. respectivamente.

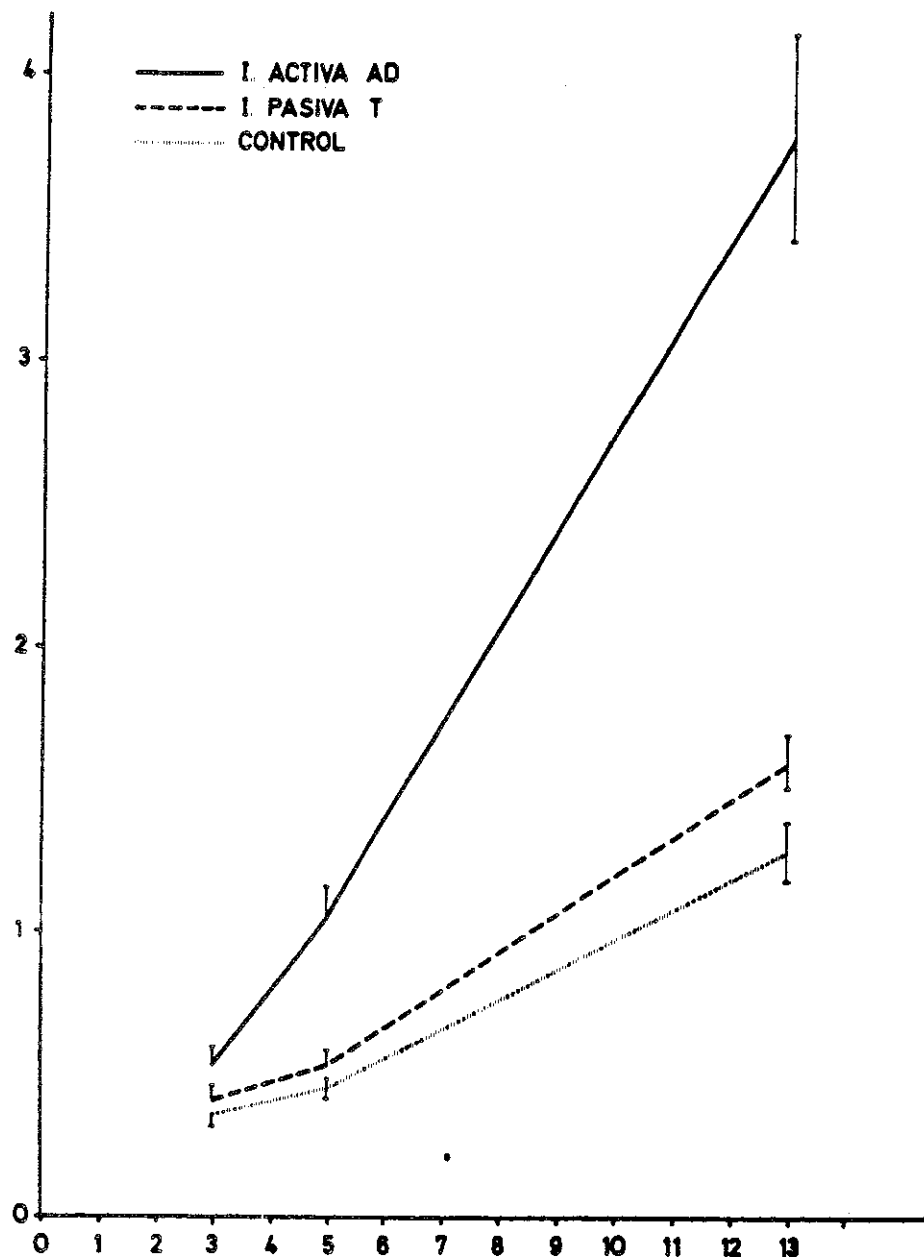


Figura 10. Evolución de la concentración plasmática de progesterona (ng/ml) en los lotes AR (—), P (---) y C (.....) en los días 3, 5 y 13 del ciclo sexual

Sólo se encontraron 4 óvulos no fertilizados entre un total de 145 embriones observados; dos pertenecían al lote AP4 y los otros dos al control.

Niveles de progesterona (Cuadro 20 y Fig. 10)

No hubo diferencias significativas entre los grupos en el día 3 del ciclo sexual. Sin embargo, en el día 5 los valores se duplicaron en los grupos AR2 ( $p < 0,01$ ) y AR4 ( $p < 0,05$ ) respecto de los controles, y en el día 13 se triplicaron en ambos lotes AR ( $p < 0,01$ ). La tasa de ovulación influyó significativamente sobre los niveles de progesterona en el día 13 ( $p < 0,01$ ), pero también hubo un efecto neto del tratamiento que fue independiente de la tasa de ovulación ( $p < 0,001$ ) y no se observó interacción entre ambos factores. La concentración de esta hormona en los grupos AR se correlacionó con el título de anticuerpos a la retirada de la esponja: día 3,  $r = 0,4504$  ( $p < 0,05$ ); día 5,  $r = 0,5557$  ( $p < 0,01$ ); día 13,  $r = 0,7050$  ( $p < 0,001$ ).

CUADRO 20

Concentración plasmática de progesterona de los diferentes lotes en tres días del ciclo sexual (ng/ml)

LOTE	DIA 3	DIA 5	DIA 31	N
AR2	0,60 ± 0,085	1,16 ± 0,191 <sup>b</sup>	3,73 ± 0,633 <sup>ac</sup>	13
AR4	0,50 ± 0,059	0,95 ± 0,073 <sup>d</sup>	3,82 ± 0,399 <sup>ac</sup>	16
P0	0,35 ± 0,044	0,53 ± 0,062	1,58 ± 0,211 <sup>d</sup>	10
P1	0,46 ± 0,063	0,52 ± 0,081 <sup>a</sup>	1,60 ± 0,119 <sup>b</sup>	12
C	0,36 ± 0,045	0,45 ± 0,030 <sup>ac</sup>	1,28 ± 0,100 <sup>b</sup>	14

a,b:  $p < 0,05$

En los lotes de inmunización pasiva contra T, los niveles de progesterona tendieron a ser más altos que los del lote control, pero no se alcanzó significación estadística y no se observó correlación con el título de anticuerpos.

#### 5.3.4. Discusión

En la presente experiencia ha quedado claramente demostrado que el título de anticuerpos que alcanzan las ovejas inmunizadas activamente contra AD influye decisivamente sobre numerosos parámetros fisiológicos del animal. En concreto, niveles altos de inmunización ocasionan alteraciones fisiológicas que se manifiestan en un retraso en la aparición del celo, pérdida de fertilidad y elevación de la concentración de progesterona plasmática a partir del día 3 del ciclo, así como en una tendencia a disminuir las tasas de embriones viables y recuperados. La tasa de ovulación no aumenta por encima de un nivel de inmunización determinado, lo que parece indicar que existe un límite genético en estas condiciones, por encima del cual no puede incrementarse la tasa de ovulación por medio de esta técnica. Al parecer, sólo las ovejas que lograsen alcanzar un nivel de inmunización situado dentro de un rango determinado lograrían mejorar sus características reproductivas.

En la inmunización pasiva, la situación parece similar, ya que existe una menor supervivencia embrionaria en el rango de alta ligación plasmática de testosterona. La fertilidad de las ovejas que se trataron con el antisuero una semana antes de la cubrición fue significativamente menor que las del control, pero ello no ocurrió en las que se trataron en el día de la cubrición aun a pesar de que el título de anticuerpos de éstas fue significativamente mayor que el de aquéllas. Esto parece indicar que la presencia de altos niveles de anticuerpos anti-testosterona en los días precedentes a la cubrición resulta perjudicial para el normal desarrollo de la gestación.

El hecho de que la viabilidad embrionaria sea significativamente menor en las ovejas inmunizadas por primera vez y no ocurra esto en las reinmunizadas, corroboraría resultados anteriores en que los parámetros reproductivos mejoraron sólo en las reinmunizadas (FOLCH, 1986). Sin embargo, es curioso el hecho de que esta menor viabilidad embrionaria encontrada en la presente experiencia no se haya correspondido con un empeoramiento en los resultados reproductivos respecto de las reinmunizadas.

Es importante destacar que sólo se haya encontrado un 2,8% de óvulos no fertilizados, los cuales no se han podido asociar al tratamiento. Esto contrasta con otros trabajos, en que se ha encontrado un menor tasa de recuperación, fertilización y viabilidad embrionaria en ovejas inmunizadas contra AD, sobre todo cuando el intervalo entre el recuerdo y la cubrición es de 2 semanas (BOLAND *et al.*, 1984; BOLAND *et al.*, 1986a; BOLAND *et al.*, 1986b; SCARAMUZZI *et al.*, 1987).

La inmunización provoca incrementos en la concentración plasmática de progesterona, que son más marcados en la activa contra AD. Sin embargo, habría que saber si toda la progesterona cuantificada permanece biológicamente activa, pues en caso desfavorable podría ser la causa de muchas de las alteraciones observadas. En el caso de la inmunización pasiva, no puede pensarse que exista una cantidad significativa de dicha hormona unida al anticuerpo dado que la reactividad cruzada del antisuero anti-T con la progesterona es baja. Sin embargo, no puede asegurarse lo mismo en el caso de la inmunización activa contra AD ya que la cantidad de anticuerpos circulantes debe ser mucho mayor. Por otra parte, podría haber una mayor cantidad de proteínas plasmáticas ligadoras de progesterona. Como no existen datos referentes a estos extremos en la literatura, todas estas posibilidades no pasan de ser meras especulaciones.

También es importante reseñar que no hubo en ningún caso regresión prematura del cuerpo lúteo el día 13 del ciclo, a juzgar por los valores individuales de progesterona en ese día.

Concluyendo, las pérdidas reproductivas observadas en esta raza bajo las condiciones de inmunización no son debidas a que existan fallos de fertilización, al menos cuando la cubrición se hace de forma dirigida y las ovejas tienen múltiples oportunidades de ser montadas por diferentes machos. La menor tasa de recuperación observada por otros autores y cuya tendencia hemos observado en esta experiencia, podría explicar parte de las pérdidas reproductivas, ya que algunos óvulos no llegarían a ser recogidos por las fimbrias en las ovejas inmunizadas. El mayor porcentaje de embriones degenerados que se han encontrado en las ovejas tratadas puede explicar gran parte de dichas pérdidas. Sin embargo, no podemos conocer a partir de esta experiencia si los embriones degeneran debido al ambiente hormonal uterino o si por el contrario los óvulos ya presentan alguna anomalía antes de ser fertilizados que se manifiesta en una degeneración posterior. Tampoco es posible saber a partir de la presente experiencia si además existe o no un problema de reconocimiento materno de la gestación en las ovejas inmunizadas que provocaría pérdidas reproductivas completas en ovejas que pudieran tener algún embrión viable.

#### 5.4. Experiencia 4: Supervivencia de embriones de ovejas no inmunizadas, en el útero de ovejas inmunizadas: efectos del nivel de inmunización

##### 5.4.1. Introducción

Se ha visto en la experiencia 3 que ambos tipos de inmunización tienden a disminuir la tasa de recuperación de embriones en los días 5-7 del ciclo y que la viabilidad embrionaria en este estadio se reduce significativamente, especialmente en los animales que alcanzan un mayor nivel de inmunización. Ambos hechos podrían explicar, al menos en parte, los resultados reproductivos observados en experiencias anteriores. Sin embargo, no se puede afirmar con fiabilidad si las degeneraciones observadas en los embriones procedentes de ovejas que tuvieron 2 ovulaciones tienden a ser parciales (un sólo embrión afectado) o completas (ambos embriones afectados). Esto es debido a que el número de animales de tasa de ovulación 2 a los que se recuperaron ambos embriones fue relativamente bajo. Tampoco se puede saber si los embriones viables que se recuperaron hubieran o no llegado a término: es decir, no puede conocerse a partir de aquella experiencia si existe o no un problema adicional en el mantenimiento de la gestación, debido p. ej. a dificultades en el reconocimiento materno de la gestación. Por último, con los datos de que disponemos, no podemos saber si las degeneraciones embrionarias observadas se deben al óvulo "per se" o si, por el contrario, ocurren posteriormente a la fecundación a causa de alteraciones del ambiente uterino.

La transferencia de embriones se ha convertido en una herramienta muy útil en el estudio de la mortalidad embrionaria (MOORE, 1985). Por otra parte, las concentraciones plasmáticas de progesterona son muy importantes en la creación de un ambiente uterino adecuado para el normal desarrollo del

embrión (WILMUT *et al.*, 1986). Por todo ello, hemos realizado una cuarta experiencia utilizando la transferencia de embriones, con el fin de conocer: a) si embriones de 1-2 días procedentes de ovejas no inmunizadas tienen o no la misma probabilidad de sobrevivir en el seno de ovejas inmunizadas que en las no inmunizadas; b) si existen diferencias entre tratamientos en la proporción de ovejas que sufren mortalidad embrionaria parcial o completa; c) la influencia de la progesterona plasmática en los días 2 al 13 del ciclo.

#### 5.4.2. Material y Métodos

##### Superovulación de ovejas donantes

Se sincronizaron 27 ovejas, que no habían sido inmunizadas ni superovuladas con anterioridad, mediante la inserción de esponjas vaginales de 30 mg de FGA (Intervet) que se mantuvieron durante 12 días. La superovulación se realizó con FSH-p (Burns) según el protocolo descrito por COGNIE (1987): las ovejas recibieron 2 dosis de 5 mg (i.m.) 24 y 12 horas antes de la retirada de la esponja, seguidas de otras 2 de 3 mg a la retirada de la esponja y 12 horas más tarde, respectivamente.

##### Lotes de receptoras

Se prepararon 3 lotes de 30 ovejas cada uno: ovejas reinmunizadas activamente contra AD (lote AAD), pasivamente contra T (lote PT) y control (C). Los celos se sincronizaron también con esponjas de 30 mg de FGA que se mantuvieron durante 12 días. La retirada de la esponja se efectuó 12 horas antes que en las donantes y se trataron los 3 lotes con 300 U.I. de PMSG (Intervet). Además, el lote AAD recibió una dosis de 2 ml de FECUNDIN (Cooper-Zeltia) en el momento de insertar la esponja y el lote P fue tratado con 35 ml de antisuero anti-testosterona (título: 1/44.900, 15,7 nmols ligados/ml) a la retirada de la esponja.

##### Cubrición de donantes y receptoras

Se realizó una cubrición dirigida de las ovejas donantes unas 48 horas después de la retirada de las esponjas. El celo de las receptoras se controló cada 6 horas mediante machos vasectomizados provistos de arnés marcador.

##### Recuperación y transferencia de embriones

Los embriones fueron recuperados y transferidos mediante técnicas quirúrgicas (VALLET, no pub.) unas 48-52 horas después del comienzo del celo observable (embriones de 1 a 2 días, estadio de mórula de 2-8 células). Aquellos que se consideraron morfológicamente normales fueron transferidos por parejas respetando el orden de salida en celo. Ambos embriones se depositaron en el oviducto ipsilateral del ovario ovulado a través del Ostium. La valoración

morfológica fue realizada por COCERO siguiendo el criterio descrito por WINTERBERGER-TORRES y SEVELLEC (1987).

##### Tomas de sangre

Se realizaron tomas de sangre a todas las ovejas los días 3, 5, 7 y 13 tras la retirada de las esponjas. El plasma se congeló a -20°C hasta que se llevaron a cabo los análisis correspondientes.

##### Análisis de las muestras

El título de anticuerpos se midió por RIA según la técnica habitual (SCARAMUZZI *et al.*, 1975), utilizando  $20,4 \pm 0,79$  pg de testosterona tritiada por tubo o  $23,1 \pm 0,62$  pg de androstenodiona tritiada por tubo.

La concentración plasmática de progesterona se determinó por RIA mediante una técnica de extracción (LOPEZ SEBASTIAN *et al.*, 1980).

##### Análisis estadístico

Los títulos de anticuerpos se expresaron como picomoles de esteroide ligado por ml de antisuero puro y fueron transformados en sus logaritmos antes del análisis de correlación. Los parámetros reproductivos se compararon mediante el test de Chi-cuadrado con corrección de Yates o el test exacto de Fisher cuando el bajo número de casos lo requería. Las concentraciones medias de progesterona se analizaron por la t de Student, con la corrección de Behrens-Fisher cuando las varianzas diferían significativamente.

#### 5.4.3. Resultados

##### Superovulación (Cuadro 21)

La respuesta al tratamiento fue muy variable. La tasa de ovulación media fue cercana a 7 (mediana = 5) pero el porcentaje de embriones recuperados transferibles referido al total de cuerpos lúteos fue 43,8%. No hubo signos que indica

CUADRO 21  
Resultados de superovulación con FSH en ovejas Rasas no inmunizadas

T.O.	1	2	3	4	5	6	7	9	10	11	12	13	17
N	2	4	2	3	3	1	2	1	4	1	1	2	1
E.R.	1	8	4	7	11	4	7	2	32	10	5	9	15
E.V.	1	6	0	6	7	4	0	0	22	10	0	7	15

##### Datos globales:

N	T.O.	E.R. (%)	E.V. (%)	E.R./O	E.V./O
27	$6,6 \pm 0,84$	64,6	67,8	$4,3 \pm 0,66$	$2,9 \pm 0,73$

N: Número de ovejas; T.O.: tasa de ovulación; E.R.: embriones recuperados; E.V.: embriones viables recuperados; E.R./O: embriones recuperados por oveja; E.V./O.: embriones viables recuperados por ovejas en una sobreestimulación excesiva en ninguna oveja.

Parámetros reproductivos (Cuadros 22, 23, 25 y 26)

La tasa de ovulación de los lotes AAD y PT fue mayor que la del control (+ 29,98 y + 22%, respectivamente) pero las diferencias no fueron significativas debido al bajo número de animales transferidos.

**CUADRO 22**

Número de ovejas por lotes que no parieron o parieron uno o dos corderos a partir de los dos embriones transferidos

NUMERO DE CORDEROS	0	1	2
LOTE AAD	7	2	6
LOTE PT	5	3	2
LOTE C	1	7	6

**CUADRO 23**

Datos reproductivos de ovejas sometidas a diferente tratamiento de inmunización que recibieron dos embriones de ovejas no tratadas

LOTE	AAD	PT	C
N	15	10	14
LIGACION PLASMÁTICA (%) (pmols/ml)	179 ± 70,0	183 ± 41,1	--
TASA DE OVULACION	2,13	2,00	1,64
FERTILIDAD (%)	53,3 <sup>d</sup>	50,0 <sup>d</sup>	92,9 <sup>c</sup>
PROLIFICIDAD			
FECUNDIDAD			
MORTALIDAD EMBRIONARIA (%)			
PARCIAL			
COMPLETA			
TOTAL			

a,b: ; c,d: p<0,05

**CUADRO 24**

Concentración plasmática de progesterona (ng/ml) en diferentes días del ciclo

DIAS	2 + 3	4 + 5	6 + 7	12 + 13
LOTE AAD	0,20 ± 0,04	0,68 ± 0,08 <sup>b</sup>	1,85 ± 0,22 <sup>b</sup>	3,07 ± 0,52 <sup>b</sup>
LOTE PT	0,10 ± 0,04	0,51 ± 0,07 <sup>ab</sup>	1,52 ± 0,19 <sup>d</sup>	1,49 ± 0,17 <sup>a</sup>
LOTE C	0,16 ± 0,04	0,39 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,17 ± 0,09 <sup>ac</sup>	1,36 ± 0,11 <sup>a</sup>

a,b: p<0,01; cd: p<0,05

**CUADRO 25**

Efectos del nivel de inmunización sobre los parámetros hormonales y reproductivos en ovejas reinmunizadas activamente contra AD

GRUPO	CONTROL	RANGO DE LIGACION (pmols/ml)	
		≤ 69,8	> 69,8
N	14	7	8
LIGACION PLASMÁTICA DE AD (pmols/ml)	---	19,7 ± 7,33	319 ± 109
PROLIFICIDAD	1,46	2,00	1,33
FERTILIDAD (%)	92,9 <sup>c</sup>	71,4 <sup>cd</sup>	37,5 <sup>d</sup>
FECUNDIDAD	1,36 <sup>c</sup>	1,43 <sup>cd</sup>	0,50 <sup>d</sup>
CONC. PROGESTERONA (ng/ml)			
DIAS 2 + 3	0,16 ± 0,04	0,14 ± 0,04	0,22 ± 0,05
DIAS 4 + 5	0,39 ± 0,05	0,50 ± 0,07	0,83 ± 0,10
DIAS 6 + 7	1,17 ± 0,09 <sup>b</sup>	1,06 ± 0,12 <sup>b</sup>	2,23 ± 0,29 <sup>a</sup>
DIAS 21 + 13	1,36 ± 0,11 <sup>b</sup>	2,22 ± 0,46 <sup>ab</sup>	3,93 ± 0,85 <sup>a</sup>

cd: p<0,05

Las pérdidas embrionarias totales fueron mayores en los lotes AAD (+ 21,2%, N.S.) y PT (+ 32,9%, p<0,05) que en el C. La distribución de estas pérdidas entre parciales y completas fue diferente en los grupos tratados que en el control. En éste, las pérdidas embrionarias fueron casi exclusivamente parciales, mientras que en aquéllos fueron fundamentalmente completas (p<0,01).

La fertilidad fue menor en ambos grupos tratados que en el control (cada uno, p<0,05) debido al aumento de las pérdidas embrionarias completas en los lotes

AAD (+ 39,5%,  $p < 0,01$ ) y PT (+ 42,9%,  $p < 0,01$ ). La fertilidad fue menor en los grupos de alto nivel de inmunización de los lotes AAD (319 pmols/ml, -55,4%,  $p < 0,05$ ) y PT (252 pmols/ml, -52,9%,  $p < 0,05$ ) que en el lote C.

La prolificidad del lote PT fue similar a la del C, mientras que la del AAD fue algo mayor que éste (+ 19,9%, N.S.). En ambos lotes tendió a ser menor en el grupo de alto nivel de inmunización.

**CUADRO 26**

Efectos del nivel de inmunización sobre los parámetros hormonales y reproductivos en ovejas reinmunizadas activamente contra T

GRUPO	CONTROL	RANGO DE LIGACION (pmols/ml)	
		$\leq 115$	$> 115$
N	14	4	5
LIGACION PLASMÁTICA DE T (pmols/ml)	---	$95,4 \pm 8,64$	$225 \pm 58$
PROLIFICIDAD	1,46	1,67	1,00
FERTILIDAD (%)	92,9 <sup>c</sup>	75,0 <sup>cd</sup>	40,0 <sup>d</sup>
FECUNDIDAD	1,36 <sup>c</sup>	1,25 <sup>cd</sup>	0,40 <sup>d</sup>
CONC. PROGESTERONA (ng/ml) <sup>1</sup>			
DIAS 2 + 3	$0,16 \pm 0,04$	$0,16 \pm 0,11$	$0,08 \pm 0,05$
DIAS 4 + 5	$0,39 \pm 0,05$	$0,55 \pm 0,08$	$0,50 \pm 0,11$
DIAS 6 + 7	$1,17 \pm 0,09^b$	$1,45 \pm 0,34$	$1,53 \pm 0,31$
DIAS 21 + 13	$1,36 \pm 0,11^b$	$1,15 \pm 0,20$	$1,62 \pm 0,26$

c,d:  $p < 0,05$

Las pérdidas embrionarias parciales fueron menores en los lotes AAD (-18,3%) y PT (-10%) que en el C pero no se alcanzó significación estadística.

La fecundidad fue menor en los lotes AAD (-31,6%,  $p < 0,05$ ) y PT (-48,5%, N.S.) que en el C.

Concentraciones de progesterona (Cuadros 24 y 25 y Figura 11)

En el lote AAD las concentraciones plasmáticas de progesterona fueron significativamente mayores que las del control a partir de los días 4-5 del ciclo

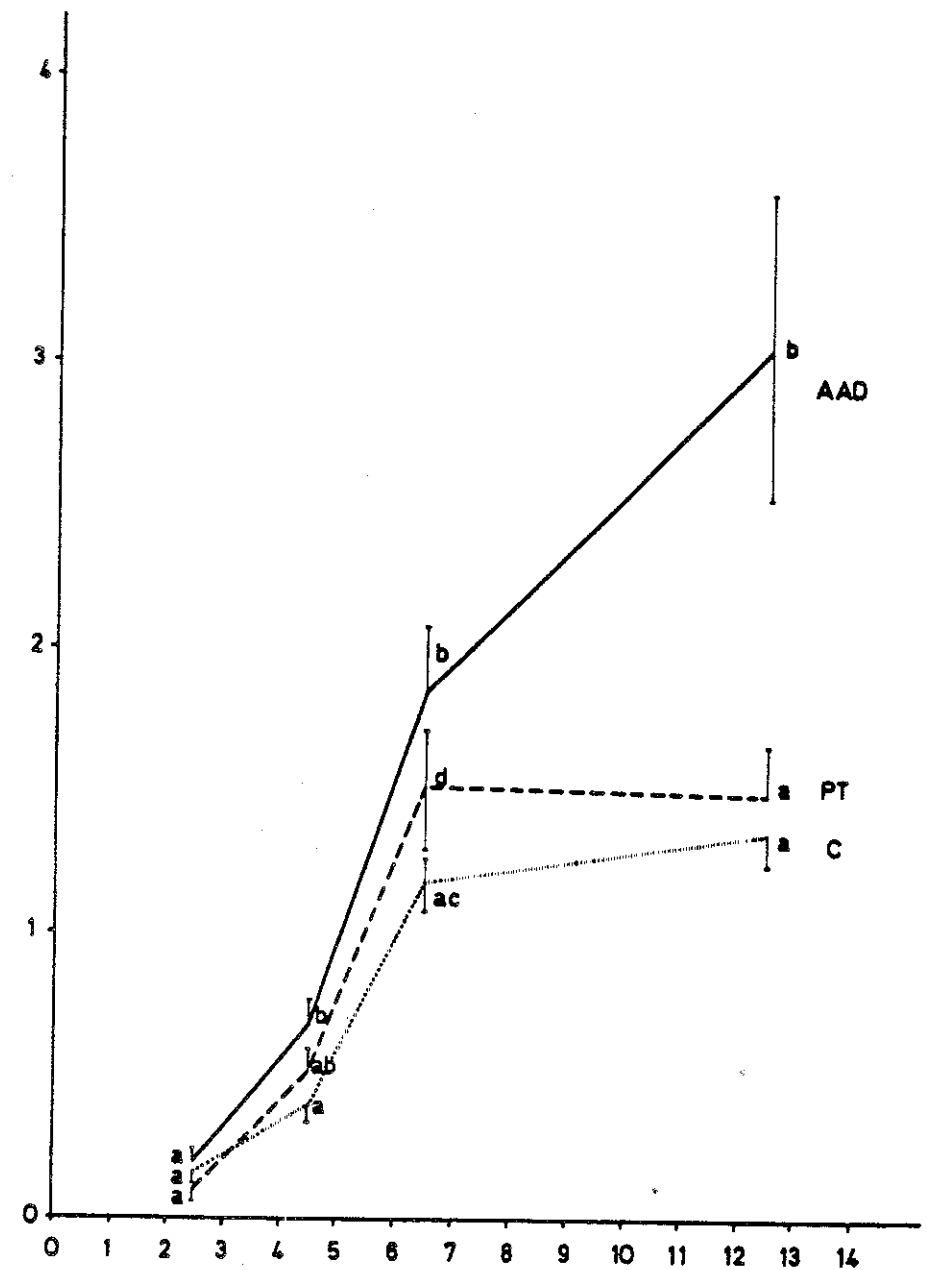


Figura 11. Evolución de la concentración plasmática de progesterona (ng/ml) en diferentes días del ciclo sexual. a,b:  $p < 0,01$ ; c,d:  $p < 0,05$

( $p < 0,01$ ). Además, estos valores se correlacionaron con el título de anticuerpos en los días 4-5 ( $r = 0,6560$ ,  $p < 0,01$ ), 6-7 ( $r = 0,5702$ ,  $p < 0,05$ ) y 12-13 ( $r = 0,5341$ ,  $p < 0,05$ ).

En el lote PT los niveles de progesterona tendieron a ser mayores que los del control, pero sólo se alcanzó significación en los días 6-7 ( $p < 0,05$ ). No se observó correlación con el título de anticuerpos pero los valores tendieron a ser mayores en el grupo de título alto a partir del día 6.

#### 5.4.4. Discusión

Si consideramos que una tasa de ovulación mayor de 3 indica que ha habido respuesta al tratamiento superovulatorio, entonces podemos decir que el 70,4% de las ovejas tratadas respondió al tratamiento. Sin embargo, no se obtuvieron tantos embriones viables como se esperaba a juzgar por experiencias anteriores (COGNIE, 1987), probablemente debido a una menor actividad de la hormona utilizada. Por ello, sólo se pudieron realizar menos de la mitad de las transferencias que se habían programado.

A pesar del bajo número de animales transferidos, las diferencias han sido suficientemente marcadas para obtener significación estadística en varios parámetros. En concreto, llama la atención el hecho de que la mortalidad embrionaria parcial en los lotes tratados sea mucho menor que la mortalidad embrionaria completa, siendo que en el lote control la situación es justamente la inversa. Según estos hechos, parece ser que la supervivencia embrionaria en los animales inmunizados se rige por la ley del "todo o nada", lo que podría indicar una alta contribución de la madre por sí misma en la mortalidad embrionaria. Al menos dos teorías podrían explicar estos hechos: 1) a partir de un cierto nivel de inmunización característico de cada animal existiría una gran probabilidad de que el medio uterino no pudiera proporcionar algún constituyente esencial para el desarrollo de los embriones, de forma que ambos quedarían afectados; 2) a partir de un determinado nivel de inmunización propio de cada animal, existirían graves problemas en el reconocimiento materno de la gestación. De esta manera, la supervivencia de un sólo embrión no sería suficiente, en general, para evitar la regresión del cuerpo lúteo.

Estas observaciones corroboran los resultados de otras experiencias en que la fertilidad ha disminuido en mayor o menor grado en los lotes inmunizados. Sin embargo, es importante recordar que en muchas otras se ha constatado fundamentalmente un incremento del FPOM. Como en esta experiencia la mortalidad embrionaria parcial no ha sido significativamente importante, se podría pensar que el FPOM se debía fundamentalmente a fallos de captación fimbrial (posiblemente uno de los óvulos no llegase a desprenderse del folículo correspondiente) o a un transporte anormal en el tramo superior del oviducto.

Una vez más, los resultados reproductivos están relacionados con el nivel de inmunización de los animales. Además, al igual que en la anterior experiencia, las concentraciones plasmáticas de progesterona están positivamente correlacionadas con el título de anticuerpos específicos. La progesterona es fundamental en el establecimiento de la gestación, por lo que resulta desconcertante que exista mayor mortalidad embrionaria en los animales inmunizados, siendo que cuentan con niveles plasmáticos mayores de esta hormona. Sin embargo, cabría preguntarse qué porcentaje de dicha hormona es biológicamente activo.

En conclusión, sería interesante confirmar las diferencias observadas empleando un mayor número de animales. Vuelve a ocurrir que sólo aquellos que alcanzan un nivel de inmunización dentro de un rango determinado consiguen mejorar sus características reproductivas. Por otra parte, sería interesante determinar la actividad biológica de la progesterona en los animales inmunizados.

## **6. DISCUSION GENERAL**

## 6. DISCUSION GENERAL

En este trabajo se ha podido comprobar una vez más que los resultados reproductivos en términos de fecundidad no siempre mejoran mediante la técnica de inmunización. Dichos resultados dependen del título de anticuerpos circulantes en algún momento cercano a la cubrición, de tal forma que sólo aquellas ovejas que poseen un nivel de inmunización moderado pueden mejorar sus características reproductivas. Variables como el peso, la edad o condición corporal no parecen influir decisivamente sobre la respuesta a la inmunización, tanto en términos de título de anticuerpos como desde el punto de vista reproductivo, al menos en los rangos estudiados.

La aplicación de la inmunización activa contra AD en un sistema muy intensivo de producción, parece, en el mejor de los casos, carente de efectividad, aun asociándolo con una sobrealimentación moderada. Sin embargo, a juzgar por los datos de la experiencia 3, ambos tipos de inmunización serían efectivos en un sistema de explotación de un parto anual con cubrición en otoño. Sería necesario comprobar si los beneficios obtenidos en este último caso son o no mayores que en el sistema tradicional de explotación en esta zona.

Los estudios realizados sobre el origen de las pérdidas reproductivas han permitido extraer conclusiones parciales en este sentido, de forma que podemos analizar las diferentes posibilidades:

1. Fallos en la ovulación. Todos los ovocitos o una parte de ellos no llegan a desprenderse del folículo correspondiente, con lo que no serían recogidos por las fimbrias.

Esta posibilidad no puede descartarse como la causa de parte de las pérdidas reproductivas, y en especial del FPOM, ya que cuando se han transferido embriones normales a ovejas inmunizadas (Experiencia 4) se ha visto que apenas existe mortalidad embrionaria parcial. Por el contrario, en experiencias anteriores, el FPOM ha contribuido de manera importante a las pérdidas reproductivas observadas.

2. Fallos de fertilización parcial o total. Los óvulos no llegan a ser fecundados debido a algun problema de transporte espermático inherente a la hembra (mediado por las hormonas), a alguna deficiencia propia de los óvulos o a un retraso temporal del total o de una parte de las ovulaciones.

Este origen parece totalmente descartado a partir de los datos de la experiencia 3. El número de ovocitos no fecundados fue muy bajo y no pudo asociarse al tratamiento recibido ni al nivel de inmunización. Podemos afirmar que este problema no es importante, al menos cuando se realizan

cubriciones dirigidas y las ovejas tienen múltiples posibilidades de cubrirse con diferentes machos.

3. Problemas inherentes al ovocito que no impidan la fertilización pero que se manifiesten posteriormente en degeneraciones letales.

Esta posibilidad no puede desecharse como una parte de las causas de las pérdidas encontradas. No puede conocerse si las degeneraciones halladas en embriones recuperados de ovejas inmunizadas (experiencia 3), proceden del óvulo o si se han producido posteriormente debido al ambiente uterino. Dado que en la experiencia 4 se ha visto que los embriones procedentes de ovejas no inmunizadas tienden a sobrevivir todos o ninguno, podría ser ésta una causa alternativa, o bien simultánea a la posibilidad 1 de este capítulo a la hora de explicar el FPOM.

4. Degeneraciones letales producidas en los embriones a consecuencia del ambiente uterino desfavorable, en etapas posteriores a la fecundación.
5. Fallos en el reconocimiento materno de la gestación. La señal antiluteolítica procedente de los embriones no se produciría debido a influencias del medio uterino o bien, el organismo de la madre inmunizada sería refractario a dicha señal, por lo que se produciría la regresión del cuerpo lúteo.

A partir de los datos obtenidos en la experiencia 4 puede afirmarse que una de estas dos posibilidades, o ambas, explican al menos una parte importante de las pérdidas reproductivas observadas. Según la hipótesis número 4, el ambiente uterino de las ovejas inmunizadas podría carecer de alguna sustancia esencial para el desarrollo embrionario, de forma que las pérdidas serían fundamentalmente completas.

La hipótesis 5 explicaría mejor el hecho de que en la experiencia 4 las posibilidades de supervivencia de un sólo embrión hayan sido bajas. Según esto, la señal procedente de un sólo embrión sería insuficiente en la mayor parte de los casos para que se produjera el reconocimiento materno de la gestación. A partir de un nivel de inmunización determinado, la posibilidad de detener la luteolisis sería escasa, aun a pesar de existir dos embriones viables.

En conclusión, las pérdidas reproductivas parciales podrían explicarse fundamentalmente en base a las posibilidades 1 y/o 3, mientras que las pérdidas completas se explicarían fundamentalmente por las 4 y/o 5. La posibilidad 2 queda totalmente descartada en las condiciones estudiadas.

En futuras experiencias, la fecundación "in vitro" (FIV) podría aclarar si existen o no problemas inherentes al ovocito, mediante la observación de la supervivencia

de embriones en ovejas control, procedentes de ovocitos de ovejas inmunizadas fecundados "in vitro".

Por otro lado, sería interesante poner a punto técnicas que permitiesen conocer qué fracción de la progesterona circulante es biológicamente activa. Esto incluiría estudiar su unión a los anticuerpos así como a otras proteínas plasmáticas.

La suplementación hormonal con progesterona u otros derivados sintéticos de mayor actividad progestágena en los días 8-18 del ciclo (contados a partir del celo), también contribuirían a aclarar si existe o no una deficiencia de progesterona biológicamente activa a pesar de que las concentraciones encontradas en estos animales sean superiores que los de las ovejas controles.

Nuestros resultados indican la gran importancia del título alcanzado sobre la efectividad de la inmunización. Ello parece confirmar el mayor interés de la inmunización pasiva sobre la activa por el hecho de que, teóricamente, el título puede ser mejor controlado. En este aspecto queda abierto un amplio campo de investigación en lo que se refiere a:

- Precisar la cantidad de suero a inyectar.
- Precisar el momento de aplicación para que el animal adquiera el título adecuado.
- Buscar una fuente alternativa de producción de suero.



## 7. CONCLUSIONES

## 7. CONCLUSIONES

1. El título de anticuerpos circulantes que alcanzan las ovejas Rasa Aragonesa en las semanas siguientes a la segunda sensibilización contra la androstenodiona está sujeto a gran variabilidad individual. Los valores hallados en las hembras en los días posteriores al parto son bajos, pero los corderos que amamantan presentan valores superiores que son directamente proporcionales a los de aquéllas.
2. El título de anticuerpos circulantes tras la inmunización pasiva contra la testosterona presenta una menor variabilidad individual que el conseguido mediante inmunización activa contra androstenodiona. El tiempo que debe transcurrir para que los valores del título de anticuerpos se reduzcan a la mitad de los iniciales es de poco más de 5 días en la raza Rasa Aragonesa, tanto en las corderas como en las ovejas adultas.
3. El nivel de inmunización alcanzado a la cubrición en ovejas inmunizadas activamente contra la androstenodiona o pasivamente contra la testosterona influye notablemente sobre la mayor parte de los parámetros hormonales y reproductivos considerados (progesterona, comienzo del celo, tasa de ovulación, fertilidad y prolificidad), así como sobre la "calidad" de los embriones y su supervivencia.
4. El número de corderos nacidos en ovejas inmunizadas solamente aumenta en aquellas que alcanzan un nivel de inmunización intermedio.
5. En las ovejas que alcanzan un nivel de inmunización excesivamente alto se producen pérdidas reproductivas.

Dichas pérdidas no son debidas a fallos en la fecundación sino fundamentalmente a problemas posteriores, atribuibles, en su mayor parte, a la hembra inmunizada que soporta la gestación. Estos problemas actúan, al menos, a partir del segundo día de la vida del embrión. No puede descartarse un efecto negativo anterior a la fecundación sobre los resultados reproductivos.

## 8. RESUMEN

2023...  
2024...  
2025...  
2026...  
2027...  
2028...  
2029...  
2030...

## 8. RESUMEN

El hecho constatado de que la inmunización contra androstenodiona (AD) en la oveja Rasa Aragonesa (RA) incrementaba la tasa de ovulación (TO) pero no siempre la prolificidad (P) y fecundidad, debido principalmente a un incremento en el fallo parcial de las ovulaciones múltiples (FPOM), motivó la realización del presente trabajo.

Se propusieron los siguientes objetivos: 1) Poner a punto una técnica que permita medir el nivel de inmunización en las ovejas. 2) Conocer la evolución de la respuesta inmunitaria en la inmunización activa contra AD y pasiva contra testosterona (T). 3) Tratar de hallar relaciones entre los parámetros reproductivos, la magnitud de la respuesta inmunitaria y los niveles plasmáticos de progesterona (Pg) y hormona luteinizante (LH). 4) Conocer la influencia de la alimentación, peso, edad y condición corporal sobre la eficacia de la inmunización activa contra AD en términos reproductivos. 5) Determinar si las pérdidas reproductivas encontradas se deben a fallos de fertilización o a degeneración embrionaria en ambos tipos de inmunización, y su relación con la magnitud de la respuesta inmunitaria. 6) Saber si la capacidad de las ovejas para soportar una gestación gemelar se ve alterada por dichos tratamientos y en su caso, la dependencia del nivel de inmunización.

Estos objetivos se llevaron a cabo a través de la realización de 4 experiencias utilizando sólo ovejas RA. Los parámetros individuales medidos fueron peso, edad, condición corporal, presencia de celo, T.O., número de corderos nacidos vivos o muertos y título de anticuerpos a la cubrición. En determinadas experiencias se midió la concentración de Pg a lo largo del ciclo sexual o de LH en el período periovulatorio. Las técnicas de recuperación y transferencia de embriones se utilizaron para profundizar en las causas de las pérdidas reproductivas observadas. El nivel de inmunización contra AD o T se midió por RIA (título de anticuerpos). Los coeficientes de variación intra e inter-análisis fueron del orden del 6 y 10%, respectivamente. Se ofrece un programa de ordenador redactado en BASIC para la determinación del título de anticuerpos o la concentración de hormonas medidas por RIA, que se basa en un modelo logístico de 3 parámetros. Las concentraciones de Pg y LH se midieron por RIA. Los coeficientes de variación intra e inter-análisis fueron del orden del 10 y 18% para la Pg y el coeficiente de variación intra-análisis para la LH fue del orden del 8%.

En la experiencia 1 se estudió la evolución del título de anticuerpos tras la inmunización activa contra la AD o pasiva contra la T, así como los parámetros reproductivos de corderas inmunizadas activamente contra AD. Se utilizaron 40 corderas de raza RA, aproximadamente la mitad de las cuales se inmunizaron activamente contra AD (FECUNDIN). La cubrición se realizó en otoño, al segundo ciclo tras la retirada de las esponjas y se estudió la evolución del título

de anticuerpos a partir de la dosis de recuerdo (4 semanas antes de la cubrición), hasta el parto. Otro lote de 10 corderas fue inmunizado pasivamente contra T, con el fin de seguir la evolución del título de anticuerpos. En las corderas inmunizadas activamente contra AD, los valores máximos se alcanzaron una semana después de la dosis de recuerdo, siendo la respuesta muy variable. Los niveles de anticuerpos descendieron progresivamente, siendo todavía detectables al parto. El título de anticuerpos de las corderas inmunizadas pasivamente contra T presentó una menor variabilidad individual y se redujo a la mitad en unos 5 días. En las corderas inmunizadas activamente contra AD la P no aumentó significativamente debido al incremento del FPOM.

En la experiencia 2 se estudió la influencia de una suplementación nutricional moderada sobre la respuesta a la inmunización. También se determinaron los niveles de LH en el período periovulatorio y se estudió la influencia del peso, edad y condición corporal sobre las características reproductivas de las ovejas inmunizadas. Se emplearon 66 ovejas que habían estado sometidas a un ritmo de producción de 3 partos en 2 años, siendo el intervalo de tiempo entre el parto anterior y la cubrición de unos 50 días. Treinta y ocho ovejas se reinmunizaron 4 semanas antes de la cubrición sincronizada con FGA. La mitad de ambos lotes (inmunizado y control) se alimentó con una ración de mantenimiento, mientras que la otra mitad se suplementó con un 40% más durante un mes, a partir de una semana antes de la cubrición. El título de anticuerpos a la cubrición no dependió del peso, edad o condición corporal. La TO se incrementó por efecto neto del tratamiento ( $p < 0,001$ ), peso ( $p < 0,01$ ) y edad ( $p < 0,001$ ), pero no hubo influencia significativa del nivel de alimentación o la condición corporal. Tras el parto, el nivel de anticuerpos de los corderos amamantados tendió a ser mayor que el de sus madres, estando ambos positivamente y estrechamente correlacionados ( $p < 0,001$ ). La fertilidad (F) fue ligeramente baja en ambos lotes, pero fue significativamente menor en el inmunizado ( $p < 0,05$ ). La p no se incrementó significativamente por efecto del tratamiento y la sobrealimentación no produjo mejoras significativas en la F ni en la p. Los niveles basales y máximos de LH en la fase folicular no se vieron significativamente afectados por el tratamiento, pero se incrementaron con la edad ( $p < 0,05$ ) y tendieron a ser menores en los lotes sobrealimentados. No hubo alteraciones importantes en esos niveles de LH que pudieran relacionarse con las pérdidas reproductivas observadas.

En la experiencia 3 se estudió la influencia del título de anticuerpos sobre los parámetros embrionarios, hormonales (Pg) y reproductivos de ovejas inmunizadas activamente contra AD o pasivamente contra T. Se utilizaron un total de 249 ovejas, repartidas en 7 lotes. Sesenta y ocho ovejas se inmunizaron activamente contra AD por vez primera, siendo el intervalo recuerdo-cubrición de 2 ó 4 semanas. Otras 60 ovejas se reinmunizaron 2 ó 4 semanas antes de la retirada de las esponjas. Sesenta y cinco ovejas se inmunizaron pasivamente

contra T a la retirada de las esponjas o una semana antes. Otras 55 ovejas constituyeron el lote control.

En la mitad de cada lote se observaron los resultados reproductivos, mientras que en la otra mitad se evaluó la viabilidad embrionaria. La vida media del título de anticuerpos en las ovejas inmunizadas pasivamente contra T fue de unos 5 días. La TO se correlacionó positivamente con el peso ( $p < 0,001$ ) edad ( $p < 0,05$ ) y nivel de anticuerpos en los lotes reinmunizados activamente contra AD ( $p < 0,001$ ). El comienzo del celo se retrasó significativamente en los lotes reinmunizados y en los de inmunización pasiva respecto de los controles. La P se incrementó significativamente en las ovejas que alcanzaron niveles de inmunización moderados, independientemente del tratamiento recibido. La F disminuyó en las ovejas reinmunizadas que alcanzaron niveles de inmunización elevados ( $p < 0,01$ ). El porcentaje de embriones viables fue menor en las ovejas inmunizadas por vez primera ( $p < 0,01$ ), así como en aquellas con un mayor título de anticuerpos anti-T ( $p < 0,05$ ). Los niveles de Pg se incrementaron notablemente en los lotes reinmunizados ( $p < 0,001$ ) independientemente de la TO. Dichos niveles se correlacionaron positivamente con el título de anticuerpos ( $p < 0,001$ ).

En la experiencia 4 se estudió la influencia del medio uterino de la hembra inmunizada sobre la supervivencia embrionaria de mórulas (2-8 células) procedentes de ovejas no inmunizadas. Se emplearon como donantes 27 ovejas que se superovularon con FSH. Los embriones recuperados fueron examinados para determinar su viabilidad morfológica. Se transfirieron 2 embriones considerados morfológicamente normales a 15 ovejas reinmunizadas activamente contra AD, 10 ovejas inmunizadas pasivamente contra T y 14 controles, que estaban correctamente sincronizadas con las donantes. La F disminuyó en los grupos tratados (cada uno,  $p < 0,05$ ) como consecuencia del incremento de las pérdidas embrionarias "completas" (ambos embriones afectados), (cada uno,  $p < 0,01$ ), sobre todo en ovejas cuyo título de anticuerpos fue elevado ( $p < 0,05$ ). Las pérdidas embrionarias en los lotes tratados fueron fundamentalmente "parciales", mientras que en el control fueron casi exclusivamente "completas" (un solo embrión afectado), ( $p < 0,01$ ). Las concentraciones de Pg a lo largo del ciclo sexual presentaron una evolución similar a la observada en la anterior experiencia.

A partir de las experiencias anteriormente mencionadas se concluye que: 1) el título de anticuerpos circulantes que alcanzan las ovejas RA en las semanas siguientes a la segunda sensibilización contra la AD está sujeto a gran variabilidad individual. Los valores hallados en las hembras en los días posteriores al parto son bajos, pero los corderos que amamantan presentan valores superiores que son directamente proporcionales a los de aquéllas. 2) El título de anticuerpos circulantes tras la inmunización pasiva contra la T presenta una menor variabilidad individual que el conseguido mediante

inmunización activa contra AD. El tiempo que debe transcurrir para que los valores del título de anticuerpos se reduzcan a la mitad de los iniciales es de poco más de 5 días en la raza RA, tanto en las corderas como en las ovejas adultas. 3) El nivel de inmunización alcanzado a la cubrición en ovejas inmunizadas activamente contra la AD o pasivamente contra la T influye notablemente sobre la mayor parte de los parámetros hormonales y reproductivos considerados (Pg, comienzo del celo, TO, F y P), así como sobre la "calidad" de los embriones y su supervivencia. 4) El número de corderos nacidos en ovejas inmunizadas solamente aumenta en aquellas que alcanzan un nivel de inmunización intermedio. 5) En las ovejas que alcanzan un nivel de inmunización excesivamente alto se producen pérdidas reproductivas. Dichas pérdidas no son debidas a fallos en la fecundación sino fundamentalmente a problemas posteriores, atribuibles, en su mayor parte, a la hembra inmunizada que soporta la gestación. Estos problemas actúan, al menos, a partir del segundo día de la vida del embrión. No puede descartarse un efecto negativo anterior a la fecundación sobre los resultados reproductivos.

## 9. SUMMARY

## 9. SUMMARY

Previous experiences proved that immunization of Rasa Aragonesa (RA) ewes against androstenedione (AD) increased ovulation rate (OR) but not always prolificacy (P) or fecundity, mainly due to the increase in partial failure of multiple ovulations (PFMO). This fact encouraged the present work.

The intended objectives were: 1) Make ready a technique that allowed us to measure the immunization level of ewes. 2) Know the evolution of the immunization response in ewes actively immunized against AD or passively against testosterone (T). 3) Try to find the relationship between reproductive parameters, the magnitude of the immune response and levels of plasmatic progesterone (Pg) and luteinizing hormone (LH). 4) Know the influence of nutrition, body weight, age and body condition score on the response to active immunization in reproductive terms. 5) Ascertain whether the observed reproductive losses are due to fertilization failure or to embryonic abnormalities in both types of immunization and their dependence on the magnitude of the immune response. 6) Know whether the ewes' aptitude to support a twin pregnancy is modified by those treatments and in that case its dependence on the immunization level.

Four experiments involving only RA ewes were carried out in order to accomplish the above mentioned aims. Individual parameters usually recorded were body weight, age, body condition score, heats, OR, number of lambs born (dead or alive) and antibody titre at mating. In certain experiments, we measured the concentration of Pg through the oestrous cycle or that of LH in the periovulatory period. Embryo recovery and embryo transfer were used to study the causes of the observed reproductive wastage. The level of immunization against AD or T was measured by RIA (antibody titre). Intra and inter-assay coefficients of variation were about 6 and 10% respectively. We include a computer program written in BASIC for titre and hormonal determinations based on a three parameters logistic model. Pg and LH levels were measured by RIA. Intra and inter-assay coefficients of variation were about 10 and 18% for the Pg assay. Intra-assay coefficient of variation was about 8% for the LH assay.

In experiment 1, the evolution of the antibody titre after active immunization against AD or passive against T was studied. Reproductive performance of AD immune ewe lambs was also studied. In this experiment, 40 RA ewe lambs were used and about half of them were subcutaneously immunized against AD (FECUNDIN). Mating was carried out in autumn, at the second oestrus after sponge withdrawal. The evolution of antibody titre was observed from booster injection (4 weeks before mating) to lambing. Another group of 10 ewe lambs was passively immunized against T in order to observe the decay profile. Ewe

lambs actively immunized against AD displayed the highest titres 1 week after boosting, the magnitude of the immune response being very variable. Antibody levels were decreasing progressively, being still detectable at lambing. Antibody titres of ewe lambs passively immunized against T showed a lower variability and their half-life was about 5 days. In AD actively immunized ewe lambs P was not significantly increased because PFMO was higher in these animals.

Experiment 2 deals with the influence of a moderate nutritional supplementation on the response of RA ewes to immunization. LH levels in the periovulatory period were measured. We also studied the effects of live weight, age and body condition score on the reproductive performance of immunized ewes. Sixty-six ewes that had been previously managed in a 3 lambings in 2 years system were used. The lambing-mating interval was about 50 days. Thirty-eight ewes were re-immunized 4 weeks before FGA synchronized mating. Half of both groups (immunized and control) were offered a live weight maintenance ration while the other half was supplemented with 40% plus of the same ration. This regime was maintained from 1 week before mating to 3 weeks after it. Antibody titre at mating was not related to body weight, age or body condition. OR was increased by a net effect of treatment ( $p < 0,001$ ), body weight ( $p < 0,01$ ) and age ( $p < 0,001$ ). No influence of nutrition or body condition was observed. After lambing, antibody levels in suckling lambs tended to be higher than in their mothers, showing a very good positive correlation between them ( $p < 0,001$ ). Fertility (F) was slightly low in both groups, but significantly decreased in the immunized one ( $p < 0,05$ ). P was not significantly increased by treatment and supplementation did not improve F or P. Peak and basal LH levels in follicular phase were not significantly affected by treatment, but were increased with age ( $p < 0,05$ ) and tended to be lower in supplemented groups. No important alterations in these LH levels which could be related to the observed reproductive losses were seen.

In experiment 3 we studied the influence of antibody titre on embryonic status, Pg levels and reproductive performance of ewes actively immunized against AD or passively against T. A total of 249 ewes allocated to 7 groups were used: Sixty-eight not previously treated ewes were actively immunized against AD, the interval between boosting and mating being either 2 or 4 weeks; another group of 60 previously immunized ewes were re-immunized against T either at sponge withdrawal or one week before; another group of 55 ewes remained untreated and were used as controls. Half of each group was used either to record the reproductive performance of the ewes or to embryo viability assessment. Antibody titre half-life in T passively immunized ewes was about 5 days. OR was positively correlated to body weight ( $p < 0,001$ ), age ( $p < 0,05$ ) and antibody level in AD actively re-immunized ewes ( $p < 0,001$ ). Oestrus onset was significantly delayed in actively re-immunized groups. P was significantly

increased in ewes which reached a moderate immunization level, independently of the treatment. F was lower in re-immunized ewes that attained a higher antibody titre ( $p < 0,01$ ). The percentage of viable recovered embryos was lower in ewes that had not been immunized before ( $p < 0,01$ ) and in ewes whose T antibody titre was high ( $p < 0,05$ ). Only a few not fertilized eggs were recovered but this fact could not be related to treatments. Pg levels were notably increased in re-immunized ewes ( $p < 0,001$ ) independently of OR and were positively correlated to antibody titre ( $p < 0,01$ ).

Experiment 4 deals with the influence of the uterine environment of the immunized ewes on the embryo survival of morulae (2-8 cells) coming from unimmunized ewes. Twenty-seven donor ewes were superovulated with FSH. Embryos were recovered and morphological viability assessed. Two healthy embryos were transferred to each one of the 15 AD actively re-immunized, 10 T passively immunized and 14 control ewes that were in close synchrony with donor ones. F was decreased in treated groups ( $p < 0,05$ ) as a consequence of an increase in "complete" (both embryos affected) embryo mortality ( $p < 0,01$ ), specially when titres were high ( $p < 0,05$ ). Embryo losses were mainly "partial" (only one embryo affected) in control group while mainly "complete" in treated ones ( $p < 0,01$ ). Pg profiles through the oestrous cycle were similar to those observed in experiment 3.

From the above mentioned experiments we can conclude that: 1) Circulating AD antibody titres after boosting are extremely variable. The values found in ewes after lambing are low, but suckling lambs have higher antibody levels than their mothers and a positive lineal relationship exists between them. 2) Antibody titres after passive immunization against T show less variability than those appeared after active immunization against AD. Values are reduced to half of the initial ones in about 5 days, either in ewe lambs or adult RA ewes. 3) Immunization level at mating in AD active immunized and T passive immunized ewes has a great influence on most of the reproductive and hormonal parameters considered (Pg, oestrus onset, OR, F and P), and also on embryo morphology and its survival. 4) The number of lambs born per ewe is only increased in those immunized ewes that display an intermediate immunization level. 5) Reproductive losses are observed in ewes that achieve an excessive immunization level. These losses are not due to fertilization failure but to subsequent problems mostly attributable to the pregnant ewe. The above mentioned problems start, at least, from the second day after conception on. It cannot be disregarded any deleterious effect of elevated titres on the reproductive performance which could appear in a stage previous to conception.



## 10. BIBLIOGRAFIA

## **10. BIBLIOGRAFIA**

**ALIFAKIOTIS T., 1986.** Increasing ovulation rate and lambing percentage by active immunization against androstenedione in dairy sheep breeds. *Theriogenology*, 25 (5): 681-688.

**ATKINSON S., FORD J.R., OLDHAM C.M., PEARCE D.T., 1986.** Immediate increase in utero-ovarian oestradiol from the ovary destined to ovulate after PG administration. *Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol.*, 18: 98.

**BAIRD D.T., McNEILLY A.S., 1981.** Gonadotrophic control of follicular development and function during the oestrous cycle of the ewe. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 30:119-133.

**BECHET D., 1986.** Control of gene expression by steroid hormones. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, 26 (5 A):1025-1055.

**BINDON B.M., PIPER L.R., CAHILL L.P., DRIANCOURT M.A., O'SHEA T., 1986.** Genetic and hormonal factors affecting superovulation. *Theriogenology*, 25 (1): 53-70.

**BOLAND M. P., MURRAY J. D., SCARAMUZZI R. J., SUTTON R., HOSKINSON R. M., HAZELTON I.G., NANCARROW C.D., 1984.** Reproductive wastage and chromosomal abnormalities in early embryos from androstenedione-immune and control Merino ewes. En: *Reproduction in Sheep*, Lindsay D.R. & Pearce D.T. (Eds.), Australian Academy of Science, Canberra, pp. 137-139.

**BOLAND M. P., NANCARROW C. D., MURRAY J. D., SCARAMUZZI R. J., SUTTON R., HOSKINSON R.M., HAZELTON I.G., 1986a.** Fertilization and early embryonic development in androstenedione-immunized Merino ewes. *J. Reprod. Fert.*, 78: 423-431.

**BOLAND M. P., MURRAY J. D., SCARAMUZZI R. J., NANCARROW C. D., HOSKINSON R.M., SUTTON R., HAZELTON I., 1986b.** Embryonic mortality in steroid immunized sheep. En: *Embryonic mortality in farm animals*. Sreenan J.M. & Diskin M.G. (Eds.), Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht-Boston-Lancaster, pp. 171-178.

**CAHILL L.P., 1981.** Folliculogenesis in the sheep as influenced by breed, season and oestrous cycle. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 30: 135-142.

**CAHILL L.P., 1984.** Folliculogenesis and ovulation rate in sheep. En: *Reproduction in Sheep*, Lindsay D.R. & Pearce D.T. (Eds.), Australian Academy of Science, Canberra, pp. 92-98.

CAULCUTT R., 1983. Statistics in research and development. Chapman and Hall Ltd. London & New York.

CLARKE I.J., 1984. Neuroendocrine control of the ovine oestrous cycle. En: *Reproduction in Sheep*. Lindsay D.R. & Pearce D.T. (Eds.), Australian Academy of Science, Canberra, pp. 1-6.

COGNIE Y., 1987. Comparison of two and three days FSH treatment for embryo production in sheep. 3rd. Coll. of European Ass. of Embryo Transfer, p. 47.

COGNIE Y., PHILIPON P., TERQUI M., 1984. Immunization against androstenedione to improve ovulation rate and lamb production. The reproductive potential of cattle and sheep. (Les Colloques de l'INRA, n° 27) pp. 207-215.

COX R.I., 1984. Increased lambing percentages in sheep using a controlled active immunization against steroids. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.*, 15: 182-185.

COX R.I., WILSON P. A., 1976. Effects of immunizing sheep against steroid oestrogens and phyto-oestrogens. *J. Reprod. Fert.*, 46: 524.

COX R.I., WILSON P. A., SCARAMUZZI R.J., HOSKINSON R.M., GEORGE J.M., BINDON B.M., 1984a. The active immunization of sheep against oestrone, androstenedione or testosterone to increase twinning. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.*, 15: 511-514.

COX R.I., WILSON P. A., WONG M.S.F., 1984b. Manipulation of endocrine systems through the stimulation of specific immune responses. *Proceedings of a Symposium held at the University of New England, Armidale, Australia, 27-30 November.*

CROKER K.P., COX R.I., JOHNSON T.J., SALERIAN M., 1984. Influence of time of injection of Fecundin on the reproductive performance of Merino ewes in Western Australia. En: *Reproduction in sheep*. Lindsay D.R. & Pearce D.T. (Eds.), Australian Academy of Science, Canberra, pp. 329-331.

CROKER K.P., JOHNS M.A., BROWN G.A., 1986. Performance of crossbred ewes receiving different Fecundin booster doses. *Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol.*, 18: 40.

CROKER K.P., COX R.I., JOHNSON T.J., SALERIAN M., 1987a. The reproductive performance of naturally mated and artificially inseminated ewes treated with Fecundin at various intervals before the start of breeding. *Theriogenology*, 27(6): 869-877.

CROKER K.P., COX R.I., JOHNSON T.J., WILSON P.A., 1987b. The immunization of ewes against steroids as a means of increasing prolificacy in a mediterranean environment. *Anim. Reprod. Sci.*, 13: 45-60.

CUADRAS C. M., ECHEVARRIA B., MATEO J., SANCHEZ P., 1984. *Fundamentos de estadística. Aplicación a las Ciencias Humanas*. Ed. Promociones, Publicaciones Universitarias, Barcelona.

DAGNELIE P., 1970. *Théorie et méthodes statistiques*. Ed. J. Duculot, S.A., Gembloux, Vol. 1 y 2.

DAVIS G.H., CROSBIE S.F., 1985. Effect of season of steroid immunization and Booroola genotype on the level and duration of response in ovulation rate of ewes. *Proc. N.Z. Soc. Anim. Prod.*, 45: 178-180.

DOWNING J.A., BAIRD D.T., CAMPBELL B.K., SCARAMUZZI R.J., 1986. Steroid secretion rates from the autotransplanted ovary of the Booroola Merino. *Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol.*, 18: 70.

DRIANCOURT M.A., CAHILL L.P., 1984. Preovulatory follicular events in sheep. *J. Reprod. Fert.*, 71: 205-211.

DRIANCOURT M.A., CAHILL L.P., BINDON B.M., TERQUI M., 1984. Parametres folliculaires et endocriniens controlant le taux d'ovulation chez la brebis. 35ième Reunion de la FEZ. S 1.3.

DRIANCOURT M.A., GIBSON W.R., CAHILL L.P., 1985a. Follicular dynamics throughout the oestrous cycle in sheep. A review. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, 25 (1A): 1-15.

DRIANCOURT M.A., JEGO Y., CAHILL L.P., BINDON B.M., 1985b. Follicle population dynamics in sheep with different ovulation rate potentials. *Livest. Prod. Sci.*, 13: 21-33.

ERLANGER B.F., BOREK F., BEISER S.M., LIEBERMAN S., 1957. Steroid-protein conjugates. I. Preparation and characterization of bovine serum albumin with testosterone and with cortisone. *J. Biol. Chem.*, 228: 713-725.

ERLANGER B.F., BOREK F., BREISER S.M., LIEBERMAN S., 1959. Steroid-protein conjugates. II. Preparation and characterization of conjugates of bovine serum albumin with progesterone, deoxycorticosterone and estrone. *J. Biol. Chem.*, 234 (5): 1090-1094.

FAIRCLOUGH R.J., SMITH J.F., PETERSON A.J., 1976. Passive immunization against oestradiol-17 $\beta$  and its effect on luteolysis, oestrus and ovulation in the ewe. *J. Reprod. Fert.*, 48: 169-171.

FELDMAN H., RODBARD D., 1971. Mathematical theory of radioimmunoassay. En: *Principles of competitive protein-binding assays*. Odell W.D & Daughaday W.H. (Eds.), Philadelphia & Toronto, pp. 158-203.

FERNANDEZ ABELLA D., BLANC M.R., COGNIE Y., 1986. Efecto del gen "Booroola" sobre las características reproductivas. *ITEA*, 62: 3-22.

FINDLAY J.K., 1984. Maternal recognition of pregnancy. En: *Reproduction in sheep*. Lindsay D.R. & Pearce D.T. (Eds.), Australian Academy of Science, Canberra, pp.105-111.

FINNEY D.J., 1964. *Statistical Method in Biological Assay*, Charles Griffin and Company, Ltd., London.

FOLCH J., 1986. Aumento de la tasa de ovulación y de la prolificidad de la oveja Rasa Aragonesa mediante la inmunización contra la androstenediona. *Med.Vet.*, 3 (11): 557-564.

FOLCH J., PARAMIO M.T., SAINZ CIDONCHA F., VALDERRABANO J., ECHEGOYEN E., 1985. Influencia de la alimentación sobre la actividad reproductiva de la oveja rasa aragonesa en primavera. I. Efecto del nivel alimenticio en pastoreo. *ITEA*, 60: 35-45.

FOLCH J., PARAMIO M.T., MUÑOZ F., SAIZ CIDONCHA F., 1987. Influencia de la alimentación sobre la actividad reproductiva de la oveja rasa aragonesa en primavera. II. Efecto del nivel alimenticio y del "flushing" en estabulación permanente. *ITEA*, 68: 3-14.

GELDARD H., 1984. Field evaluation of Fecundin an inunogen against androstenedione. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.*, 15: 185-191.

GELDARD H., SCARAMUZZI R. J., 1983. Immunizing ewes to increase lambing percentage. Further developments. *Proc. of Western Aust. wheat sheep review*, Farm Management Foundation of Australia: 39-51.

GELDARD H., SCARAMUZZI R.J., WILKINS J.F., 1984. Immunization against polyandroalbumin leads to increases in lambing and tailing percentages. *N.Z. Vet. J.* 32: 2-5.

GROSSMAN C.J., 1985. Interactions between the gonadal steroids and the immune system. *Science*, 227: 257-260.

GUNN R.G., 1983. The influence of nutrition on the reproductive performance of ewes. En: *Sheep Production*, Haresing W. (Ed.), Butterworths, London, pp. 99-110.

GÜRTLER H., KETZ H.A., KOLB E., SCHRÖDER L., SEIDEL H., 1976. *Fisiologia Veterinaria*. Kolb E. (Ed.) Vol. I, II. Acribia, Zaragoza.

HAFEZ E.S.S., 1980. *Reproduction in farm animals*. 4th Ed. Hafez E.S.S. (Ed.), Lea & Febiger, Philadelphia.

HALFMAN C.J., 1981. Concentrations of binding protein and labeled analyte that are appropriate for measuring at any analyte concentration range in radioimmunoassays. *Meth. Enzym.*, 74: 481-497.

HANRAHAN J. P., 1987. Genetic variation in ovulation rate in sheep. En: *New techniques in sheep production*. Favez I., Marat M., Owen J.B. (Eds.), Butterworths, London, pp. 37-46.

HANSEL W., CONVEY E.M., 1983. Physiology of the estrous cycle. *J. Anim.Sci.*, 57, Suppl. 2: 404-424.

HARDING R.B., HARDY P.R.D., JOBY R., 1984. Increasing lambing rates with ovandrotone-albumin. *Vet. Rec.*, 115: 601.

HARESIGN W., 1985. The physiological basis for variation in ovulation rate and litter size in sheep: A review. *Livest. Prod. Sci.*, 13: 3-20.

HAUGER R.L., KARSCH F. J., FOSTER D.L., 1977. A new concept for control of the estrous cycle of the ewe based on the temporal relationships between luteinizing hormone, estradiol and progesterone in peripheral serum and evidence that progesterone inhibits tonic LH secretion. *Endocrinology*, 101: 807-817.

HEAP R.B., FLEET I.R., HAMON M., 1985. Prostaglandin F-2 $\alpha$  is transferred from the uterus to the ovary in the sheep by lymphatic and blood vascular pathways. *J. Reprod. Fert.*, 74: 645-656.

HENDERSON K.M., FRANCHIMONT P., LECOMTE-YERNA M.J., HUDSON N., BALL K., 1984. Increase in ovulation rate after active immunization of sheep with inhibin partially purified from bovine follicular fluid. *J. Endocr.*, 102: 305-309.

HODGKINSON S., PETERSON A.J., HASZARD P., MARSHALL V., SHANLEY R., 1986. Hormonal metabolism in immunised animals. *Combined Societies Meeting May 20-23*. Dunedin.

HOSKINSON R.M., DJURA P., 1984. Hormone immunoneutralization and the manipulation of animal productivity A perspective. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.*, 15: 194-198.

HOSKINSON R.M., HINKS N.T., SCARAMUZZI R.J., 1982a. Effects of PMSG on ovulation rate in the oestrone-immunized ewe. *Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol.*, 14: 93.

HOSKINSON R.M., SCARAMUZZI R.J., DOWNING J.A., HINKS N.T., TURNBULL K.E., 1982b. Observations of oestrus and ovulation in ewes actively immunized against progesterone. *Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol.*, 14: 92.

HUET S., 1984. Dosages radioimmunologiques: quelle analyse statistique?. *Reprod. Nutr. Develop.*, 24 (3): 209-219.

KELLY R.W., 1984. Fertilization failure and embryonic wastage. En: *Reproduction in sheep*, Lindsay D.R. & Pearce D.T. (Eds.), Australian Academy of Science, Canberra, pp. 127-133.

LEJEUNE B., 1979. Analyse des problèmes posés par la détermination des paramètres caractéristiques d'un système protéine-ligand, application aux dosages radioimmunologiques. Thèse pour le doctorat en pharmacie, Université Française Rabelais, Académie d'Orléans-Tours (France).

LITTLE D.L., COX R.I., WALKER S.K., FLAVEL P.F. 1984. Effect of steroid immunization on clover induced infertility in sheep. En: *Reproduction in Sheep*, Lindsay D.R. & Pearce D.T. (Eds.), Australian Academy of Science, Canberra, pp. 365-367.

LAND R.B., MORRIS B.A., BAXTER G., FORDYCE M., FORSTER J., 1982. Improvement of sheep fecundity by treatment with antisera to gonadal steroids. *J. Reprod. Fert.*, 66: 625-634.

LAND R.B., FORDYCE M., GAULD I.K., MORRIS B.A., WEBB R., 1983. Fertility of sheep given antisera to steroids during anoestrus. *J. Reprod. Fert.*, 67: 269-273.

LOPEZ SEBASTIAN A., DEL CASTILLO SAN JUAN M., PEREZ GARCIA T., INSKEEP E.K., 1980. Efectos de la duración del tratamiento con progestágeno (Norgestomet) y la presencia de moruecos en la respuesta a la GnRH en ovejas manchegas en anoestro de lactación. *An. INIA Prod. Anim.*, 11: 6.

MARTENSZ N. D., SCARAMUZZI R. J., 1979. Plasma concentrations of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and progesterone during the breeding season in ewes immunized against androstenedione or testosterone. *J. Endocr.*, 81: 249-259.

MARTENSZ N. D., SCARAMUZZI R. J., VAN LOOK P. F. A., 1979. Plasma concentrations of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone during anoestrus in ewes actively immunized against oestradiol-17 $\beta$ , oestrone or testosterone. *J. Endocr.*, 81: 261-269.

MARTIN G.B., SCARAMUZZI R.J., COX R.I., GHERARDI P.B., 1979. Effects of active immunization against androstenedione or oestrone on oestrus, ovulation and lambing in Merino ewes. *Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb.*, 19: 673-678.

MARTIN G.B., SCARAMUZZI R.J., HENSTRIDGE J.D., 1983. Effects of oestradiol, progesterone and androstenedione on the pulsatile secretion of luteinizing hormone in ovariectomized ewes during spring and autumn. *J. Endocr.*, 96: 181-193.

MATTNER P. E., BROWN B. W., WONG M. S. F., WILSON P. A., COX R. I., 1984. Effect of high levels of androstenedione immunity in pregnant ewes on the sexual activity displayed by their male progeny. *Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol.*, 16: 75.

MCCONNELL I., MUNRO A., WALDMANN H., 1982. The immune system. A course on the molecular and cellular basis of immunity. 2nd. Ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford-London-Edinburgh-Boston-Melbourne.

MOORE N.W., 1985. The use of embryo transfer and steroid hormone replacement therapy in the study of prenatal mortality. *Theriogenology*, 23 (1): 121-128.

MURRAY J. D., BOLAND M. P., MORAN C., NANCARROW C. D., 1985a. Embryonic chromosomal abnormalities and reproductive wastage in Fecundin treated and control Merino ewes. *Theriogenology*, 23 (2): 211.

MURRAY J. D., BOLAND M. P., MORAN C., SUTTON R., NANCARROW C. D., SCARAMUZZI R. J., HOSKINSON R.M., 1985b. Occurrence of haploid and haploid/diploid mosaic embryos in untreated and androstenedione-immune Australian Merino sheep. *J. Reprod. Fert.*, 74: 551-555.

MURRAY J. D., MORAN C., BOLAND M. P., NANCARROW C. D., SUTTON R., HOSKINSON R.M., SCARAMUZZI R. J., 1986. Polyploid cells in blastocysts and early fetuses from Australian Merino sheep. *J. Reprod. Fert.*, 78: 439-446.

NIESCHLAG E., WICKINGS E.J., 1978. Biological effects of antibodies to gonadal steroids. *Vit. Horm.*, 36: 165-202.

NISWENDER G.D., AKBAR A.M., NETT T.M., 1971. Use of specific antibodies for quantification of steroid hormones. *Meth. Enzym.*, 36 (2): 16-34

OLDHAM C.M., LINDSAY D.R., 1980. Laparoscopy in the ewe: A photographic record of the ovarian activity of ewes experiencing normal or abnormal oestrous cycles. *Anim. Reprod. Sci.*, 3: 119-124.

OUTTERIDGE P.M., 1985. *Veterinary immunology*. Academic Press, London.

PANT H.C., DOBSON H., WARD W.R., 1978. Effect of active immunization against oestrogens on plasma gonadotrophins in the ewe and the response to synthetic oestrogen or LH. *J. Reprod. Fert.*, 53: 241-248.

PATHIRAJA N., CARR W.R., FORDYCE M., FORSTER J., LAND R. B., MORRIS B. A., 1984. Concentration of gonadotrophins in the plasma of sheep given gonadal steroid antisera to raise ovulation rate. *J. Reprod. Fert.*, 72: 93-100.

PETERSON A.J., FAIRCLOUGH R.J., SMITH J.F., TERVIT H.R., MOORE L.G., WATKINS W.B., 1986. Administration of progesterone early in the oestrous cycle causes premature release of PGFM and oxytocin-neurophysin. *Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol.*, 18: 83.

QUIRKE J.F., 1985. Immunophysiological regulation of animal production. *Livest. Prod. Sci.*, 13: 1-2.

QUIRKE J.F., BRADFORD G.E., FAMULA T.R., TORRELL D.T., 1985. Ovulation rate in sheep selected for weaning weight or litter size. *J. Anim. Sci.*, 61 (6): 1421-1430.

QUIRKE J.F., HANRAHAN J. P., TAIT A. J., KILPATRICK M.J., 1986. Effects of active immunization against androstenedione on ovulation rate and fecundity in galway and finnish landrace sheep. *Livest. Prod. Sci.*, 15: 27-37.

RAWLINGS N.C., JEFFCOATE I.A., RIEGER D.L., 1984. The influence of estradiol-17 $\beta$  and progesterone on peripheral serum concentrations of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in the ovariectomized ewe. *Theriogenology*, 22 (5) : 473-488.

RHIND S.M., 1987. A note on the reproductive performance of ewes of different genotypes following active immunization against androstenedione. *Anim. Prod.*, 44: 326-329.

RHIND S.M., McNEILLY A.S., 1986. Follicle populations, ovulation rates and plasma profiles of LH, FSH and prolactin in scottish blackface ewes in high and low levels of body condition. *Anim. Reprod. Sci.*, 10: 105-115.

RHIND S.M., GUNN R.G., MORRIS B.A., CLAYTON J., LESLIE I.D., GITTUS G., 1985a. Effect of passive immunization against testosterone on the reproductive performance of scottish blackface ewes in different levels of body condition at mating. *Anim. Prod.*, 41: 97-102.

RHIND S.M., LESLIE I.D., GUNN R.G., DONEY J.M., 1985b. Plasma FSH, LH, prolactin and progesterone profiles of cheviot ewes with different levels of intake before and after mating, and associated effects on reproductive performance. *Anim. Reprod. Sci.*, 8: 301-313.

RHIND S.M., LESLIE I.D., GUNN R.G., DONEY J.M., 1986a. Effects of high levels of body condition and food intake on plasma follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, prolactin and progesterone profiles around mating in greyface ewes. *Anim. Prod.*, 43: 101-107.

RHIND S.M., MORRIS B.A., CLAYTON J., DONEY J.M., GUNN R.G., LESLIE I.D., 1986b. Effect of active or passive immunization against steroids on reproductive performance of ewes in different levels of body condition at mating. *Anim. Prod.*, 45: 285-292.

RHIND S.M., MORRIS B.A., CLAYTON J., GITTUS G., 1987a. Effect of level of food intake at mating on the reproductive performance of ewes passively immunized against testosterone. *Anim. Prod.*, 45: 81-85.

RHIND S.M., MORRIS B.A., CLAYTON J., GUNN R.G., GITTUS G., LESLIE I.D., 1987b. Effect of passive immunization with different doses of anti-testosterone antiserum on the reproductive performance of scottish blackface ewes of different levels of body condition at mating. *Anim. Prod.*, 44: 125-131.

ROBINSON J.J., 1986. Nutrition and embryo loss in farm animals. En: *Embryonic mortality in farm animals*. Sreenan J.M. & Diskin M.G. (Eds.), Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht-Boston-Lancaster, pp. 235-248.

ROBINSON T.J., SCARAMUZZI R.J., 1986. Immunization against androstenedione and out-of-season breeding in sheep. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.*, 16: 323-326.

RODBARD D., 1971. Statistical aspects of radioimmunoassays. En: *Principles of competitive protein-binding assays*. Odell W.D. & Daughaday W.H. (Eds.), J.B. Lippincott Company, Philadelphia & Toronto, pp. 204-216.

RODBARD D., 1974. Statistical quality control and routine data processing for radioimmunoassay and immunoradiometric assays. *Clin. Chem.*, 20(10): 1255-1270.

- ROITT I.M., 1979. Essential immunology. Blackwell Scientific Publications, Oxford-London-Edinburgh-Melbourne. 3rd. ed.
- RUSSEL A.J.F., DONEY J.M., GUNN R.G., 1969. Subjective assessment of body fat in live sheep. *J. Agric. Sci. Camb.*, 72: 451-454.
- SCARAMUZZI R.J., 1984. Changes in pituitary-ovarian functions in ewes immune to steroid hormones. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.*, 15: 191-194.
- SCARAMUZZI R.J., RADFORD H.M., 1983. Factors regulating ovulation rate in the ewe. *J. Reprod. Fert.*, 69:353-367.
- SCARAMUZZI R.J., HOSKINSON R.M., 1984. Active immunization against steroid hormones for increasing fecundity. En: *Immunological aspects of reproduction in mammals*. Crichton D.B. (Ed.), Butterworths, London, pp. 445-473.
- SCARAMUZZI R.J., CORKER C. S., YOUNG G., BAIRD D.T., 1975. Production of antisera to steroid hormones in sheep. En: *Steroid Immunoassay*. Cameron E.H.D., Hillier S.G., Griffiths R. (Eds.), Alpha Omega Pub. Ltd. Cardiff (U.K.), pp. 111-122.
- SCARAMUZZI R. J., DAVIDSON W.G., VAN LOOK P.F.A., 1977. Increasing ovulation rate in sheep by active immunisation against an ovarian steroid androstenedione. *Nature*, 269: 817-818.
- SCARAMUZZI R. J., BAIRD D. T., CLARKE I. J., MARTENSZ N. D., VAN LOOK P. F. A., 1980a. Ovarian morphology and the concentration of steroids during the oestrous cycle of sheep actively immunized against androstenedione. *J. Reprod. Fert.*, 58: 27-35.
- SCARAMUZZI R. J., MARTENSZ N. D., VAN LOOK P. F. A., 1980b. Ovarian morphology and the concentration of steroids, and of gonadotrophins during the breeding season in ewes actively immunized against oestradiol-17 $\beta$  or oestrone. *J. Reprod. Fert.*, 59: 303-310.
- SCARAMUZZI R. J., BAIRD D. T., MARTENSZ N. D., TURNBULL K. E., VAN LOOK P.F.A., 1981. Ovarian function in the ewe after active immunization against testosterone. *J. Reprod. Fert.*, 61: 19.
- SCARAMUZZI R. J., CAMPBELL B. K., COGNIE Y., DOWNING J. A., 1987. Increasing prolificacy of ewes by means of gonadotrophin therapy and treatment with Fecundin. En: *New techniques in sheep production*. Favez I., Marat M., Owen J.B. (Eds.), Butterworths, London, pp. 47-56.
- SCOBIE G.M., BIRCHAM J.S., 1985. Does immunisation pay?. *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.*, 45: 193-196.
- SCOTT T.W., 1984. Application of immunization techniques to improve livestock productivity. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.*, 15: 182-185.
- SIMPSON E., 1984. The cellular basis of the immune response. En: *Immunological aspects of reproduction in mammals*. Crichton D.B. (Ed.), Butterworths, London, pp. 1-11.
- SMITH J.F., 1985. Immunisation of ewes against steroids: A review. *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.*, 45: 171-177.
- SMITH J.F., MCGOWAN L.T., 1986. The effect of dose level of steroid immunogen on the reproductive performance of ewes. *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.*, 46: 165-169.
- SMITH J.F., COX R.I., MCGOWAN L.T., WILSON P.A., HOSKINSON R.M., 1981. Increasing the ovulation rate in ewes by immunisation. *Proc. N.Z. Soc. Anim. Prod.*, 41: 193-197.
- SMITH J.F., JAGUSCH K.T., FARQUHAR P.A., 1983. The effect of the duration and timing of flushing on the ovulation rate of ewes. *Proc. N.Z. Soc. Anim. Prod.*, 43: 13-16.
- SMITH J.F., MACLEAN K.S., MCGOWAN L.T., POTTS I.R., 1984. Reproductive performance of ewe offspring from ewes immunised against steroid hormones. *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.*, 44: 25-28.
- SMITH J.F., MCGOWAN L.T., MACLEAN K.S., 1985a. Sheep increased lambing through immunisation. *Research Results*. New Zealand Ministry of Agriculture and Fisheries, Aglink FPP 520:1/3000/3/85.
- SMITH J.F., MACLEAN K.S., MCGOWAN L.T., POTTS I. R., 1985b. Effect of ewe live weight on the level of response to steroid immunisation. *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.*, 45: 184-187.
- SMITH J.F., SCOBIE G.M., MACLEAN K.S., 1985c. Sheep increased lambing through immunisation. *Technique, economics and recommendations*. New Zealand Ministry of Agriculture and Fisheries, Aglink FPP 521:1/3000/3/85.
- SMITH J.F., MCGOWAN L.T., DUGANZICH D.M., PARTON G.A., SHANLEY R., PETERSON A.J., 1986. Effect of immunisation, nutrition and breed on basal levels of plasma FSH, androstenedione. *Combined Societies Meeting*, May 20-23, Dunedin, E-18.

SNEDECOR G.W., COCHRAN W.G., 1967. *Statistical Methods*. Iowa State University Press, Ames, Iowa, U.S.A.

SOKAL R.R., ROHLF F.J., 1979. *Biometría; principios y métodos estadísticos en la investigación biológica*. H. Blume (Ed.), Madrid.

SPENCER G.S.G., HALLETT K.G., FADLALLA A.M., 1985. A novel approach to growth promotion using autoimmunization against somatostatin. III. Effects in a commercial breed of sheep. *Livest. Prod. Sci.*, 13: 43-52.

STANKOV B., KANCHEV L., 1984. Plasma concentrations of testosterone, androstenedione, progesterone, oestradiol-17 $\beta$ , LH and FSH during the preovulatory period in the ewe. *Anim. Reprod. Sci.*, 7: 521-529.

TERQUI M., 1978. Contribution a l'étude des oestrogènes chez la brebis et la truie. Thèse de doctorat d'état ès-Sciences naturelles, Université Paris VI, (France).

THATCHER W.W., KNICKERBOCKER J.J., BARTOL F.F., BAZER F.W., ROBERTS R.M., DROST M., 1985. Maternal recognition of pregnancy in relation to the survival of transferred embryos: Endocrine aspects. *Theriogenology*, 23(1): 129-143.

THOMAS G.B., OLDHAM C.M., MARTIN G.B., 1984. Frequency of luteinizing hormone release in Merino ewes with one and two ovulations. En: *Reproduction in sheep*. Lindsay, D.R. & Pearce D.T. (Eds.), Australian Academy of Science, Canberra, pp. 102-104.

THOMPSON K.F., CROSBIE S.F., KELLY R.W., McEWAN J.C., 1985. The effect of liveweight and liveweight change on ewe ovulation rate at 3 successive oestrous cycles. *N.Z.J. Agric. Res.*, 28: 457-462.

TURNBULL K.E., BRADEN A.W.H., MATTNER P.E., 1977. The pattern of follicular growth and atresia in the ovine ovary. *Aust. J. Biol. Sci.*, 30: 229-241.

UKRAINCİK K., PIKNOSH W., 1981. Microprocessor-based radioimmunoassay data analysis. *Meth. Enzym.*, 74: 497-508.

VALLS ORTI Z.M., COGNIE Y., VALDEMORO M. D., HALLAUER J., 1977. El cruce Romanov y Finés con la Rasa Aragonesa. Resultados preliminares sobre el engorde y la reproducción. *ITEA*, 26: 25.

WEBB R., ENGLAND B.G., 1982a. Identification of the ovulatory follicle in the ewe: Associated changes in follicular size, thecal and granulosa cell luteinizing

hormone receptors, antral fluid steroids, and circulating hormones during the preovulatory period. *Endocrinology*, 110: 873-881.

WEBB R., ENGLAND B.G., 1982b. Relationship between LH receptor concentrations in thecal and granulosa cells and *in vivo* and *in vitro* steroid secretion by ovine follicles during the preovulatory period. *J. Reprod. Fert.*, 66: 169-180.

WEBB R., LAND R.B., PATHIRAJA N., MORRIS B.A., 1984. Passive immunization against steroid hormones in the female. En: *Immunological aspects of reproduction in mammals*. Crighton D.B., Butterworths, London, pp. 475-499.

WILLIAMS M.R., HALLIDAY R., 1978. The role of colostrum antibodies and the significance of antigenic competition in young lambs. *Ann. Rech. Vét.*, 9: 327-333.

WILMUT I., ASHWORTH C.J., SALES D.I., 1986. The influence of progesterone profile on embryo survival in ewes. En: *Embryonic mortality in farm animals*, Sreenan & Diskin (Eds.), Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht-Boston/Lancaster, pp. 135-141.

WILSON P.A., COX R.I., WASTIE C.J., 1984. Antibody levels in the ewe and its progeny following steroid immunization. *Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol.*, 16: 74.

WINTERBERGER-TORRES S., SEVELLEC C., 1987. Atlas du développement embryonnaire précoce chez les ovins. INRA, Paris.

## **11. GLOSARIO DE TERMINOS Y DEFINICIONES**

## 11. GLOSARIO DE TERMINOS Y DEFINICIONES

A lo largo del texto se han utilizado las siguientes siglas:

- AD: Androstenodiona (4-Androsteno-3, 17-diona).
- ANOVA: Análisis de la Varianza.
- BSA: Albúmina sérica bovina.
- Ci: Curie ( 1 Ci = 2.220.000 DPM).
- CPM: Cuentas por minuto.
- C.V.: Coeficiente de variación.
- Ch: Colesterol (5(6-Colesten-3 $\beta$ -ol).
- D.E.: Desviación estándar.
- DEAE-dextrano: Dietil-aminoetil-dextrano.
- DHA: Dehidroepiandrosterona (5(6)-Androsten-3 $\beta$ -ol-17-ona).
- DPM: Desintegraciones (reales ) por minuto.
- E1: Estrona (1, 3, 5(10)-Estratrien-3-ol-17-ona).
- E2: 17 $\beta$ -estradiol ( 1, 3, 5(10)-Estratrieno-3, 17 $\beta$ -diol).
- E.R.: Embriones recuperados.
- E.V.: Embriones viables.
- FCA: Coadyuvante de Freund completo.
- FGA: Acetato de fluorogestona (17 $\alpha$ -acetoxi-9-fluoro-11 $\beta$ -hidroxi-progesterona).
- FGI: Inhibidor del crecimiento folicular.
- FIA: Coadyuvante de Freund incompleto.
- FIV: Fecundación *in vitro*.
- FPOM: Fallo parcial de las ovulaciones múltiples.
- FSH: Hormona foliculoestimulante.
- $\gamma$ G: Gama-globulina.
- G.L.: Grados de libertad.
- GnRH: Factor de liberación de las gonadotropinas.
- hCG: Gonadotropina coriónica humana.

HSA:	Albúmina sérica humana.
I.M.:	Intramuscular.
I.V.:	Intravenosa.
KLH:	Hemocianina.
LH:	Hormona luteótrofa.
ML:	Masa ligada.
N.S.:	No significativo.
P:	Progesterona (4-Pregнено-3, 20-diona).
17P:	17 $\alpha$ -hidroxi-progesterona (4-Pregnen-17 $\alpha$ -ol-3, 20-diona).
PBS:	Tampón fosfato en suero fisiológico.
Pe:	Pregnenolona (5(6)-Pregнено-3 $\beta$ -ol-20-ona).
17Pe:	17 $\alpha$ -hidroxi-pregnenolona (5(6)-Pregнено-3 $\beta$ , 17 $\alpha$ -diol-20-ona).
PMSG:	Gonadotropina sérica de yegua gestante.
POPOP:	1,4-bis(5-fenil-oxazolil)-benceno.
PPO:	2, 5-difeniloxazol.
RIA:	Radioinmunoanálisis.
S.C.:	Subcutáneo/a
T:	Testosterona (4-Androsten-17 $\beta$ -diol-20-ona)...
T.O.:	Tasa de ovulación (número de cuerpos lúteos observados/número de ovejas que ovulan).
Tritón X-100:	Eter mono-p (1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenílico del polietilenglicol.

## DEFINICIONES

**Prolificidad:** Número de corderos nacidos vivos o muertos/número de ovejas que paren.

**Fertilidad:** Número de ovejas que paren/número de ovejas presentes.

**Fecundidad:** Número de corderos nacidos vivos o muertos/número de ovejas presentes (prolificidad x fertilidad).

**Pérdidas reproductivas parciales:**  $(e + 2f + h) \times 100$ /número total de ovulaciones.

**Pérdidas reproductivas completas:**  $(a + 2b + 3c) \times 100$ /número total de ovulaciones.

**Pérdidas reproductivas totales:** suma de los anteriores.

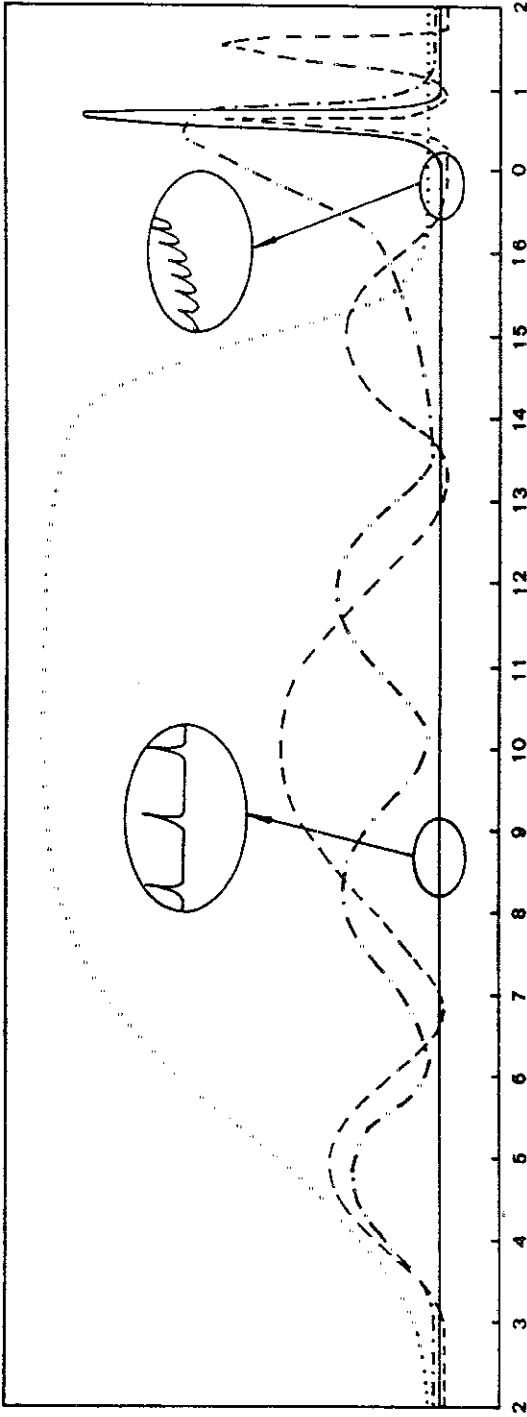
**FPOM:** Fallo parcial de las ovulaciones múltiples:  $(e + 2f + h) \times 100$ /número total de ovulaciones múltiples entre las ovejas que paren, siendo:

- a, b y c, el número de ovejas que no paren, de tasa de ovulación 1, 2 y 3, respectivamente;
- e y f, el número de ovejas que paren un cordero, cuya tasa de ovulación es 2 y 3, respectivamente;
- h, el número de ovejas que paren 2 corderos, cuya tasa de ovulación es 3.

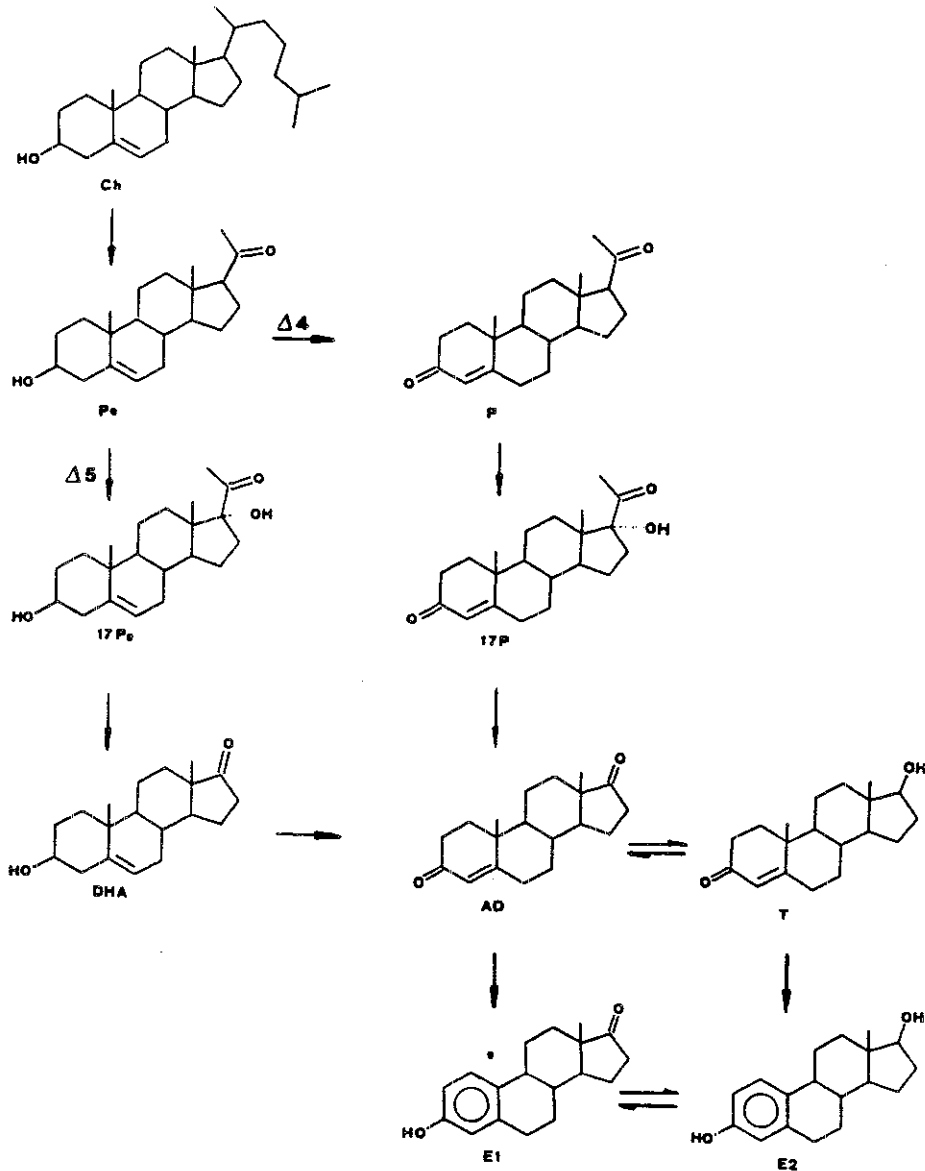
## **12. ANEJOS**

### ANEJO 1

Perfiles idealizados de las hormonas fundamentales en la regulación del ciclo sexual: (.....) progesterona; (-----) FSH; (-.-.-.-.-) 17 $\beta$ -estradiol; (————) LH: El gráfico no está hecho a escala y las fluctuaciones de 17 $\beta$ -estradiol presentan gran variabilidad individual. (Adaptado de HARESIGN, 1985)

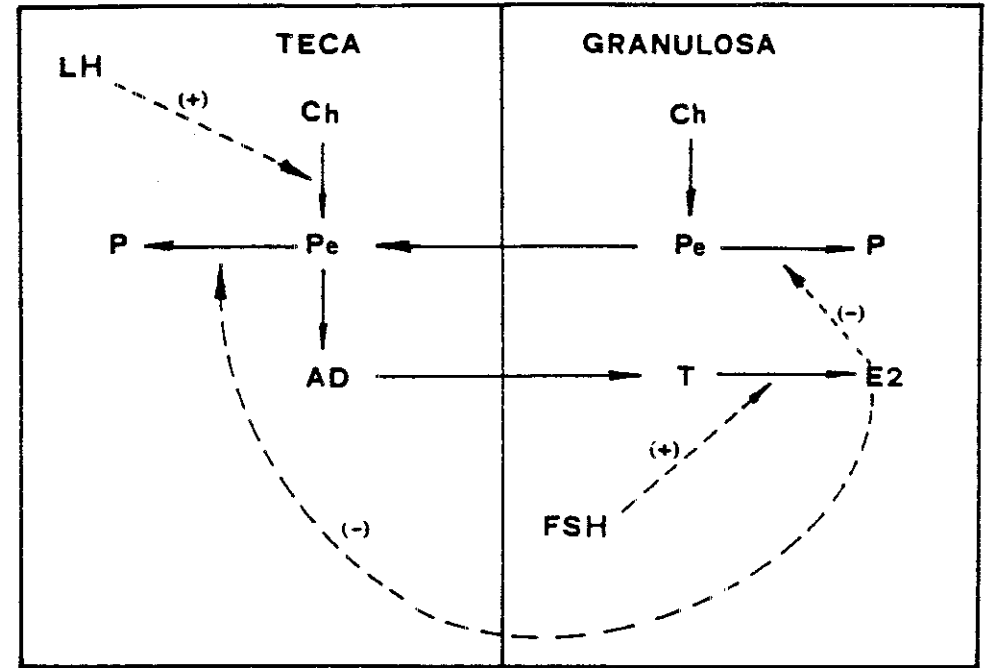


**ANEJO 2.**  
Rutas metabólicas de los principales esteroides ováricos (Ver glosario de términos). Se muestran las dos vías de síntesis ( $\Delta 4$  y  $\Delta 5$ ).



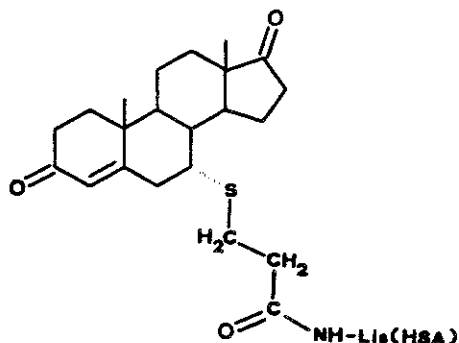
**ANEJO 3**

Modelo propuesto para la síntesis folicular de 17 $\beta$  estradiol. Las flechas discontinuas indican el feed-back positivo o negativo de las hormonas. Sólo se ha representado la vía  $\Delta 5$  para una mayor claridad. (Adaptado de HANSEL y CONVEY, 1983)



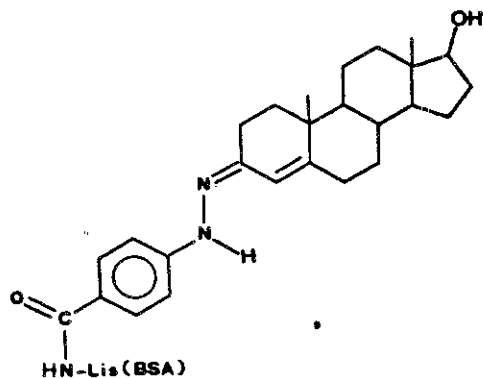
#### ANEJO 4

Conjugado inmunogénico utilizado en este trabajo para inducir la formación de anticuerpos anti-androstenodiona. (Andostrenodiona-7 $\alpha$ -carboxietil-tioéter: HSA).



#### ANEJO 5

Conjugado inmunogénico utilizado en este trabajo para inducir la formación de anticuerpos anti-testosterona. (Testosterona-3-p-hidrazinobenzoil-BSA).



#### ANEJO 6 Listado del programa DIPIEM

```

10 REM * STORE "DIPIEM"
20 PRINTER IS 704,70
30 CLEAR & OPTION BASE 1
40 DIM H1(20),C(20),T*#960
50 DIM E1(20)
60 DISP "TITULO DE LA EXPERIENCIA          (max. 96 caracteres)";5 INPUT
T*
70 DISP "Numero de patrones de extincion";5 INPUT N
80 REDIM H1(N),C(N),E1(N)
90 DISP "DPM de los patrones, periodo y tiempo pasado";5 INPUT Q,T1,T
2
100 DISP "Ruido de fondo";5 INPUT B
110 PRINT T*
120 PRINT
121 PRINT "DPM DE LOS PATRONES DE EXTINCION : ";Q
122 PRINT "PERIODO DE SEMIDEGINTEGRACION DEL ISOTOPO: ";T1
123 PRINT "TIEMPO TRANSCURRIDO: ";T2
124 PRINT
130 PRINT "Patron      H      Eficiencia      CPM"
140 Q1=Q*EXP(-T2/(T1/LOG(2)))
150 FOR I=1 TO N
160 DISP "Valores de H y CPM de los patrones de extincion";5 INPUT H1(I),C1(I)
170 E1(I)=(C1(I)-B)*100/Q1
180 PRINT USING "X,3D,4X,3D,7X,3D.2D, 7X,8D " ; I,H1(I),E1(I),C1(I)
190 NEXT I
200 PRINT
210 PRINT
220 PRINT
230 PRINT "MUESTRA      H      CPM-B      EFICIENCIA      CPM
DPM"
240 M=0
250 DISP "Valores de H y CPM de la muestra";5 INPUT H,C1
260 M=M+1
270 E=0
280 FOR K=1 TO N
290 P=1
300 FOR I=1 TO N
310 IF I=K THEN 330
320 P=P*(H-H1(I))/(H1(K)-H1(I))
330 NEXT I
340 P=P*E1(K)
350 E=E+P
360 NEXT K
370 D=(C1-B)*100/E
380 PRINT USING "2X,3D,4X,4D,2X,7D,3X,6D.2D,7X,7D,7X,7D " ; M,H,C1-B,E
,C1,D
390 GOTO 250
400 END

```

**ANEJO 7**  
Típica salida de ordenador del programa DIPIEM

DPM DE LOS TOTALES FECHA 10/9/87

DPM DE LOS PATRONES DE EXTINCIÓN : 24035  
PERIODO DE SEMIDESINTEGRACION DEL ISOTOPO: 4478  
TIEMPO TRANSCURRIDO: 343

Patron	H	Eficiencia	CPM
1	320	29.98	6853
2	189	22.24	5088
3	139	18.54	4244

MUESTRA	H	CPM-B	EFICIENCIA	CPM	DPM
1	213	4725	23.87	4744	19794
2	207	4877	23.47	4896	20778
3	190	4652	22.31	4671	20852
4	196	4610	22.73	4629	20286
5	189	4417	22.24	4436	19861
6	256	4935	26.55	4954	18584
7	244	4838	25.84	4857	18725
8	218	4799	24.20	4818	19832
9	259	4880	26.73	4899	18256
10	251	4843	26.26	4862	18444
11	175	4042	21.24	4061	19026
12	159	3888	20.07	3907	19374
13	169	3949	20.81	3968	18978
14	153	3832	19.62	3871	19638
15	177	4208	21.39	4227	19674
16	170	3966	20.88	3985	18993
17	182	4100	21.75	4119	18854
18	196	4180	22.73	4199	18393
19	198	4382	22.86	4401	19167
20	182	4263	21.75	4282	19603

**ANEJO 8**  
Listado del programa DOSTIF

```

10 REM STORE 'DOSTIF', 4/7/87
20 OPEN 'DOSTIF.SAL' FOR OUTPUT AS FILE #1
30 DIM T1(99), U1(8), U2(8), Z7(12), D(20), B(20,7), L1(20,7), L2(20,7), U(20,7), S0(10), S3(10), S4(10)
40 DIM B0(10), T2(10), B7(10), B1(10), U1(10), U1(10), U3(10), U2(10), T4(10), T0(30)
50 DIM B0(2)
60 FOR I=1 TO 30
70 READ T0(I)
80 NEXT I
90 REM 'DISP 'TITULO DE LA EXPERIENCIA';@ INPUT T1@
100 INPUT T1@
110 REM DISP 'OPCION 1:TITULO;OPCION 2:RIA-ELISA';@INPUT B@
120 INPUT B@
130 IF B@=2 THEN 170
140 REM DISP 'NUMERO DE TOTALES,MSB,DILUCIONES Y REPETICIONES';@INPUT N1,N3,N4, N5
150 INPUT N1, N3,N4,N5
160 GO TO 190
170 REM DISP 'NUMERO DE TOTALES,B0,MSB,PATRONES Y DILUCIONES';@INPUT N1,N2,N3, N4,N5
180 INPUT N1,N2,N3,N4,N5
190 REM
200 REM
210 IF B@=1 THEN 230
220 REM
230 T3=0 \ B1=0 \ S1=0 \ Z1=0
240 FOR I=1 TO N1
250 REM DISP 'RESPUESTA DEL TOTAL NUMERO';I;@INPUT T2(I)
260 INPUT T2(I)
270 NEXT I
280 IF B@=1 THEN 330
290 FOR I=1 TO N2
300 REM DISP 'RESPUESTA DEL B0 NUMERO';I;@INPUT B0(I)
310 INPUT B0(I)
320 NEXT I
330 FOR I=1 TO N3
340 REM DISP 'RESPUESTA DEL MSB NUMERO';I;@INPUT S0(I)
350 INPUT S0(I)
360 NEXT I
370 B0='B'
380 FOR I=1 TO N1
390 T3=T3+T2(I)
400 NEXT I
410 T4=T3/N1
420 IF B@=1 THEN 500
430 FOR I=1 TO N2
440 B1=B1+B0(I)
450 Z1=Z1+B0(I)^2
460 NEXT I
470 B2=B1/N2
480 Z2=SQR((Z1-B1^2/N2)/((N2-1)/N2))
490 Z3=Z2-TO((N2-1)/Z2)
500 FOR I=1 TO N4
510 IF B@=1 THEN 550
520 REM DISP 'INTRODUCIR LOS PATRONES DE MENOR CONCENTRACION A MAYOR. CONCENTRACION DEL NUMERO';I;@ INPUT B(I)
530 INPUT B(I)
540 GO TO 560
550 B(I)=10^I
560 FOR J=1 TO N5
570 REM DISP 'RESPUESTA DEL TIPO NUMERO';J;'DEL PATRON O DILUCION NUMERO';I; @INPUT B(I,J)
580 INPUT B(I,J)
590 IF B@=2 THEN 620
600 IF B(I,J)<T4 THEN 670
610 GO TO 640
620 IF B(I,J)<Z2 THEN 670
630 GO TO 640
640 B(I,J)=T4*99/100
650 GO TO 670
660 B(I,J)=Z2*99/100
670 IF I=1 THEN 700
680 IF B(I,J)>B(I,J-1) THEN 700
690 B(I,J)=B(I,J-1)*99/100
700 L2(I,J)=0
710 NEXT J
720 NEXT I
730 B=D*(DVE(I+N4/2))
740 REM DISP 'HAY ALGUN ERROR?(S1=1,N0=2)';@ INPUT B4
750 B4=0
760 IF B4=1 THEN GOSUB 1540
770 IF B0='A' THEN 820
780 FOR I=1 TO N3
790 S1=S1+S0(I)
800 NEXT I

```



```

2410 IF N6=1 THEN 2440
2420 PRINT #1, "MIDRANGE="*(1/N6)^(1/C3)
2430 PRINT #1, "SENSIBILIDAD="*(1/N6*(B2-Z3)/(Z3-A))^(1/C3)
2440 PRINT #1, "h="; H1; " r="; SQR(R8)
2450 IF N6=1 THEN 2470
2460 PRINT #1, "Bo="; B2; " No/T="; N2/T4
2470 PRINT #1, "NSR estandarizada="; A; " NSB="; S2
2480 PRINT #1, "PENDIENTE (C) ="; C3
2490 PRINT #1, "ORDENADA (Lb) ="; -LOG(N6)
2500 PRINT #1, "DESVIACION STANDARD RESIDUAL ="; R5
2510 PRINT #1, "ERROR STANDARD DE Lb="; SQR(1/(N4*N5)*04^2*(05-03^2/(N4*N5)))
2520 PRINT #1, "ERROR STANDARD DE c ="; SQR(05-03^2/(N4*N5))
2530 RETURN
2540 REN ITERACION
2550 K3=0 \ K5=0
2560 GOSUB 2950
2570 R1=R2
2580 R5=R2
2590 A=R3
2600 N6=N5
2610 C3=C
2620 FOR I=1 TO N4
2630 FOR J=1 TO N5
2640 W1(I)=W(I)
2650 V2(I)=V1(I)
2660 L1(I,J)=L2(I,J)
2670 NEXT J
2680 NEXT I
2690 T7=T9
2700 H1=H
2710 A2=A1
2720 R6=R3
2730 FOR K3=5 TO S2 STEP 5
2740 GOSUB 2950
2750 IF K3<=11 THEN 2920
2760 IF K3<=14 THEN 2920
2770 FOR I=1 TO N4
2780 FOR J=1 TO N5
2790 W1(I)=W(I)
2800 V2(I)=V1(I)
2810 L1(I,J)=L2(I,J)
2820 NEXT J
2830 NEXT I
2840 T7=T9
2850 R5=R2
2860 A=R3
2870 N6=N5
2880 C3=C
2890 H1=H
2900 A2=A1
2910 R6=R3
2920 R1=R2
2930 NEXT K3
2940 RETURN
2950 REN REGRESION
2960 O1=0 \ O2=0 \ T9=0 \ S5=0 \ T6=0 \ L2=0 \ L3=0 \ K2=0 \ K3=0 \ M4=0 \ O6=0
2970 FOR I=1 TO N4
2980 S3(I)=0 \ S4(I)=0 \ W1(I)=0 \ V1(I)=0 \ W(I)=0
2990 FOR J=1 TO N5
3000 IF K3=0(I,J) THEN 2940
3010 IF N6=1 THEN 3040
3020 U(I,J)=(W(I,J)-K3)/(O2-K3)
3030 GO TO 3050
3040 U(I,J)=(W(I,J)-K3)/T4
3050 S3(I)=S3(I)+U(I,J)
3060 S4(I)=S4(I)+U(I,J)^2
3070 NEXT J
3080 W1(I)=S3(I)/N5
3090 V1(I)=S4(I)/(N5-1)-NSA*W1(I)^2/(N5-1)
3100 S5=S5+LOG(W1(I))*LOG(V1(I))
3110 O1=O1+LOG(W1(I))
3120 T6=T6+LOG(W1(I))^2
3130 O2=O2+LOG(V1(I))
3140 O6=O6+LOG(V1(I))^2
3150 NEXT I
3160 H=(N4*SS-O2*A01)/(N4*A16-O1^2)
3170 A1=EXP((O2*A16-O1*SS)/(N4*A16-O1^2))
3180 K3=(S5-O1*A02/N4)^2/((T6-O1^2/N4)*A(O6-O2^2/N4))
3190 FOR I=1 TO N4

```

```

3210 FOR J=1 TO N5
3220 T9=T9+W(I)
3230 L2(I,J)=-LOG(U(I,J))/(1-U(I,J))
3240 L3=L2(I,J)*W(I)
3250 L3=L3+W(I)*L2(I,J)^2
3260 O1=LOG(O(I))
3270 R2=R2+W(I)
3280 K3=K3+W(I)*A01^2
3290 O4=O4+W(I)*L2(I,J)*W(I)
3300 NEXT J
3310 NEXT I
3320 B5=EXP((L2*A03-O2*A04)/(T9*A03-O2^2))
3330 C=(T9*A04-L2*A02)/(T9*A03-O2^2)
3340 R2=(O4-L2*A02/T9)^2/((O3-O2^2/T9)*A(L3-L2^2/T9))
3350 RETURN
3360 REN DATOS DE LA T DE STUDENT
3370 DATA 12.706, 4.303, 3.182, 2.776, 2.571, 2.447, 2.365, 2.306, 2.262, 2.228, 2.201, 2.179, 2.16, 2.145
3380 DATA 2.131, 2.12, 2.11, 2.101, 2.093, 2.086, 2.08, 2.07, 2.069, 2.064, 2.06, 2.056, 2.052, 2.048, 2.045
3390 DATA 2.042
3400 END

```