

Andrés Buffoni Perazzo

Efecto de los implantes de melatonina sobre los rendimientos en la obtención de embriones in vivo, la calidad seminal y la actividad reproductiva de ovinos en la región patagónica argentina

Departamento
Producción Animal y Ciencia de los Alimentos

Director/es
Abecia Martínez, José Alfonso

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

Tesis Doctoral

EFFECTO DE LOS IMPLANTES DE MELATONINA
SOBRE LOS RENDIMIENTOS EN LA OBTENCIÓN
DE EMBRIONES IN VIVO, LA CALIDAD SEMINAL Y
LA ACTIVIDAD REPRODUCTIVA DE OVINOS EN LA
REGIÓN PATAGÓNICA ARGENTINA

Autor

Andrés Buffoni Perazzo

Director/es

Abecia Martínez, José Alfonso

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Producción Animal y Ciencia de los Alimentos

2013

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria



Universidad
Zaragoza



TESIS DOCTORAL

*EFECTO DE LOS IMPLANTES DE MELATONINA
SOBRE LOS RENDIMIENTOS EN LA OBTENCION DE
EMBRIONES in vivo, LA CALIDAD SEMINAL Y LA
ACTIVIDAD REPRODUCTIVA DE OVINOS EN LA
REGION PATAGONICA ARGENTINA*

**Memoria presentada por el médico veterinario Andrés Buffoni
para optar al grado de Doctor en Veterinaria**

Zaragoza, 2013

El presente trabajo de tesis se presenta como requisito para la obtención del título de Doctor en Veterinaria.

El autor ha disfrutado de una **beca doctoral** del programa de postgrado del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria con Resolución N°: 903/07



Departamento de
Producción Animal
y Ciencia de los Alimentos
Universidad Zaragoza

José Alfonso Abecia Martínez, director del trabajo de Tesis Doctoral de **Andrés Buffoni** que lleva por título “*EFEECTO DE LOS IMPLANTES DE MELATONINA SOBRE LOS RENDIMIENTOS EN LA OBTENCION DE EMBRIONES IN VIVO, LA CALIDAD SEMINAL Y LA ACTIVIDAD REPRODUCTIVA DE OVINOS EN LA REGION PATAGONICA ARGENTINA*”, considera que dicho trabajo cumple con los requisitos necesarios para que pueda ser presentado con el objetivo de optar al Grado de Doctor en Veterinaria. El proyecto de tesis fue aprobado con fecha 10 de febrero de 2010.

Zaragoza, a 27 de abril de 2013

*Fdo: .José Alfonso Abecia Martínez
Director de Tesis*

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, por aceptar y autorizar mi solicitud de post-grado, otorgando una beca para poder realizarlo, en constante apoyo de sus técnicos para su formación y desarrollo.

Gracias al laboratorio CEVA Salud Animal Barcelona por el aporte del material bajo estudio.

Al Dr. Fernando Forcada Miranda, director del Departamento de Producción Animal y Ciencias de los Alimentos de la facultad de Veterinaria de Zaragoza, por permitirme ser parte del grupo de trabajo durante mi estancia en Zaragoza y aceptarme para realizar mi tesis doctoral, Muchas Gracias!

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento a mi director de tesis, Dr. Alfonso Abecia Martínez por su contribución científica y guía en este proceso de aprendizaje. Pero por sobre todo por su apoyo incondicional y ánimo inagotable, siempre presente con sus palabras de aliento y por tu infinita paciencia y la calidad humana tanto en lo profesional como en lo personal, muchas... muchas Gracias Alfonso!

Al grupo de Biotecnología de la Reproducción de la Estación Experimental INTA-Balcarce, a los Dres. Nicolás Mucci, Germán Kaiser, Glenda Rios, Jorgelina Manes, Alba Ledesma y particularmente a Dr. Federico Hozbor por su incansable apoyo, siempre con la mejor onda, con la innata condición que tenes de enseñar, esperando mantener siempre el vínculo laboral y de amistad para seguir aprendiendo de vos, generando en el ámbito de trabajo siempre tu humor...muy personal...pero ya te saque la ficha!!!...se cuándo es en serio y cuando es en broma... bueno.. eso creo, jeje... para vos Fedé, Muchas Gracias!!

Al grupo de la cátedra de Reproducción Animal de la Facultad de la Plata, especialmente al Dr. Luzbel de la Sota, gracias por el gran gesto de darme un lugar cuando lo necesitaba, me he encontrado con un excelente profesional de aquellos que uno quiere tomar como modelo a seguir, tu calidad científica y humana son reflejo de ello....Muchas Gracias!!

A mis compañeros de trabajo Andrés La Torraca e Ingrid Bain, por estar apoyando con gestión la realización de mi postgrado, a Karina Boronat gracias por estar siempre, por

hacerme las cosas más fáciles, aguante los efedrinados!!! Al Gran Capy (Horacio Bordeira)... que la mitad de esta tesis es tuya, me has dado siempre una enorme ayuda y me alegra que podamos haber encontrado el camino que nos permita crecer juntos. A Martin González, que estás conmigo desde el principio, que hemos compartido las dos caras de la moneda y hemos logrado pulir la mejor cara!! Gracias por tu ayuda y gracias por aceptar el desafío de tomar un trabajo que complementa al mío y ojala podamos crecer en esto...siempre acompañado de tus excelentes mates!! A Dr. Alejandro Vozzi muchas gracias por tu ayuda, por tu tiempos, por tus puntos de vista, fuiste clave e indispensable en todo este proceso de análisis de datos y espero que junto a Martin podamos consolidar nuestro grupo de trabajo y fundamentalmente nuestra amistad. Muchas Gracias!!

A mis padres, Héctor y Graciela!, por la contención en cada momento de mi vida y por decirme las palabras justas en el momento de debilidad rumbo al título de mi profesión, sin dudas soy veterinario gracias a ustedes. Gracias por los valores inculcados, por darme la libertad de soñar mis propios sueños y permitirme volar tras ellos!. Gracias por el apoyo y el amor incondicional que me brindan, saber que cuento con ustedes me da la tranquilidad del paso firme. A mis hermanos: Leandro y Carolina que se fueron lejos pero que siempre están, gracias por aguantarme, a Nico y Sofi besote y gracias por aguantar al Tío!!

Finalmente a vos... Karen D'Agostino mi esposa... hermosa como siempre, no me alcanzan las gracias por todo lo que sos para mí. Cuando iniciamos este proyecto de realizar mi postgrado lo charlamos y me dijiste "vamos...no me importa nada más que estar juntos y que me acompañabas a donde sea" tu amor incondicional es lo que me da fuerzas y ganas de emprender nuevos desafíos...porque tengo la tranquilidad que cuento con vos...porque siempre...cada cosa que hacemos es un proyecto en común.

Y en este camino de formación profesional me diste otro título, el más importante de mi vida...el título de padre, Gracias Gianni por venir a nuestro mundo, es increíble lo feliz que nos haces sentir...Karen.....no me alcanzan las palabras para agradecerte...ahora y siempre, te amo!

RESUMEN

Está demostrado el efecto de la melatonina exógena sobre el desarrollo folicular y la tasa de ovulación, ya que dicha hormona aumenta el número de folículos ovulatorios debido a una disminución del proceso de atresia de los folículos pequeños y medianos presentes en la onda folicular previa a la ovulación. Por tal motivo se consideró que bajo esta premisa, un tratamiento de superovulación para la producción de embriones *in vivo* en ovejas con implantes de melatonina exógena posibilitaría una mayor producción de embriones viables, mejorando la tasa de ovulación. La primera experiencia del experimento 1 se realizó en estación reproductiva utilizando 22 ovejas adultas de raza Dohne Merino, llevándose a cabo entre los meses de febrero y abril de 2010. La segunda experiencia fue durante el anestro reproductivo, utilizando 12 ovejas raza Dohne Merino, entre los meses de septiembre a noviembre. Los animales fueron divididos en 2 lotes homogéneos, el lote M (melatonina) recibió un implante subcutáneo de melatonina de 18 mg (Melovine Ceva Salud Animal, Barcelona, España) por oveja y el lote C (control) no recibió ningún implante. Ambos lotes recibieron un tratamiento de sincronización de celo con esponjas con progestágeno y un tratamiento de superovulación con 8 dosis decrecientes de FSH ovina con un total de 256 mg equivalentes a 12,8 ml por animal. Al día 7 de la extracción de esponjas se realizó la recuperación embrionaria sin detectar diferencias significativas entre tratamientos ni durante la estación reproductiva ni durante el anestro estacional entre los parámetros estudiados. Únicamente se observó, durante la estación reproductiva, un efecto significativo ($p < 0,05$) del tratamiento sobre el momento de manifestación de los celos en relación a la retirada de la esponja, siendo dicho momento posterior en las ovejas que recibieron el tratamiento con implantes de melatonina. Esta diferencia no se evidenció en el ensayo en anestro estacional, siendo los promedios de hora de manifestación de celos similares para ambos grupos. Se pudo observar durante el ensayo en anestro estacional, diferencias significativas ($p < 0,05$) a favor del tratamiento con melatonina en lo que a la obtención de embriones degenerados o muertos se refiere. Nuestros resultados indican que el uso de la melatonina durante el anestro estacional tiene un efecto positivo en corto plazo en la viabilidad de los embriones, lo que resulta en un aumento de las tasas de viabilidad a causa de una disminución significativa en el número de los embriones no viables (degenerados y retardados). En conclusión, y aunque los resultados de nuestro estudio indican que la melatonina exógena puede mejorar la viabilidad de los embriones recolectados en ovejas Dohne Merino después de la superovulación en el periodo de anestro estacional, el tratamiento con melatonina no

mostró beneficios en términos de mejora de tasa de ovulación y de producción de embriones para hembras raza Dohne Merino en la región Patagónica Argentina.

Como en el caso de las hembras, la utilización de implantes de melatonina en machos disminuye el grado de anestro estacional que, aunque en éstos es poco marcado, se refleja en un déficit de las aptitudes reproductivas. No hay información del efecto de los implantes de melatonina en latitudes superiores a 40° en el hemisferio sur, ni en la raza Dohne Merino. Por tal motivo, se realizó una experiencia para evaluar el efecto de la melatonina exógena sobre los parámetros de calidad seminal en muestras de semen fresco y descongelado en moruecos raza Dohne Merino. Se realizaron dos experiencias durante dos años seguidos en anestro estacional con un lote de 20 y 12 moruecos respectivamente, de raza Dohne Merino, divididos en 2 grupos homogéneos: uno de los lotes fue tratado el 1 de septiembre con 3 implantes de melatonina por macho (lote M), siendo el resto el lote no tratado, control (lote C). A partir de la colocación del implante se realizó, en forma quincenal, la toma de datos de peso vivo (PV), condición corporal (CC), circunferencia escrotal y muestra de suero sanguíneo para determinación de testosterona, y a partir de los 30 días de colocado el implante se tomaron muestras semanales de semen para evaluación de calidad seminal. Entre los 60 y los 70 días de colocado el implante se realizó la congelación del semen de cada animal que respondió a la extracción del material, para evaluar la calidad del mismo al descongelado. No se advirtieron diferencias significativas para los parámetros de motilidad masal, concentración espermática y porcentaje de espermatozoides vivos y muertos. El tratamiento no influyó sobre el PV y la CC. La circunferencia escrotal se incrementó de manera significativa ($p < 0,05$) a favor del grupo de animales con implantes de melatonina en ambos años. Tras la colocación de los implantes se apreció un rápido aumento, durante los primeros 15 días, de los niveles de testosterona en el primer ensayo, en ambos grupos, sin generar diferencias estadísticas significativas, para posteriormente mostrar un patrón irregular de ascenso y descenso sin diferencias significativas entre tratamientos. No se observaron diferencias significativas entre tratamientos en motilidad rectilínea progresiva, vigor, porcentajes de espermatozoides vivos y muertos y test de permeabilidad de membrana (Test de Hos) sobre el semen descongelado. Sí se observan diferencias significativas en la evaluación de motilidad espermática total en el primer experimento a favor del grupo control sobre el grupo melatonina de las muestras de semen descongelado, no evidenciándose esta diferencia en los muestreos de semen descongelado del segundo año en estudio. Tampoco se

evidenciaron diferencias significativas en los resultados en la prueba de funcionalidad mitocondrial con rhodamina y clortetraciclina para ambos experimentos. En conclusión, el uso de implantes de melatonina en anestro estacional sobre moruecos raza Dohne Merino en la región Patagónica Argentina logra modificar en forma significativa la circunferencia escrotal sin modificar los parámetros de calidad seminal tanto en muestreos de semen fresco como en semen descongelado. Por último y de acuerdo a lo observado por algunos autores que el tratamiento con melatonina se asocia con una disminución significativa de la proporción de ovejas no cíclicas que responden al efecto macho durante el anestro estacional, y una mejora sustancial de los resultados reproductivos, y sin datos de este tipo de experiencias en Argentina, se plantea evaluar los efectos de la melatonina exógena sobre los índices reproductivos de hembras en anestro estacional bajo un manejo netamente extensivo. Se utilizaron 120 ovejas Merino adultas, divididas en dos grupos homogéneos en lo referente a PV, CC y edad. El grupo M, implantado, estuvo conformado por 60 ovejas a las cuales se les colocó un implante subcutáneo de melatonina de 18 mg el 2 de septiembre de 2010, un mes antes del momento de mayor anestro estacional (octubre). El grupo C, control, estuvo conformado por 60 ovejas y no recibió ningún tipo de tratamiento hormonal. Los primeros días de octubre se introdujeron 15 moruecos adultos raza Dohne Merino para realizar las cubriciones durante 45 días. Llamativamente no hemos tenido resultados para su análisis estadístico durante la elaboración de este experimento. No se detectó ciclicidad ovárica, traducido en falta permanente de celos en ambos lotes en estudio y ausencia total de gestaciones. Es importante destacar que si bien los animales, por la situación de sequía que atraviesa la zona Patagónica desde hace ya varios años, se encontraban en una baja CC y PV, se cree que este factor no es responsable de los resultados obtenidos, observando una mejora del estado nutricional a los 50 días de colocado el implante. En conclusión, los implantes de melatonina en hembras Merino manejadas a campo en forma ultraextensiva en la región Patagónica Argentina no manifestaron respuesta favorable a la presentación de celo complementadas con el tratamiento de efecto macho. Consideramos que hacen falta más estudios, que nos permitan conocer las posibilidades de uso de los implantes de melatonina en un sistema ultra extensivo como el de la región Patagónica Argentina.

SUMMARY

It has been demonstrated that exogenous melatonin has a direct effect on follicular development and ovulation rate, since this hormone increases the number of ovulatory follicles decreasing the process of atresia of small and medium follicles present in the pre-follicular wave ovulation. Under this premise, superovulation treatment for in vivo sheep embryo production with exogenous melatonin implants would allow an increase of the production of viable embryos, improving ovulation rate. The first experience of Experiment 1 was conducted during the breeding season using 22 adult Dohne Merino sheep, between February and April 2010. The second experience was carried out during the reproductive anestrus, using 12 Dohne Merino sheep between September and November 2011. The animals were separated into two homogeneous groups: group M (melatonin) received a subcutaneous implant of 18 mg melatonin and Group C (control) received no implant. Both groups were oestrous synchronized with progestagen sponges and superovulated with 8 oFSH decreasing doses with a total of 256 mg equivalent to 12.8 ml per animal. Seven days after pessary withdrawal, an embryo recovery was performed, with no significant differences between treatments either during the breeding season or during seasonal anestrus for all the parameters studied. We only observed during the breeding season a significant effect ($p < 0.05$) of treatment on the time of manifestation of oestrus in relation to the extraction of the sponge, being later in the treated group. This difference was not evident in the seasonal anestrus experiment, with an average expression of oestrus similar for both groups. Significant differences ($p < 0.05$) for the number of degenerated or dead embryos was observed between groups during the experience in seasonal anestrus. Our results indicate that the use of melatonin during the seasonal anestrus has a short-term effect on embryo viability, resulting in increased viability rates due to a significant decrease in the number of unviable embryos (degenerate and delayed). In conclusion, although the results of our study indicate that exogenous melatonin can improve the viability of embryos collected in Dohne Merino sheep after superovulation in the seasonal anestrus period, treatment with melatonin did not show benefits in terms of ovulation rate and embryo production for Dohne Merino ewes in the Patagonia zone in Argentina.

As in the case of ewes, the use of melatonin implants in rams decreases the effect of the seasonal anestrus, and although this effect is not very marked, it is reflected in a lack of reproductive ability. No information on the effect of melatonin implants at latitudes greater than 40° in the Southern hemisphere, or in Dohne Merino breed, is available. Therefore, an experiment was conducted to evaluate the effect of exogenous melatonin

on semen quality parameters in fresh semen and thawed samples in Dohne Merino rams. Two experiments were conducted for two consecutive years during seasonal anestrus with a group of 20 and 12 rams, respectively, of the Dohne Merino breed. They were divided into two homogeneous groups: one group was treated with 3 melatonin implants (group M) on 1 September, with the remainder group considered as untreated controls (group C). After implant placement was performed, data records of live weight (LW), body condition (BC) and scrotal circumference (SC) were performed every fortnight; serum samples were collected to determinate testosterone levels, and after 30 days of implanting, semen samples for semen quality assessment were taken weekly. Between 60 and 70 days after melatonin insertion, semen of each animal that responded to the extraction of semen was frozen to assess its quality after thawing. No significant differences were found for mass motility parameters, sperm concentration and percentage of live and dead sperm. The treatment had no effect on LW and BC. Scrotal circumference increased significantly ($p < 0.05$) in favor of the implanted animals in both years. A fast increase of testosterone levels in the first trial was observed during the first 15 days after implantation, in both groups, without significant differences. After that, an irregular pattern of rise and fall of the hormone was observed, without differences between treatments. No significant differences were found between treatments for rectilinear progressive motility, vigor, percentage of live and dead sperm, membrane permeability test (Hos Test) on thawed semen. No significant differences were observed after the test with rhodamine and chlortetracycline on mitochondrial functionality. In conclusion, the use of melatonin implants during seasonal anestrus in Dohne Merino rams in the Patagonia zone of Argentina significantly modified scrotal circumference with no changes on semen quality parameters in both samples of fresh and thawed semen.

According to some authors, who observed that the treatment with melatonin is associated with a significant decrease in the proportion of non-cyclic sheep responding to the ram effect during seasonal anestrus, and a substantial improvement in reproductive performances outcomes, and with no evidence of such experiences in Argentina, we proposed to evaluate the effects of exogenous melatonin on the reproductive parameters of ewes during seasonal anestrus under an ultra-extensive farming system. Merino sheep were used ($n=120$), separated into two homogeneous group regarding BW, BC and age. Group M ($n=60$) were implanted with melatonin on 2 September 2010, a month before the peak of seasonal anestrus at this latitude (October).

Group C, control, (n=60) received no hormonal treatment. On early October, 15 Dohne Merino adult rams were introduced to perform the mating for 45 days. Interestingly, we have no results for statistical analysis during the development of this experiment. Ovarian cyclicity was not detected, resulting in a permanent lack of oestrus in both groups under study, and an absence of pregnancies. It is importantly to note that the drought impact for several years in Patagonia, generating low BW and BC, is not responsible for these results, giving rise to an improvement of nutritional status 50 days after placing the implant. In conclusion, melatonin implants in Merino sheep managed under ultra-extensive conditions in the Patagonia region of Argentina showed no favorable response to the presentation of oestrus supplemented with the ram effect. More studies are necessary to provide more evidence of the possibilities of using melatonin implants in this region of Argentina.

INDICE

AGRADECIMIENTOS	7
RESUMEN	11
SUMMARY	17
INDICE DE FIGURAS	29
INDICE DE TABLAS	31
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	33
INTRODUCCIÓN	35
1-EFECTOS DEL FOTOPERIODO EN LA ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA EN OVINOS	35
1.1 Aspectos generales	35
1.2 Mecanismo de acción del fotoperiodo.....	37
1.3 Influencia de la raza	38
1.4 Influencia de la edad	39
1.5 Influencia del género	39
1.6 - Estacionalidad sexual en machos y calidad seminal	39
2-SÍNTESIS, SECRECIÓN Y ACCIÓN DE LA MELATONINA	40
2.1 Mecanismo de síntesis y secreción de la melatonina	40
2.2 Mecanismo de acción de la melatonina.....	43
2.3 Efectos de los implantes subcutáneos de melatonina	44
2.4 Vía de aplicación del implante con melatonina.....	45
2.5 Efecto de los implantes de melatonina en moruecos.....	46
3- DESARROLLO FOLICULAR Y PRODUCCIÓN DE EMBRIONES	48
3.1 Desarrollo folicular	48
3.2- Ondas de desarrollo folicular	50
3.3 Producción de embriones <i>in vivo</i>	51
3.3.1 Tratamiento de sincronización de celo	51
3.3.2 Progestágenos.....	52
3.3.3 Estimulación ovárica	53
3.3.4 La hormona folículo estimulante (FSH).....	54
4-ANÁLISIS DE LA CALIDAD SEMINAL	58
4.1-Color del semen	58
4.2-Motilidad masal	58
4.3-Volumen del semen.....	58
4.4-Concentración espermática	58
4.4.1-Sistemas de análisis de espermatozoides asistidos por ordenador (CASA)	59
4.5 Integridad de membrana.....	62

4.6 Funcionalidad de la membrana plasmática	63
4.7 Pruebas de funcionalidad mitocondrial	64
4.8 Reacción acrosómica.....	65
4.9 Integridad del acrosoma	65
5- DIÁMETRO TESTICULAR	67
6- ANALISIS DE TESTOSTERONA	68
7-CARACTERISTICAS PRODUCTIVAS DE LA REGIÓN PATAGÓNICA ARGENTINA	69
8- RAZA MERINO DOHNE.....	70
OBJETIVOS.....	73
MATERIALES Y METODOS.....	77
EXPERIMENTO 1. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON MELATONINA EXÓGENA SOBRE LA PRODUCCION DE EMBRIONES <i>IN VIVO</i> EN ESTACION REPRODUCTIVA Y EN EL PERIODO DE ANESTRO ESTACIONAL SOBRE OVEJAS DOHNE MERINO.....	79
1.1 Animales	79
1.2 Tratamiento de superovulación	79
1.3 Recuperación de embriones	81
1.4 Análisis estadístico.....	83
EXPERIMENTO 2. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON MELATONINA EXÓGENA A LO LARGO DEL FOTOPERIODO CRECIENTE SOBRE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD SEMINAL DE MORUECOS DE RAZA DOHNE MERINO	85
2.1-Animales y tratamientos	85
2.2-Protocolo experimental.....	85
2.3-Obtención de semen.....	86
2.4-Evaluación de calidad seminal.....	86
2.4.1 Volumen del eyaculado.....	86
2.4.2-Movilidad masal microscópica	87
2.4.3 Concentración espermática (millones de espermatozoides/ml)	87
2.5 Circunferencia escrotal:.....	90
2.6 Peso Vivo y Condición Corporal:	90
2.7 Congelación de semen para evaluación de calidad seminal al descongelado	90
2.8 Análisis del semen descongelado.....	91
2.8.3 Pruebas de funcionalidad espermatica	92

EXPERIMENTO 3.EFECTO DEL TRATAMIENTO CON MELATONINA EXÓGENA A LO LARGO DEL FOTOPERIODO CRECIENTE SOBRE LOS RESULTADOS REPRODUCTIVOS DEOVEJAS RAZA MERINO CON MANEJO NETAMENTE EXTENSIVO.....	99
3.1 Animales y diseño experimental	99
3.2 Análisis estadístico	100
RESULTADOS.....	101
EXPERIMENTO 1.....	103
EXPERIMENTO 2.....	105
EXPERIMENTO 3.....	115
DISCUSIÓN.....	117
EXPERIMENTO 1.....	119
EXPERIMENTO 2.....	123
EXPERIMENTO 3.....	127
CONCLUSIONES.....	129
ANEXO	133
BIBLIOGRAFÍA.....	141

INDICE DE FIGURAS

Nº 1: Representación esquemática de los mecanismos que controlan la síntesis de Melatonina	43
Nº 2: Representación esquemática del crecimiento del oocito, capacitación y maduración durante la foliculogénesis	48
Nº 3: Componentes de los sistemas utilizados en la evaluación computarizada de la motilidad espermática (CASA).....	60
Nº 4: Prueba de endósmosis	64
Nº5: Morueco raza Dohne Merino	71
Nº 6: Esquema del protocolo aplicado para la superovulación de ovejas Dohne Merino.....	80
Nº 7: Aplicación de anestésico.....	81
Nº 8: Incisión para lavado de útero.....	81
Nº 9: Observación de tasa de ovulación.....	82
Nº 10: Búsqueda de embriones.....	82
Nº 11: Momento de extracción de semen.....	86
Nº 12: Tubo colector para determinación de volumen de eyaculado.....	86
Nº13: Cuadrícula de recuento de espermatozoides en cámara de Neubauer.....	88
Nº 14: Tinción de eosina/nigrosina para ver permeabilidad de membrana.....	89
Nº 15: Espermatozoides sometidos a la prueba HOS.....	93
Nº 16: Espermatozoides sometidos a la reacción de Rh 123.....	95
Nº 17: Espermatozoides de carnero congelados/descongelados expuestos a la Prueba de CTC.....	97
Nº 18: Colocación de implante de melatonina.....	99
Nº 19: Manejo Extensivo	99
Nº 20: Evolución de la circunferencia escrotal en ambos experimentos (Año 1; Año2) a partir de los 30 días de la colocación de implantes (día 1) en el grupo melatonina y el grupo control.....	106

Nº 21.: Evolución de las medias de concentración espermática de animales Implantados con Melatonina y Control durante los dos experimentos (Año1;Año 2) en anestro reproductivo.....	108
Nº 22: Evolución de las medias de porcentajes de espermatozoides vivos a través de tinción de eosina-nigrosina de animales implantados con melatonina y control durante los dos experimentos (Año1;Año 2) en anestro reproductivo.....	109
Nº 23: Evolución de las medias de Volumen de eyaculado (ml) de animales implantados con melatonina y control durante los dos experimentos (Año1;Año2) en anestro reproductivo.....	110
Nº 24: Evolución de los niveles de testosterona sobre animales con implantes de melatonina (Melatonina) y en el grupo de animales control (Control) a partir de los 30 días de aplicación del implante durante los dos experimentos en anestro reproductivo.....	112

INDICE DE TABLAS

Nº 1: Efecto del tratamiento repetido con FSH ovina sobre la respuesta ovárica y la producción de embriones en ovejas rasa	55
Nº 2: Comparación de la respuesta ovulatoria y la producción de embriones (medias \pm ES) en ovejas de raza Dohne Merino tratadas o no con melatonina, en estación reproductiva y en anestro estacional.....	104
Nº 3: Resultados de parámetros fenotípicos y reproductivos de calidad seminal (media \pm ES) de dos años consecutivos sobre animales con 3 implantes subcutáneos de melatonina (melatonina) y no implantados (control).....	107
Nº 4: Resultado de valores de testosterona en sangre expresados como (medias \pm ES), valores mínimos y máximo detectables (ng/ml) y coeficiente de variación intra e interensayos para ambos grupos en estudio (melatonina; control) durante los dos experimentos en anestro reproductivo	111
Nº 5: Resultados de evaluaciones de parámetros de funcionalidad espermática (media \pm ES) de ambos ensayos (año 1;año 2) sobre animales con 3 implantes subcutáneos de melatonina (melatonina) y no implantados (control).....	114

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

INTRODUCCIÓN

La disponibilidad de recursos forrajeros para el ganado fluctúa durante el año, condicionando la reproducción en forma estacional en la mayoría de las especies. El objetivo natural es asegurar el nacimiento de las crías en el momento de mayor supervivencia, que es cuando hay mayor aporte de alimento y las temperaturas no son tan bajas.

El factor ambiental que permite conocer con antelación el momento favorable para los nacimientos es la variación estacional de la duración del periodo de iluminación diaria, también conocido como fotoperiodo. Dicha variación determina que los ovinos ubicados en zonas templadas del planeta alternen periodos de actividad reproductiva máxima con otros de actividad sexual mínima.

La productividad de las explotaciones ovinas está limitada en gran medida por esta estacionalidad sexual, al contrario que en otras especies donde casi no existe (bovina, porcina). Dado que la duración de la gestación en ovinos es de 5 meses, la estación reproductiva se inicia tras el solsticio de verano y se extiende de agosto a enero aproximadamente en el hemisferio norte y de enero a agosto en el hemisferio sur, mientras que la estación no reproductiva o anestro estacionario se puede iniciar a partir del solsticio de invierno, dependiendo de la latitud. De esta manera, los nacimientos tienen lugar en los momentos óptimos de recursos forrajeros.

1. EFECTOS DEL FOTOPERIODO EN LA ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA EN OVINOS

1.1 Aspectos generales

La duración de la iluminación natural es un factor repetible año a año, por lo que se cree que el fotoperiodo es el factor principal que determina el inicio y el final de la época reproductiva (Karsch et al., 1984). La estacionalidad sexual es un factor común en todas las razas ovinas ubicadas en las zonas templadas, fuera de los trópicos, que además aumenta con la latitud (Pelletier et al., 1987). Es por ello que se considera que la oveja tiene un ritmo endógeno de reproducción, de manera que el papel de las variaciones anuales del fotoperiodo es la sincronización del citado ritmo a un espacio temporal de un año (Malpaux et al., 1989), alternando a lo largo del mismo periodo de actividad reproductiva y de anestro.

Los ovinos presentan anualmente dos etapas fisiológicas bien definidas (Barrell et al., 1992). Una fase de anestro estacional (días largos), con ausencia de ciclos estrales regulares, receptividad sexual y ovulación, que en el macho se representa por el cese de la espermatogénesis y la libido. La otra etapa fisiológica, conocida como época reproductiva, se caracteriza por la ocurrencia de ciclicidad ovárica y estral, caracterizada por la sucesión a intervalos regulares de 17 días de duración aproximadamente, conducta de celo y ovulación en la hembra; en el macho, se restablece la espermatogénesis y el deseo sexual (Hafez et al., 1952; Malpaux et al., 1997) de manera que los nacimientos ocurren en la época más favorable del año, con abundancia de pastos y temperatura ambiental comfortable.

Como se mencionó anteriormente, el fotoperiodo es el factor ambiental primario que regula estos eventos, por lo que la actividad reproductiva se puede modular alternando periodos de días largos, de 16 horas de luz y 8 de oscuridad o días cortos de 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad constantes, de manera que la exposición a los días cortos induce el inicio de la actividad ovulatoria 40-50 días después del comienzo de la estimulación, mientras que los días largos provocan una inhibición de la misma, que cesa 20-30 días después del comienzo del tratamiento (Karsch et al., 1984).

Aunque también se ha demostrado que el efecto estimulante de los días cortos no es permanente, pues si los animales son expuestos durante largos periodos de tiempo a un régimen fotoperiódico de días cortos cesan su actividad reproductiva, y esto es debido a que se hacen refractarios a los mismos, cesando la actividad ovulatoria a los 120-150 días de exposición (Thimonier, 1989). De igual forma, animales expuestos a días largos de forma constante también acaban volviéndose refractarios a ellos, y son capaces de iniciar su actividad reproductiva a los 6 meses de exposición (Thimonier, 1989).

La misión de los días decrecientes pero largos que tienen lugar desde el solsticio de verano al equinoccio de otoño no es iniciar la estación reproductiva, sino conseguir que ésta tenga una duración normal, demostrando que la distinta función que ejercen las distintas fracciones fotoperiódicas de año natural.

Finalmente, los días cortos que van del equinoccio de otoño al solsticio de invierno tienen como objetivo romper la fotorrefratariedad a los días largos y conseguir que la oveja responda al efecto inhibitorio de los mismos en la primavera siguiente.

La intensidad del papel regulador del fotoperiodo es variable con la latitud, siendo mayor conforme ésta aumenta, con lo que se establecen unas importantes diferencias interraciales que no desaparecen totalmente cuando los genotipos se explotan bajo las

mismas condiciones fotoperiódicas (Poulton y Robinson, 1987). Por tanto y a pesar de que las condiciones fotoperiódicas sean similares, el ritmo endógeno que es propio del animal se expresa independientemente del fotoperiodo prevalente, si bien, su expresión (intensidad de la estacionalidad) es modulada por este último.

1.2 Mecanismo de acción del fotoperiodo

La oveja posee un sistema neurofisiológico capaz de transformar la señal luminosa en una señal hormonal a través de la síntesis de melatonina y de esta manera detecta las variaciones anuales en la duración del fotoperiodo (Williams y Helliwell, 1993). La melatonina, que fue descubierta en 1958 en la Universidad de Yale, Estados Unidos, por A.E.Lerner, es una sustancia natural presente en el organismo de todos los mamíferos y sintetizada en la glándula pineal a partir del triptófano y la serotonina, proceso en el que intervienen enzimas cuya actividad está regulada por la percepción día/noche.

Los niveles plasmáticos de melatonina en la oveja son basales durante el día, de manera que inmediatamente, pasado unos 10 minutos del inicio de la oscuridad, se elevan hasta alcanzar concentraciones entre 100-500 pg/ml. Además, es rápidamente metabolizada en 6-hidroxi-melatonina por el hígado, siendo excretada vía orina en forma sulfatada; por tanto, sus niveles vuelven a ser basales al alba. Los niveles nocturnos son variables entre animales, si bien dentro de un mismo animal se trata de un carácter bastante repetible; dicha variabilidad se basa en diferencias en su síntesis, en general en función del tamaño de la pineal, pero no en su metabolismo (Zarazaga et al., 1998).

Estas características determinan que el perfil de secreción de melatonina en periodos de 24 horas sea largo en invierno y corto en verano, de manera que la evolución de la duración del mismo a lo largo del año informa a la oveja del fotoperiodo prevalente.

Durante la estación sexual, la secreción hipotalámica de GnRH y la consecutiva de LH por parte de la hipófisis determinan los acontecimientos del ciclo sexual. La secreción de LH se encuentra inhibida durante la fase luteal por los elevados niveles de progesterona producida por el cuerpo lúteo (Karsch et al., 1987). Tras la luteolisis, la caída brusca de los niveles plasmáticos de progesterona induce un aumento de la pulsatilidad de GnRH y de LH (Clarke et al., 1987), estimulando la secreción de estradiol en la fase folicular que inicia el pico preovulatorio de GnRH y LH, desencadenándose así la ovulación (Clarke, 1988; Moenter et al., 1991).

El anestro estacionario se produce como consecuencia de un descenso en la actividad del eje hipotálamo-hipofisario, por el cual queda considerablemente reducida la frecuencia de pulsos de GnRH y en consecuencia la secreción de las hormonas hipofisarias (Karsch et al., 1984). La baja frecuencia de pulsos de GnRH-LH, que llega a ser de 1 pulso/12 horas (Barrell et al., 1992), no se debe a una alteración en la capacidad neurosecretora, dado que la ovariectomía conlleva un claro incremento en la pulsatilidad de GnRH durante el periodo de inactividad sexual (Karsch et al., 1987). La presencia de concentraciones basales de estradiol como las de la fase luteal suprimen la secreción pulsátil de GnRH en anestro estacionario y no en estación sexual (Moenter et al., 1990; Barrell et al., 1992, Karsch et al., 1993), confirmando el hecho de que la variación estacional de la frecuencia de pulsos es consecuencia de un cambio de la respuesta hipotalámica a la retroacción negativa del estradiol en función del fotoperiodo prevalente (Karsch et al., 1980; Webster y Haresign, 1983).

1.3 Influencia de la raza

Es bien conocido que las razas que se desenvuelven en latitudes elevadas tienen un anestro más largo y además más profundo. En estos animales, las grandes diferencias de la duración del día entre el verano y el invierno hacen que el fotoperiodo tenga un fuerte protagonismo en la regulación de la estacionalidad, mientras que los factores de manejo (nutrición) o las relaciones sociales (presencia de machos) apenas modifican la misma; al contrario sucede en las razas ubicadas en latitudes medias o bajas. En general, el inicio y el final de la estación reproductiva así como la duración de la misma, son caracteres heredables, con lo que pueden ser utilizados para selección genética, aunque el componente ambiental es también importante, y la estacionalidad de una raza puede modificarse cuando los animales cambian de latitud.

El origen de la raza determina el comportamiento reproductivo estacional; por lo tanto, las razas originarias de latitudes altas, por encima de 35° presentan una marcada estacionalidad reproductiva (Hafez, 1952; Karsch et al., 1984; Robinson et al., 1985; Malpoux et al., 1987) y los ovinos de origen mediterráneo o ecuatorial, expresan estacionalidad reproductiva reducida o inexistente, respectivamente (Forcada et al., 1992; Porras, 1999; Valencia et al., 2006; Arroyo et al., 2007).

1.4 Influencia de la edad

Si bien el ritmo endógeno de secreción de melatonina parece establecerse ya a la cuarta semana de vida de las corderas, lo cierto es que sus requerimientos fotoperiódicos no coinciden con los de ovejas adultas. Así, y además de una exposición previa a días largos en ambos casos para romper la fotorrefractoriedad a días cortos, las corderas necesitan experimentar días cortos para iniciar su actividad reproductiva (Ebling y Foster, 1988), lo que no sucede con las adultas. Además, es bien conocida la fuerte regulación fotoperiódica del inicio de la pubertad, incluso en razas poco estacionales, que determina que para que se inicie la pubertad las corderas deben alcanzar el peso necesario en la estación reproductiva, que corresponde al 60% del peso vivo adulto, mostrando la ineficacia de una sobrealimentación para conseguir el inicio de la actividad reproductiva de las corderas en periodo de anestro (Forcada et al., 1992).

1.5 Influencia del género

Carneros y ovejas no responden de la misma manera a las variaciones estacionales del fotoperiodo. En los primeros, la actividad espermatogénica y el comportamiento sexual no se detienen en el periodo de anestro al contrario de lo que sucede con la mayoría de las ovejas, si bien ambos parámetros varían notablemente con la estación, y tanto la libido como la producción y calidad del semen se resienten notablemente durante el anestro. En conjunto pues, la sensibilidad de los carneros al fotoperiodo es diferente de la de las ovejas, de manera que ante un fotoperiodo favorable su actividad reproductiva se estimula en torno a 1,5 meses antes que en las ovejas al objeto de asegurar la máxima fertilidad de éstas cuando salgan en celo (Forcada et al., 2009)

1.6 Estacionalidad sexual en machos y calidad seminal

En ovinos, la conducta sexual y la calidad del semen son los principales factores que limitan la eficiencia de la reproducción en el macho a lo largo de año. Estos factores pueden variar según la raza (Avdi et. al., 2004), la estación del año (Schanbacher y Lunstra, 1976) y la nutrición (Mukasa-MugerwayEzaz, 1992). Los carneros son reproductores estacionales en los que el fotoperiodo es la señal ambiental principal que controla la actividad reproductiva; teniendo en cuenta esto, hoy sabemos que hay indicadores de la actividad sexual que demuestran cambios de la calidad del semen

(Boland et al., 1985; Karagiannidis et al., 2000), el diámetro testicular (Colas et al., 1986) y el nivel de secreción de la hormona testosterona (Langford et al., 1987).

La calidad del semen, como otras expresiones fenotípicas, sin duda tiene un componente genético, un componente ambiental y una variedad de interacciones entre ambos. El componente genético se piensa que es el más pequeño ya que la heredabilidad de la fertilidad es, por lo general baja (Rollinson, 1955; Foote, 1970). Con baja heredabilidad cualquier variabilidad genética queda eclipsada por los numerosos factores ambientales involucrados.

Es evidente que para producir una buena calidad seminal, un macho debe estar sano y en buen estado nutricional. Las variaciones estacionales en calidad seminal han sido ampliamente estudiadas (Ortavant et al., 1964; Lodge y Salisbury, 1970). No se han observado grandes cambios de calidad seminal cuando los cambios estacionales son pequeños, no obstante, cuando el clima es muy caluroso y húmedo y es inevitable un aumento de la temperatura corporal, el número de espermatozoides en el eyaculado disminuye a menudo acompañado de un descenso en la motilidad y el aumento del porcentaje de espermatozoides anormales. Este en general se ve evidenciado unas pocas semanas después del efecto del medioambiente debido al tiempo requerido para la espermatogénesis.

En ovinos se ha observado que el tamaño testicular aumenta durante la estación reproductiva y disminuye fuera de esta (Colas, 1980) aunque esto puede diferir según las razas (Baril et al., 1993) no advirtiéndose cambios cuando los animales son situados en latitudes bajas (Setchel, 1992).

2. SÍNTESIS, SECRECIÓN Y ACCIÓN DE LA MELATONINA

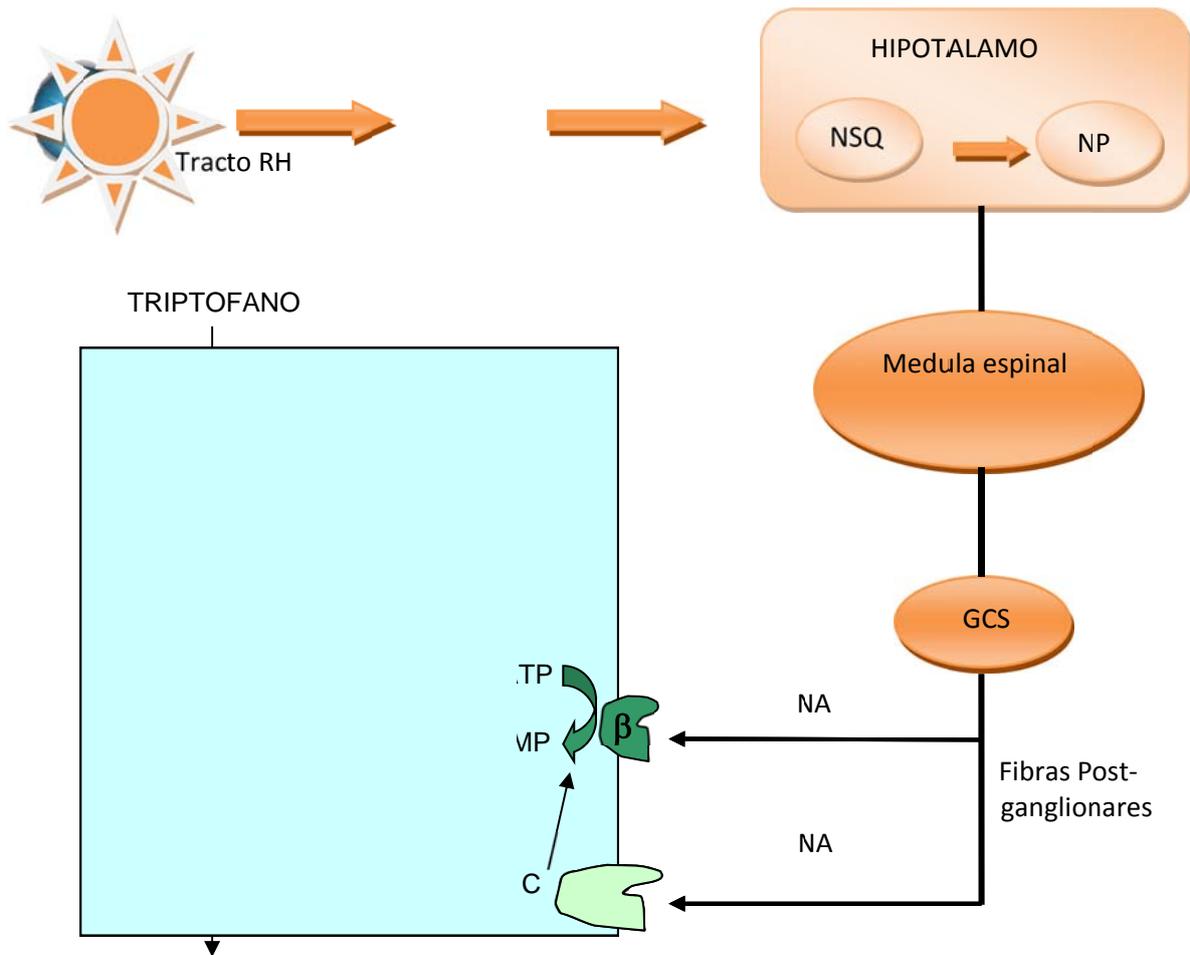
2.1 Mecanismo de síntesis y secreción de la melatonina

La información fotoperiódica es captada por los fotorreceptores de la retina que la transforman en una señal nerviosa y es transmitida a los núcleos supraquiasmáticos hipotalámicos por medio de la vía monosináptica retinohipotalámica, pasa al núcleo hipotalámico paraventricular y mediante una serie de células localizadas en la médula espinal torácica llega hasta los ganglios cervicales superiores del sistema nervioso simpático, y por último, a la glándula pineal, a través de neuronas simpáticas postganglionares (Fig. 1) (Chemineau et al., 1996a).

Durante las horas de oscuridad la actividad eléctrica espontánea del sistema nervioso central se ve disminuida, produciéndose entonces la liberación de noradrenalina en las terminales nerviosas simpáticas que alcanzan los pinealocitos (Sudgen, 1989). A su vez, la noradrenalina se encarga de activar las vías enzimáticas que intervienen en la transformación del triptófano en melatonina. Se desencadenan los mecanismos de síntesis de la arilalkilamina N-acetil-transferasa (AANAT) encargada de la transformación de la serotonina en N-acetil serotonina, que por medio de la enzima hidroxiindol-O-metil-transferasa (HIOMT) se transformará en melatonina. Otras enzimas implicadas en la síntesis de melatonina son la triptófano-hidroxilasa (TH) y la 5-hidroxitriptófano-decarboxilasa (5-HTDC) Estas vías de transmisión de la información fotoperiódica han sido demostradas en las ratas, pero se admiten también para el resto de los mamíferos, incluyendo la especie ovina (Legan y Winans, 1981).

La melatonina se sintetiza por procesos enzimáticos a partir del triptófano y no sólo lo hace en la glándula pineal, sino que también se ha demostrado su síntesis en otras estructuras como la retina, la glándula de Harder, el tracto gastrointestinal, la glándula lacrimal o los leucocitos sanguíneos (Pang et al., 1993). No obstante la síntesis a nivel de la glándula pineal es la más importante. Conti et al. (2000) han demostrado también la síntesis de melatonina a nivel de la médula ósea en el hombre y en el ratón. El control principal de la síntesis de melatonina en la glándula pineal es la oscuridad, pero no es el único. Así, los esteroides, excepto la progesterona, son capaces de modificar la afinidad y el número de receptores β . De hecho, se han asociado incrementos en la liberación y síntesis de melatonina con la disminución de los niveles endógenos de estrógenos (Okatani et al., 1999). Se ha descrito que la exposición directa de ratas a concentraciones fisiológicas de 17- β -estradiol produce una disminución en la síntesis y liberación de melatonina, involucrando también a los receptores $\alpha 1$ (Hernández et al., 2001). De cualquier manera, la variación que producen afecta a la cantidad de melatonina que se secreta, pero no al momento y duración de dicha secreción (Arendt et al., 1983). Zarazaga et al. (1996) describieron que dicho ritmo de secreción no se alteraba por los esteroides ováricos (estradiol y progesterona) ni a lo largo del ciclo ni durante la gestación.

Fig. 1. Representación esquemática de los mecanismos que controlan la síntesis de melatonina. El ritmo de secreción se genera en el núcleo supraquiasmático (NSQ), dirigido por la luz por medio de la vía retino-hipotalámica. La señal pasa al núcleo paraventricular (NPV) y de ahí por la médula espinal, pasa al ganglio cervical superior (GCS) y por las fibras postganglionares del sistema simpático llega a los receptores noradrenérgicos (NA) de tipo α y β . Se desencadenan los mecanismos de síntesis de la arilalkilamina N-acetil-transferasa (AANAT) encargada de la transformación de la serotonina en N-acetil serotonina, que por medio de la enzima hidroxindol-O-metil-transferasa (HIOMT) se transformará en melatonina. Otras enzimas implicadas en la síntesis de melatonina son la triptófano-hidroxilasa (TH) y la 5-hidroxitriptófano-decarboxilasa (5-HTDC) (Adaptado de Arendt, 1998)



La producción de melatonina sigue un ritmo circadiano de secreción, con concentraciones elevadas por la noche y basales por el día (Rollag y Niswender, 1976). La melatonina sintetizada por la glándula pineal es liberada inmediatamente. Sus niveles plasmáticos diurnos son casi indetectables, de entre 4 y 9 pg/ml (English et al., 1986; Bernard et al., 2001; Forcada et al., 2002a), mientras que durante la noche la secreción es mucho más elevada, oscilando entre 50 y 1000 pg/ml (Karsch et al., 1985; Malpoux et al., 1987; Zarazaga et al., 1998)

Además se ha comprobado que su secreción es pulsátil, aunque no se ha encontrado de momento la importancia fisiológica de su carácter episódico (English et al., 1986).

El ritmo circadiano de secreción de melatonina es un ritmo endógeno, circunscrito al periodo de 24 horas por el ciclo luz-oscuridad, demostrado por el hecho de que manteniendo animales bajo luz constante, el ritmo de secreción de melatonina desaparece. Sin embargo, cuando se mantienen bajo oscuridad constante, éstos son capaces de liberar la melatonina siguiendo un cierto ritmo de secreción aunque con un ciclo diferente al de 24 horas y además muy variable entre individuos (Ebling et al., 1988; Kumar y Lincoln, 1995)

Debido a que la melatonina regula la frecuencia de pulsos de GnRH, es posible pensar que actúe directamente dentro del cerebro, y más concretamente a nivel hipotalámico. A pesar de esto, también se ha postulado que la melatonina no actúa directamente sobre las neuronas GnRH hipotalámicas, sino que actúa indirectamente, a través de rutas de interneuronas que terminan por sinaptar con las neuronas GnRH (Malpoux et al., 1997).

2.2 Mecanismo de acción de la melatonina

La melatonina ejerce su acción principal a nivel del sistema nervioso central, donde el perfil de secreción modula la secreción de GnRH (LHRH) y, por tanto, de LH, parcialmente como consecuencia de la modificación de los efectos de retroacción de los esteroides. Así, altos niveles de melatonina en el organismo activan el eje hipotálamo-hipofisario (GnRH-LH) (Arendt et al., 1983; Karsch et al., 1984).

La activación de dicho eje en época de anestro, requiere la exposición a altas concentraciones de melatonina durante varias semanas, al final de las cuales se produce el cambio en el mecanismo de feedback del estradiol sobre la secreción de GnRH-LH (Legan et al., 1977).

El conocimiento de los efectos de la melatonina sobre el hipotálamo y su función principal como mediadora endocrina de la regulación de la estacionalidad en las ovejas (Chemineau et al., 1996), ha permitido el desarrollo de nuevas técnicas para mejorar el control de la reproducción, como por ejemplo el uso de implantes subcutáneos de melatonina exógena a fin de lograr adelantar la estación reproductiva y mejorar la eficiencia reproductiva durante el anestro tanto en ovejas de estacionalidad muy

marcada (Haresign et al., 1990) como en ovejas de razas Mediterráneas (Chemineau et al., 1996; Zuñiga et al., 2002; Abecia et al., 2007).

2.3 Efectos de los implantes subcutáneos de melatonina

Los implantes subcutáneos de melatonina inducen altos niveles plasmáticos de la hormona durante las 24 horas del día pero sin suprimir la secreción endógena nocturna de la hormona pineal (O'Callaghan et al., 1991; Malpoux et al., 1997). La liberación de melatonina es eficaz más allá de los 70 días tras la colocación del implante (Forcada et al., 2002).

El efecto de la melatonina sobre el desarrollo folicular y en consecuencia sobre la tasa de ovulación, se basa en que dicha hormona aumenta el número de folículos ovulatorios debido a una disminución en el proceso de atresia de los folículos pequeños y medianos presentes en la onda folicular previa a la ovulación (Bister et al., 1999; Noël et al., 1999). Al parecer la melatonina tiene la capacidad de modular el crecimiento folicular sin influir en la secreción de hormona FSH (Noël et al., 1999), tal vez debido a la capacidad de estimular la esteroidogénesis a través de una acción directa sobre el ovario (Fiske et al., 1984).

Por otra parte, distintas referencias destacan el efecto luteotrófico de la melatonina, que ha sido evidenciado tanto *in vivo* (Wallace et al., 1988; Durotoye et al., 1997) como *in vitro* (Abecia et al., 2002). De este modo, Abecia et al. (2006) observaron que el tratamiento con melatonina se asocia con una disminución significativa de la proporción de ovejas no cíclicas que responden al efecto macho con la presentación de un ciclo corto (en base a la formación de un cuerpo lúteo con la funcionalidad alterada), y por tanto con un aumento del número de hembras que presentan un ciclo de duración normal (cuerpo lúteo funcional) tras la introducción de los moruecos.

No se conoce hasta el momento que la melatonina ejerza efectos tanto directos como indirectos a nivel oviductal. Sin embargo, a nivel uterino se ha observado que la hormona pineal es capaz de reducir la producción *in vitro* de PGF2 α en ovejas subnutridas durante el anestro (Abecia et al., 1999). A su vez, la demostración de la presencia de receptores uterinos específicos para melatonina en ratas (Zhao et al., 2000) y su regulación a través de las hormonas esteroideas (Clemmens et al., 2001), permite pensar en una posible acción directa de la hormona a nivel uterino, aunque tampoco existe en la literatura ninguna referencia que demuestre estos hechos en ovinos.

Palacín et al. (2011) recopilaron la información publicada en lo que al efecto de los implantes de melatonina sobre los parámetros reproductivos se refiere, en forma de meta-análisis, herramienta estadística que permite comparar trabajos publicados en distintas fuentes pero que han utilizado la misma metodología. Se han analizado los resultados de 139 experiencias publicadas en 56 publicaciones o comunicaciones. Para la fertilidad, la melatonina incrementó de manera significativa las posibilidades de parto un 29%. Para la prolificidad, se concluyó que los grupos tratados incrementaron su prolificidad 0,08 corderos/parto. El tratamiento con melatonina aumentó de manera significativa la fecundidad, con 0,25 corderos extra producidos/oveja tratada.

2.4 Vía de aplicación del implante con melatonina

La vía de aplicación finalmente adoptada a nivel comercial ha sido la de los implantes (2x4 mm) subcutáneos aplicados en la base de la oreja, que en España, autorizados en el año 2000, reciben el nombre comercial de Melovine® (CEVA, Salud Animal S.A., Barcelona). En otros países como en Gran Bretaña, Australia, Nueva Zelanda y Grecia, reciben el nombre de Regulin®. Estos implantes contienen 18 mg de melatonina, que se libera de forma lenta y continua, elevando los niveles basales en plasma pero sin eliminar la secreción endógena normal de la misma por la glándula pineal, dado que la magnitud de la diferencia entre valores nocturnos y diurnos es muy similar entre animales implantados y no implantados (Forcada et al., 1995).

La melatonina administrada de esta forma proporciona una información fotoperiódica que la oveja interpreta como días cortos (Malpaux et al., 1997). Haresign (1990) observaron en razas inglesas que la colocación de un solo implante en la hembra era igual de efectivo que utilizando dos implantes. En cambio, en el macho se recomienda el uso de tres implantes por animal.

Un periodo de administración excesivamente corto puede resultar ineficaz a la hora de obtener una respuesta satisfactoria. Así, Bittman et al. (1985), señalaron que cuando las ovejas están experimentando días crecientes la exposición a la melatonina induce una estimulación de la secreción pulsátil de LH a los 40-60 días del inicio del tratamiento. De este modo, utilizando implantes subcutáneos de melatonina, se requieren al menos 36 días para inducir una mayor ciclicidad en el lote tratado, obteniéndose un mejor resultado con 93 días de exposición al implante.

Dado que los implantes subcutáneos de melatonina causan una respuesta de días cortos sin eliminar el ritmo endógeno de secreción propio del animal (O'Callaghan et al., 1991; Malpaux et al., 1997), a los 40-60 días de su colocación se observa un incremento en la frecuencia de los pulsos de LH y GnRH en ovejas sometidas a días largos (Viguié et al., 1997).

Según Chemineau et al. (1996), la duración habitual de los niveles elevados de melatonina en plasma tras un tratamiento en forma de implantes subcutáneos, es de 70 días. Forcada et al. (2002a) observaron cómo animales implantados mantenían niveles elevados de melatonina tras 100 días de tratamiento, y esos niveles parecían decaer a los 120 días de la colocación de los implantes, si bien había ovejas que todavía mantenían una cierta respuesta a los mismos.

2.5 Efecto de los implantes de melatonina en moruecos

La utilización de fotoperiodos artificiales ha demostrado que también los machos poseen un ritmo endógeno de reproducción que está regulado por los ciclos luz-oscuridad (Lincoln y Davidson, 1977). El cambio brusco de fotoperiodo de días largos a uno corto incrementó las concentraciones de FSH, LH y testosterona, además de un incremento en el crecimiento testicular.

Ha sido ampliamente demostrada la capacidad de la melatonina para revertir los efectos de la estacionalidad en la reproducción tanto en machos como hembras (Fitzgerald y Stellflug, 1991; Chemineau et al. 1992; Abecia et al., 2008). Aunque la variación estacional de los parámetros reproductivos es menos marcada en el macho que en las hembras, en estación no reproductiva se observa una disminución del volumen y del diámetro testicular, deterioro en la calidad del semen, así como también una alteración del perfil hormonal (Schanbacher y Lunstra, 1976), afectando el desempeño reproductivo de los carneros.

Otros estudios han demostrado que el tratamiento con melatonina mejora la motilidad de espermatozoides progresivos (Kayaetal., 2000) y la actividad acrosómica.

El uso de implantes de melatonina en el morueco durante la estación no reproductiva se ha asociado con mejoras en parámetros reproductivos como el diámetro escrotal, fertilidad y prolificidad (Palacín et al., 2008), aunque el mecanismo de acción por el cual la melatonina ejerce su acción no es del todo conocido. Aunque esta hormona parece ejercer su acción principalmente en el eje hipotálamo-hipofisario (Webster et al.,

1991), recientes estudios de nuestro grupo han demostrado su presencia y su variación estacional, junto con la testosterona, en el plasma seminal (Casao et al., 2010a), lo que, además de su acción directa sobre la célula espermática (Casao et al., 2010b), sugiere también una acción relevante a nivel testicular y de las glándulas accesorias.

Al igual que en las hembras, en los moruecos la melatonina presenta un ritmo de secreción circadiano, con concentraciones plasmáticas elevadas durante la noche y disminuidas con la aparición de la luz del día (Lincoln et al., 1982). Se ha demostrado asimismo en los machos el carácter pulsátil de su liberación (Sheikheldin et al., 1992).

Los tratamientos con melatonina en moruecos en fotoperiodo de días largos han demostrado tener un efecto estimulador de la funcionalidad sexual de forma similar al efecto de la exposición a días cortos (Lincoln y Ebling, 1985). También se han encontrado diferencias en el peso testicular tras el tratamiento con melatonina, a favor del lote tratado (Tekpetey y Amann, 1988). Fitzgerald et al. (1991) observaron una mayor fecundidad en las ovejas cubiertas en primavera por machos tratados con melatonina.

A nivel comercial se aconseja la colocación de 2-3 implantes en el macho. Así Rosa et al. (2000) obtuvieron un incremento en las concentraciones plasmáticas de testosterona y un aumento de la libido en moruecos tratados. De forma parecida, Kokolis et al. (2000) encontraron un aumento de las concentraciones medias y del número de picos de testosterona, demostrando también un importante efecto del tratamiento con melatonina sobre la calidad espermática.

Beltrán de Heredia (1995) llevó a cabo un ensayo en machos ovinos de raza Lacha implantando en abril, y obtuvo una clara mejoría del volumen del eyaculado y de la concentración espermática a partir de la novena semana de tratamiento, logrando de ese modo un mayor número de dosis seminales por eyaculado.

Bravo (2003), con moruecos de raza Merino, obtuvieron un mayor número de espermatozoides por eyaculado en tratamientos de febrero y marzo, observándose por otro lado un menor tiempo de cortejo en los machos tratados. García Pastor et al. (2004), obtuvieron al inicio de anestro diferencias significativas en el perímetro escrotal de moruecos de raza Rasa Aragonesa tratados con melatonina frente a los no tratados.

3. DESARROLLO FOLICULAR Y PRODUCCIÓN DE EMBRIONES

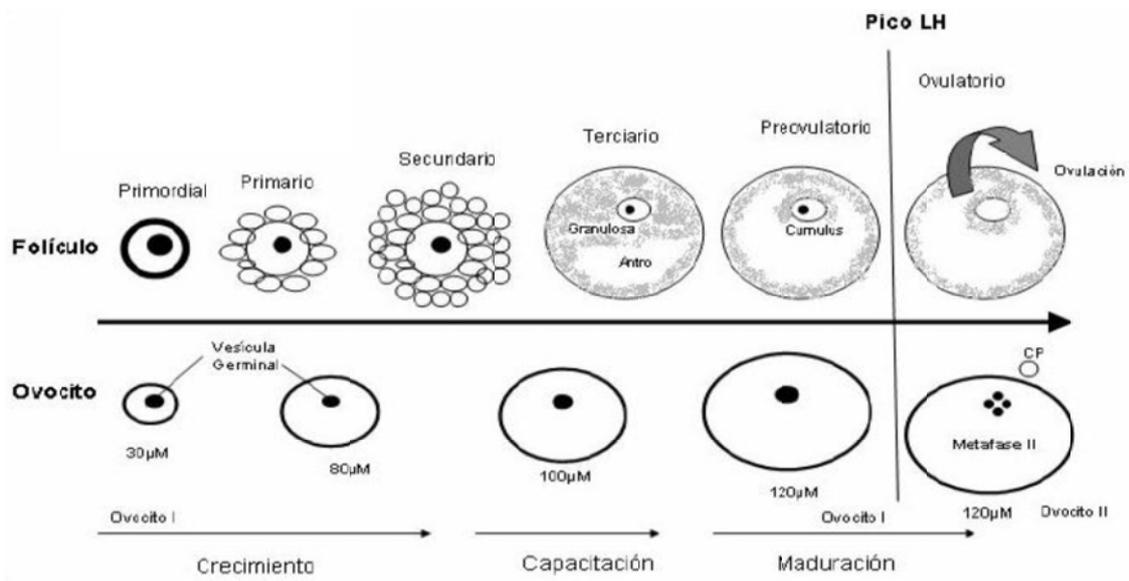
3.1 Desarrollo folicular

La foliculogénesis es el proceso mediante el cual se forman los folículos ováricos, pasando por diferentes etapas de crecimiento y desarrollo, hasta que se produce la ovulación o bien la atresia, relacionada con la muerte celular programada o apoptosis tanto de las células somáticas del folículo como del propio oocito.

Este proceso se inicia tempranamente durante la vida embrionaria, de modo que al nacer, la cordera, al igual que la mayoría de las hembras de las especies domésticas, cuenta con una reserva o *pool* de oocitos que han detenido su crecimiento.

Estos conforman los folículos primordiales, cuyo número oscila entre 40.000 y 300.000 por oveja (Scaramuzzi et al., 1993). Se trata de estructuras sin red capilar y sin apenas atresia.

Fig.2. Representación esquemática del crecimiento del oocito, capacitación y maduración durante la foliculogénesis (Mermillod et al., 1999)



De forma continua y ya desde antes de la aparición de la pubertad, se genera un reclutamiento inicial de los folículos primordiales cuando algunos de los factores inhibitorios que los mantenían estáticos en su actividad dejan de estar presentes (Fortune, 2002). A medida que progresan en su desarrollo se genera un cambio estructural en las células de la granulosa y se forma la teca interna para pasar a ser folículos primarios. Es importante señalar que una vez que el folículo abandona el pool

primordial e inicia su crecimiento, no vuelve a retornar al estadio quiescente, de manera que o bien alcanza las fases finales de desarrollo o bien se atresia.

En la fase de reclutamiento tiene lugar un aumento del tamaño del oocito y una proliferación de las células de la granulosa, que se disponen en capas concéntricas a su alrededor (Hirshfield, 1991). Estos folículos tienen un diámetro entre 0,03 y 0,1 mm. Son folículos preantrales por no haberse conformado el antro, de manera que en esta etapa la foliculogénesis es independiente de las gonadotrofinas y su estímulo depende de otros factores (Fortune, 2002).

A medida que van progresando en su desarrollo, los folículos se van haciendo sensibles a las gonadotrofinas, de manera que se adquieren receptores para LH y FSH en células de la teca y la granulosa respectivamente; en consecuencia tienen capacidad para sintetizar progesterona y andrógenos, aunque las cantidades de estradiol no son detectables hasta que el folículo no alcanza los 0,5 mm de diámetro. También se forma el antro y el folículo sigue creciendo hasta alcanzar 1-2,5 mm de diámetro. Esta etapa de desarrollo folicular dependiente de las gonadotrofinas tiene lugar de forma cíclica y organizada en forma de ondas foliculares (Montgomery et al., 2001). En conjunto, una oveja viene a tener unos 25 folículos con respuesta a las gonadotrofinas.

Se trata de estructuras que para superar los 2,5 mm de diámetro dependen tanto de la FSH (necesaria para la aromatización o producción de estrógenos) como de la LH (implicada en la producción de andrógenos, sustrato para la síntesis de estrógenos). Por tanto, son muy eficientes en la producción de estradiol, especialmente conforme progresan en su desarrollo y aumentan el número de receptores a ambas gonadotrofinas, sobre todo a la LH en las células de la granulosa (Scaramuzzi et al., 1993). Su número está entre 1 y 8 por ovario, y se trata de folículos cuyo destino (ovulación o atresia) está íntimamente ligado a la evolución de las gonadotrofinas a lo largo del ciclo sexual.

Los folículos ovulatorios requieren unas concentraciones de FSH reducidas como consecuencia de su alta producción de estradiol e inhibina (Scaramuzzi et al., 1993). Tales concentraciones impiden el desarrollo de los folículos dependientes de gonadotrofinas que vienen por detrás, con lo que el folículo que va a ovular ejerce un efecto de dominancia que puede alterar la respuesta a los tratamientos de superovulación (González de Bulnes et al., 2004). En la Fig. 2 se representan las diferentes fases del crecimiento, capacitación y maduración durante la foliculogénesis del ovocito (adaptado de Mermillod et al., 1999).

3.2 Ondas de desarrollo folicular.

En las ovejas se han descrito entre 2 y 4 ondas foliculares durante un ciclo sexual (Evans et al., 2000), de manera que cada onda está constituida por tres etapas:

- Reclutamiento:

Es el inicio de la onda folicular. En esta etapa un grupo de folículos antrales (de 2 mm de diámetro) responden a los incrementos de FSH (Driancourt et al., 1993). El folículo cuenta con receptores LH en las células de la teca y receptores FSH en las células de la granulosa y ambos grupos de células generan estrógenos, que junto a la FSH aumentan la producción de líquido folicular en la medida que el antro va creciendo.

- Selección:

El folículo dominante crece de forma acelerada asumiendo que este folículo es seleccionado para ovular y los demás folículos subordinados crecen pero a menor velocidad hasta detener su desarrollo e iniciar la atresia. El folículo seleccionado tiene la mayor cantidad de receptores de LH (en teca y granulosa) y FSH, por lo que posee los mayores niveles intrafoliculares de estradiol, sobre todo al alcanzar 4 mm de diámetro (Driancourt, 2001), de manera que los demás folículos del grupo completan su regresión hasta la atresia.

- Dominancia:

El mecanismo principal que regula la dominancia folicular es una reducción notable de los niveles de FSH debido a la acción combinada de la inhibina y el estradiol producidos por el futuro folículo dominante que actúan por retroalimentación negativa sobre la hipófisis (Gibbons et al., 1997). La aparición de receptores de LH en las células de la granulosa permite superar las consecuencias de la supresión de FSH provocada por la secreción de estradiol por lo que el número de dichos receptores aumenta a la par que los niveles de estradiol de forma tal que esta producción acelerada actúa a nivel central para estimular el pico de LH. El folículo dominante finalmente se atresia u ovula dependiendo de la existencia o no de cuerpo lúteo. De existir cuerpo lúteo, la progesterona actúa inhibiendo los pulsos de LH, de modo que los folículos dominantes no terminan su maduración y sufren atresia.

La magnitud de la dominancia se mide por la diferencia de tamaño entre el folículo dominante y el folículo subordinado más grande, que en general es de únicamente 2 a 3 mm de diámetro en la oveja, con lo que en esta especie la dominancia no sería excesiva (Driancourt, 2001). Tras la luteolisis al ir aumentando la secreción de LH, la dominancia se hace más evidente (González-Bulnes et al., 2004).

Como consecuencia de la ovulación cesa la síntesis de estradiol, posteriormente a esto tiene lugar un pico secundario de FSH, el cual estimula la emergencia de una nueva onda folicular (Simonetti et al, 2008).

La LH se mantiene basal durante casi todo el ciclo, alcanzando niveles altos en el momento del pico preovulatorio. La FSH es producida en ondas en concordancia con las ondas foliculares y su nivel más alto se produce junto al pico preovulatorio de LH. El estradiol presenta elevaciones periódicas que coinciden con el crecimiento del folículo mayor de cada onda y su nivel máximo ocurre en la onda ovulatoria. La progesterona se mantiene basal durante todo el desarrollo folicular, aumentando en la fase luteal y cayendo en forma abrupta en la luteolisis.

3.3 Producción de embriones *in vivo*

Las técnicas en las que se basa la producción de embriones *in vivo* en los pequeños rumiantes se conocen desde hace tiempo, y lo cierto es que han evolucionado poco en los últimos años, en particular en relación a su eficacia y a su aplicación práctica.

La producción de un número de embriones suficientemente elevado supone la estimulación hormonal externa de los acontecimientos endocrinos que regulan el ciclo sexual de la oveja, con la finalidad de inducir el celo y estimular el crecimiento y la ovulación de la población de folículos en un momento determinado. Todo ello supone un tratamiento de sincronización-ovulación y otro de sobre estimulación ovárica.

3.3.1 Tratamiento de sincronización de celo

La sincronización se basa principalmente en la manipulación de la fase luteal del ciclo. Las estrategias de sincronización pueden ser empleadas bien para inducir o para prolongar esta fase mediante la administración de progesterona exógena, o bien para acortarla prematuramente induciendo la luteolisis y subsiguiente fase folicular utilizando las prostaglandinas (Wildeus, 2000).

3.3.2 Progestágenos

El fundamento de este método es producir en los animales un efecto similar al ejercido en el ciclo sexual por la progesterona, es decir, una inducción o prolongación de la fase luteal y una inhibición de la acción de las gonadotrofinas y por lo tanto de las etapas finales de maduración de los folículos. Al ser retirada la fuente de progestágeno se anula dicha inhibición. En consecuencia, en la práctica las ovejas se sincronizan en un estado similar de su ciclo estral, entrando la mayoría de las ellas en celo (Raso et al., 2004).

El tratamiento tradicional de sincronización en pequeños rumiantes tanto en estación sexual como durante el anestro estacional ha supuesto la aplicación de esponjas de poliuretano impregnadas con progestágenos. Los niveles de progestágenos, aunque bajos, son de igual eficacia que la progesterona natural. Actualmente existen dos tipos de esponjas, las impregnadas de acetato de fluorogestona (FGA) y las que contienen acetato de medroxiprogesterona (MAP) (Wildeus, 2000).

La colocación de la esponja por vía intravaginal tiene por objetivo simular la acción del cuerpo lúteo en la regulación del ciclo estral. La esponja permanece durante 12 a 14 días en el tracto reproductivo (tiempo equivalente a la fase luteal natural), de manera que los niveles elevados del progestágeno liberado actúan a nivel del eje hipotálamo hipofisario inhibiendo la secreción pulsátil del GnRH y por tanto suprimiendo la secreción de gonadotrofinas e inhibiendo el crecimiento folicular y la ovulación.

Al retirar la esponja se produce una disminución brusca de los niveles plasmáticos de progesterona eliminando el bloqueo sobre el eje hipotálamo hipofisario favoreciendo la reanudación de los acontecimientos endocrinos que inducen el celo y la ovulación (Cognie, 1992).

Un aspecto a destacar de la sincronización con esponjas vaginales es que en el momento de su colocación se desconoce el momento del ciclo estral en el que se encuentra la oveja. Además, los niveles de progestágenos, altos tras la aplicación de la esponja, se reducen notablemente conforme pasan los días, con lo que en la fase final del tratamiento son demasiado bajos como para inhibir la liberación de LH, produciendo un inadecuado desarrollo folicular con persistencia de folículos envejecidos (Viñoles et al., 1999) cuya ovulación ha sido asociada en ocasiones con una menor fertilidad (Ungerfeld y Rubianes, 1999; Viñoles et al., 2001). Si bien es cierto que la actual normativa comunitaria ha promovido el desarrollo de esponjas vaginales que tienen un liberación más constante del progestágeno (FGA), también lo es que la aplicación de un

segundo dispositivo a los 7 días de la inserción del primero puede reducir los problemas anteriores (Thompson et al., 1990), con lo que en los protocolos de superovulación actuales se sustituye la esponja vaginal en la mitad del tratamiento de sincronización, asegurando de este modo unos niveles de progestágenos altos y relativamente constantes (González-Bulnes et al., 2004).

3.3.3 Estimulación ovárica

El tratamiento de superovulación consiste en inducir una tasa ovulatoria por encima de la normal estimulando los ovarios mediante la aplicación de gonadotrofinas exógenas.

Los principios de la superovulación en ovino y caprino son iguales que en bovino y consisten en la administración de una gonadotrofina folículo estimulante al final de la fase luteal del ciclo (días 11 a 13) o alrededor del día 1 o 2 antes del final de los tratamientos de sincronización (Ishwar y Memon, 1996). Esto consigue el reclutamiento de folículos pequeños, de manera que se acelera el desarrollo folicular y paralelamente también disminuye el tamaño de los folículos preovulatorios (Driancourt, 1987, 2001).

La fase preovulatoria del ciclo estral en ovejas es caracterizada por la selección de uno u varios folículos dominantes y la atresia de los folículos subordinados por acción de la inhibina y del estradiol secretados por el folículo dominante actuando sobre el eje hipotálamo hipofisario disminuyendo así la concentración plasmática de FSH (Driancourt et al., 1985). Por ello, para llevar a cabo un tratamiento de superovulación, hay que vencer los mecanismos inhibidores establecidos por el/los folículos dominantes aportando altas cantidades de FSH exógena.

Durante la fase folicular temprana se ha observado que el crecimiento de los pequeños folículos antrales está directamente correlacionado con las concentraciones altas de FSH en el plasma periférico (Cahill et al., 1985; McNatty et al., 1985). Además, la administración de preparaciones de gonadotrofinas exógenas que contienen extractos hipofisarios con actividad similar a la FSH durante el periodo de concentraciones bajas de FSH endógeno, puede vencer los mecanismos inhibidores ejercidos por el folículo dominante e inducir el crecimiento de múltiples folículos preovulatorios (Rubianes et al., 1997).

La superovulación en ovinos ha sido realizada mediante la utilización de varias fuentes hormonales. Entre las hormonas más comúnmente empleadas se hallan la eCG

(Gonadotropina Coriónica Equina, también denominada PMSG) y la FSH (Hormona Folículo Estimulante).

Es importante que la dosis de las hormonas utilizadas sea la adecuada, pues si es excesiva el número de folículos ovulados se reduce notablemente tanto con eCG (Mutiga y Baker, 1982; Gonzalez-Reyna et al., 1999) como con FSH (Smith, 1984; D'Alessandro et al., 1996), además de que los riesgos de regresión prematura de los cuerpos lúteos formados aumentan (Ryan et al., 1991; D'Alessandro et al., 1996).

3.3.4 La hormona folículo estimulante (FSH)

Es una hormona glicoproteica producida en las células gonadotrofas de la adenohipofisis. Actualmente las preparaciones comercializadas de FSH son de origen ovino o porcino y en realidad se tratan de los extractos hipofisarios parcialmente purificados con una elevada actividad FSH y con una cantidad variable de LH.

Por lo que al contenido de LH en los extractos hipofisarios que se han comercializado con los años se refiere, el Pluset (FSH porcina) posee cantidades iguales de FSH y LH, mientras que en el Folltropin-V (FSH porcina) se ha extraído el 80% de la LH, con lo que su relación FSH:LH queda en 49:1 (Henderson et al., 1990). Finalmente, el Ovagen (FSH ovina) parece ser el producto más purificado, con poca contaminación LH y una relación FSH:LH de 1090:1. En general, parece claro que un alto contenido de LH se asocia con una reducción de la respuesta ovulatoria (Chupin et al., 1987; Torrès et al., 1987), con lo que la tendencia en el tiempo ha sido utilizar productos cada vez más purificados. En virtud de los problemas encontrados al emplear la eCG, la alternativa de superovular empleando la FSH ha sido una opción utilizada durante décadas en los programas MOET. La utilización de la FSH se asocia con una menor variabilidad en la tasa de recuperación y una menor cantidad de folículos anovulatorios (Chagas e Silva et al., 2003). Además, su aplicación repetida en sucesivos tratamientos superovulatorios anuales (Bari et al., 2001) o incluso cada 2 meses sobre la misma hembra (Forcada et al., 2000) (Tabla 1), no parece reducir significativamente el rendimiento en la producción de embriones de los programas MOET.

Dado que la FSH tiene una vida media corta de únicamente 3 a 5 horas (Laster, 1972; Demoustier et al., 1988), requiere que sea administrada de manera repetida para mantener altos sus niveles en plasma y por tanto para asegurar su eficacia en los programas MOET. Así, se inyecta cada 12 horas en protocolos de 6 a 8 inyecciones,

aunque también se han descrito protocolos de 4 inyecciones. De este modo, la eficacia de la aplicación de la FSH cada 12 horas ha sido superior a la obtenida con una administración menos frecuente, cada 24 horas (Thompson et al., 1990).

Tabla 1. Efecto del tratamiento repetido con FSH ovina sobre la respuesta ovárica y la producción de embriones en ovejas Rasa Aragonesa (adaptado de Forcada et al. 2000). Superíndices diferentes indican diferencias de $P < 0.05$ (mayúsculas) o $P < 0,1$ (minúscula)

Numero de Tratamientos	1	2	3
Ovejas en celo	84/113	63/73	22/25
Ovejas superovuladas (CL funcional)	70/84	52/63	19/22
Tasa de Ovulación	11.4 ^c	11.6 ^c	8.5 ^d
Recuperación/oveja	7.3 ^{c,d}	8.0 ^c	5.4 ^d
Fecundados/oveja	5.8	6.2	4.0
Viabiles/oveja	5.0	5.4	3.5
Congelables/oveja	4.1 ^c	4.5 ^c	2.4 ^d

Por lo que al modo de aplicación de FSH se refiere, tradicionalmente se ha adoptado el protocolo de dosis decrecientes, fundamentalmente porque en las preparaciones con un elevado contenido de LH, que fueron las disponibles en primer lugar, la eficacia del mismo fue superior a la obtenida con un protocolo de dosis constantes (Torrès et al., 1987). La aparición de sucesivos preparados de extractos hipofisarios apenas contaminados con LH se asoció con la posibilidad de utilizar de nuevo los protocolos de dosis constantes, más cómodos en la práctica y con menos riesgos de errores en la dosificación. De hecho y por ejemplo, el propio laboratorio que proporcionaba el preparado Ovagen (Immuno-Chemical Products Bio, Nueva Zelanda) sugería la adopción de un protocolo de dosis iguales, que algunos autores han mostrado que se asocia con resultados muy satisfactorios (Bettencourt et al., 2008) y consistentes en el tiempo, como los registros de 8 años en el programa MOET desarrollado sobre ovejas Scottish Blackface (Bari et al., 2001). No obstante, esta consistencia no ha sido contrastada por otros autores, que han mostrado que el protocolo de dosis constantes ofrece resultados variables y por tanto poco predecibles (Gonzalez-Bulnes et al., 2002a;

Berlinguer et al., 2004). De este modo o en conjunto, González-Bulnes et al. (2004) parecen demostrar una cierta superioridad de los protocolos de dosis decrecientes de FSH respecto a los de dosis constantes, señalando que los primeros estarían más próximos a los cambios de secreción hipofisaria que tienen lugar en la fase folicular del ciclo sexual natural.

No obstante y aunque en los programas MOET parece más extendida la utilización de protocolos con dosis decrecientes de FSH, lo cierto es que cuando lo que se pretende es recuperar oocitos *in vivo* mediante OPU, se recomienda la adopción de protocolos de dosis constantes, que ofrecen mejores resultados en las posteriores técnicas de producción de embriones *in vitro*, en particular en lo relativo al número de blastocistos obtenidos (Berlinguer et al., 2004). En concreto, se señala que las dos primeras dosis elevadas de FSH aplicadas en los regímenes decrecientes, parecen acelerar el desarrollo folicular y por tanto producen una falta de sincronización entre dicho crecimiento y el proceso de maduración citoplasmática del oocito (Blondin et al., 1996), lo que provoca que éste tenga una menor competencia a la hora de producir embriones *in vitro*.

Una alternativa de sobreestimulación ovárica para producción de embriones es el uso de tratamientos simplificados con FSH. Éstos han sido evaluados por nuestro propio grupo (Forcada et al 2010 et al., 2009), observando muy buenos resultados en comparación con los tratamientos decrecientes, con un total de 7,8 embriones viables por animal en ovejas de raza Ojalada, por encima de los obtenidos por Leoni (2001) en raza Sarda (5,9), y Simonetti (2008) en la raza Corriedale (4,0) con el mismo tratamiento. Este mismo protocolo mostró también unas tasas de recuperación y de fecundación muy adecuadas, si bien otros autores han mostrado que la tasa de recuperación se ve notablemente perjudicada con la asociación de las dos hormonas en una única inyección (Leoni et al., 2001; Simonetti et al., 2008). Sin embargo, la tasa de fecundación mejora significativamente cuando se reduce la dosis tanto de FSH como de eCG a 6 ml (210 UI de FSHp) conjuntamente con 500 UI de eCG en el citado tratamiento simplificado (Leoni et al., 2001; Simonetti et al., 2008). La regresión luteal temprana ha sido referida por distintos autores asociada a tratamientos de superovulación (Ryan et al., 1991; Schiewe et al., 1991; Forcada et al., 2000; 2006), y parece tener como causa principal la falta de un soporte de progesterona previo al tratamiento de superovulación, con lo que su incidencia parece ser superior en periodo de anestro (Ryan et al., 1991). También se ha señalado que la incidencia de esta alteración podría ser superior cuando se aplican tratamientos de estimulación muy simplificados, de manera que Riesenberget al. (2001)

ya mostraron una alta incidencia de cuerpos lúteos anómalos en respuesta a una única inyección de FSH en solución salina sin asociación con eCG. Sin embargo, una dosis reducida de eCG aplicada junto con la FSH puede ser importante para sostener la estimulación folicular inducida por ésta y evitar así las alteraciones referidas por los citados autores. Simonetti et al. (2008) no ha detectado una incidencia significativa de regresión luteal temprana. De hecho, algunos autores han responsabilizado en parte al estrés asociado a situaciones experimentales como causa de fallos de luteinización (Forcada et al., 2000; Okada et al., 2000). En este sentido, el tratamiento simplificado parece tener una ventaja adicional al evitar estos problemas, aunque hay que tener muy presente que la regresión luteal temprana tiene una variación importante con la raza (Okada et al., 2000). Por lo mencionado se puede mencionar que estos tratamientos superovulatorios simplificados combinados (eCG+FSH) permiten obtener resultados muy satisfactorios en cuanto a la producción de embriones y viabilidad de estos mismos tras la vitrificación en ovejas de raza Ojalada Soriana, en todos los casos muy similares a los obtenidos con el protocolo de 6 inyecciones decrecientes de FSH (Forcada et al. 2010, 2009), aunque adelantan significativamente la salida en celo, aspecto a tener muy en cuenta a la hora de realizar la fecundación mediante IA o de recuperar embriones en el estadio de desarrollo deseado.

Finalmente, hay que tener en cuenta que la respuesta a la superovulación con FSH, en términos de tasa de ovulación y del número y calidad de los embriones recuperados, se considera relacionada con el número de folículos pequeños (Gonzalez-Bulnes et al., 2000) y con la presencia de un gran folículo dominante, como también por la presencia/ausencia de cuerpo lúteo al comienzo de los tratamientos superovulatorios. En este sentido, los resultados son mejores cuando el tratamiento de superovulación se inicia en ausencia de folículo dominante (Rubianes et al., 1995) y en presencia de cuerpo lúteo (Gonzalez-Bulnes et al., 2002).

Forcada et al. (2006) evaluaron los efectos de implantes de melatonina en dos tratamientos de superovulación para producción de embriones en ovejas de raza Rasa Aragonesa en anestro estacional durante dos años consecutivos, comenzando los tratamientos de superovulación 35 y 91 días de colocado el implante de melatonina en el año 1 y 39 y 88 días después en el año 2. A través de este estudio se llegó a la conclusión de que se puede mejorar la viabilidad de los embriones recolectados a los 90 días de aplicado el implante.

4. ANÁLISIS DE LA CALIDAD SEMINAL

4.1. Color del semen

El color del semen se observa en primer término, debiendo el mismo ser blanco-lechoso o cremoso pálido. El color rojizo indica presencia de sangre, así como los colores grises o marrones indican contaminación o infección, debiéndose en estos casos desechar el eyaculado y proceder a la revisión del macho.

4.2. Motilidad masal

Se podrá tener una idea de la calidad seminal por la velocidad con que se hacen y deshacen las ondas (motilidad masal). La motilidad se estima por el vigor del movimiento de las ondas en una escala subjetiva entre 0 y 5 (0, mínimo; 5, máximo). Para proceder al congelado de un eyaculado, se recomienda que su motilidad masal sea de 3 o mayor.

4.3. Volumen del semen

El volumen del semen se mide utilizando un tubo de recolección graduado. Cuando la extracción se realiza con el uso de vagina artificial se obtienen eyaculados de aproximadamente 1 a 2,5 ml que varía según la edad, tamaño y condición corporal del animal.

4.4. Concentración espermática

Hay distintos métodos que permiten la determinación de la concentración espermática, entre ellos recuento en cámara de Neubauer o por fotocolorímetro. Ambos métodos son precisos; si bien el fotocolorímetro permite un recuento más rápido en comparación con la cámara de Neubauer, su costo es más elevado. La cámara de recuento consta de tres piezas: a) una pieza de vidrio en la que se encuentra labrado bajo relieve el cuadrículado en que se depositará el material a examinar; b) un cubreobjetos específico que montado sobre la pieza anterior formará la cámara propiamente dicha y c) una pipeta de recuento de glóbulos rojos, con la que se tomará la muestra y en la que se realizará la dilución. La cámara de conteo es un portaobjetos de vidrio grueso con 2 cuadrículas situadas a un lado y otro (superior e inferior) del centro de la cámara. Cada cuadrícula presenta en sus extremos o cuadrantes, 4 grupos de 16 cuadrados cada uno (sin divisiones internas).

El fundamento de esta técnica es diluir 0,5 µl de semen en 2 ml de agua destilada, cargar la cámara de Neubauer, contar en microscopio a 100 o 200 aumentos el número de espermatozoides de 5 cuadrículas al azar, la suma de ese resultado se multiplicará por 12.800.000 que es una constante que se obtiene a través del volumen de cada cámara, la cantidad de cuadrículas y su división final.

El fotolorímetro se basa en exponer una muestra de semen a un haz de luz y registrar la cantidad de luz absorbida (absorbancia) por la misma o la transmitida (transmitancia) a través de la muestra. La concentración de la muestra será directamente proporcional a la absorbancia.

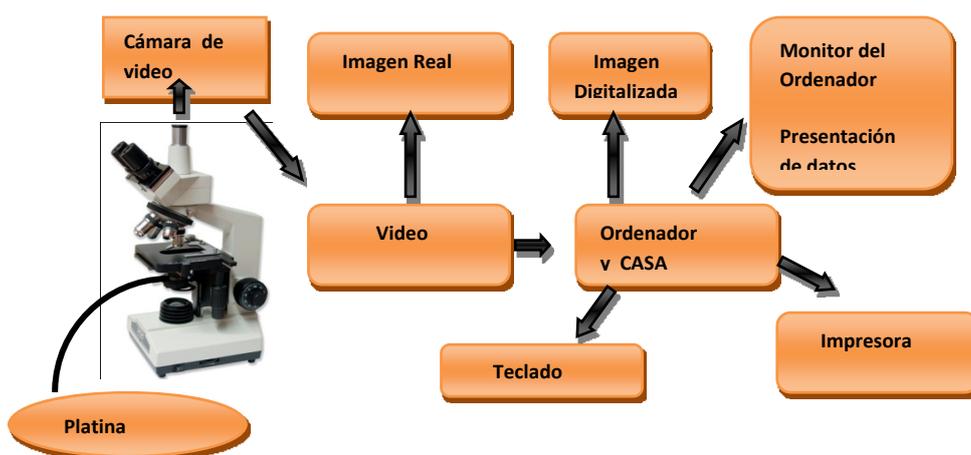
4.4.1. Sistemas de análisis de espermatozoides asistidos por ordenador (CASA)

La determinación objetiva de la motilidad de una muestra no siempre es posible basándose en un examen visual, por la subjetividad inherente y a la reducida cantidad de la muestra. En consecuencia, evaluar una muestra o un protocolo de criopreservación de semen con base en este parámetro podrá resultar en una baja correlación con la fertilidad *in vivo*. Desde los años ochenta, este problema está perdiendo importancia con la introducción de los sistemas de análisis de imagen computerizados (Fig. 3), CASA (Computer Assisted Sperm Analysis), que han sido desarrollados inicialmente para su uso en el análisis de la motilidad del semen humano (Johnson et al., 1996). Estos sistemas computerizados posibilitan un análisis de la motilidad automático, rápido y objetivo (Anzar et al., 1991; Malmgren, 1997), basado en la evaluación de los espermatozoides individualmente, proporcionando un cálculo preciso de los distintos parámetros seminales (Verstegen et al., 2002).

Inicialmente su aplicación ha sido problemática en el semen de las especies animales, pero con las mejoras introducidas durante años, estos sistemas están siendo ampliamente utilizados en la investigación y en la industria (Johnson et al., 1996). Estos sistemas minimizan la subjetividad de la apreciación humana siendo particularmente ventajosos en situaciones de evaluación de un gran número de muestras o cuando existen frecuentes cambios de los técnicos del laboratorio (Tuli et al., 1992). Los trabajos de Farrell et al. (1998) indican que el porcentaje de células móviles detectadas por CASA ha sido más alto que el detectado subjetivamente, lo que sugiere que el sistema CASA proporciona una estimación más discriminatoria que los métodos subjetivos.

El concepto general subyacente a los sistemas de análisis de la motilidad espermática reside en la utilización de un microscopio de contraste de fases (contraste negativo), a partir del cual y por medio de una cámara de video se obtiene la imagen de la muestra y se digitaliza. A continuación, son aplicados varios algoritmos para analizar la motilidad espermática (Amann, 1989). Básicamente existen 2 tipos principales de sistemas CASA, uno que captura una secuencia de 20 imágenes en aproximadamente 0,8 segundos y analiza los movimientos del espermatozoide retrospectivamente y otro que opera en tiempo real en periodos de tiempo prolongados (Holt, 1996). Las mediciones de la cinética individual de cada espermatozoide están basadas en la hipótesis de que la motilidad espermática revela información acerca de la actuación funcional del axonema y de las membranas (Davies y Siemers, 1995). Los sistemas miden los movimientos de los espermatozoides en 10 parámetros diferentes y procesan los respectivos datos (Johnson et al., 1996). En comparación, resulta más exacto el análisis computerizado de una muestra que el realizado visualmente por distintos técnicos (Tuli et al., 1992). El CASA proporciona estimaciones de múltiples características del movimiento espermático con alta probabilidad de repetición (Farrell et al., 1998).

Fig. 3. Componentes de los sistemas utilizados en la evaluación computarizada de la motilidad espermática (CASA). Adaptado de Budworth et al. (1988). Este modelo necesitaba 2 monitores, uno donde visualizar las imágenes y otro para el ordenador; en la actualidad, únicamente con el monitor del ordenador pueden realizarse ambas funciones como sucede con la versión 2002.



Los valores de los parámetros del sistema son distintos para las distintas especies, debiendo éstos junto con el medio diluyente, los procedimientos y todos los factores

que afectan estar claramente adaptados a la especie y a las condiciones del procedimiento; debiendo corresponderse con las características particulares de los espermatozoides, su concentración, velocidad, tamaño y la temperatura (Verstegen et al., 2002).

Las desventajas de estos sistemas están, en resumen, relacionadas con los costes del equipo, la necesidad extrema de validación, el control de calidad y de la estandarización de las mediciones realizadas (Verstegen et al., 2002). La aplicación del CASA para evaluación de rutina en los laboratorios de reproducción animal sigue limitada por sus costes (Johnson et al., 1996).

Se reconoce que los sistemas CASA proporcionan datos fiables solo en un rango óptimo de concentración espermática, dado que en presencia de pocos espermatozoides el análisis es logísticamente impracticable mientras que, en presencia de demasiados surgen errores en la estimación de la concentración y de los movimientos, debido al cruzamiento de trayectorias de los espermatozoides (Irvine, 1995). Las muestras de semen fresco deben ser diluidas antes del análisis computerizado a fin de reducir la concentración de espermatozoides y así, permitir el análisis de las trayectorias individuales, de modo que el diluyente utilizado para reducir la concentración debe estar libre de partículas de tamaño semejante al tamaño de la cabeza del espermatozoide, para evitar su clasificación como espermatozoide inmóvil (Malmgren, 1997). El número de campos a analizar depende del número de espermatozoides por campo (Budworth et al., 1988), pero se considera de un modo general que aumentando el número de campos y de células analizadas incrementará la precisión de los resultados (Malmgren, 1997). Aumentando el número de campos se observa una disminución en el error estándar de parámetros como el porcentaje de espermatozoides móviles y de la velocidad lineal, pero parece no existir ventaja en analizar más de 200 espermatozoides por muestra (Budworth et al., 1988). Además, el técnico debe controlar la temperatura del equipo, del diluyente y del porta y eliminar o minimizar las potenciales fuentes de error como la presencia de detritus (Budworth et al., 1988). Estos equipos también pueden proporcionar la determinación de la concentración, proceso rápido y fiable (Anzar et al., 1991) que presenta una elevada correlación con la espectrofotometría (Farrel et al., 1998) y de la morfología (Coetzee et al., 1999). Se recomienda una adecuada dilución del semen para el cálculo de la concentración y así, evitarla presencia simultánea de 2 o más espermatozoides en el mismo punto (Anzar et al., 1991).

Algunos autores han observado cierta sobrestimación en el cálculo de la concentración que puede ser debida a las colisiones, ya que la evaluación correcta se obtuvo realizando los cálculos tras matar los espermatozoides con una solución hipertónica de NaCl al 9% (Verstegen et al., 2002). Al evaluar la concentración es necesario tener en cuenta determinados factores, ya que tanto el diluyente utilizado (su densidad y su previa ultrafiltración) como los valores del programa afectan significativamente a dicha estimación.

También el ligero movimiento de fondo causado por el movimiento de las células y el movimiento de la solución puede conducir al recuento de falsos espermatozoides móviles; esto puede evitarse diluyendo las muestras a la ratio más apropiada y utilizando una gota del volumen adecuado (Anzar et al., 1991). La cuestión de si las determinaciones computerizadas de la motilidad espermática pueden predecir el potencial fertilizante de una muestra mejor que los métodos convencionales necesita ser más investigado (Malmgren, 1997). La motilidad y la velocidad espermática (rectilínea y lineal, respectivamente) evaluadas por estos sistemas mostraron correlación con la fertilidad (índice de fertilidad competitiva, una medida de la fertilidad relativa) en el espermatozoide descongelado de toro (Budworth et al., 1988). En conclusión, la evaluación computerizada de la motilidad puede ser muy útil y con el perfeccionamiento en la detección de la imagen y en el análisis debe mejorar la medición de los atributos de la motilidad espermática.

4.5 Integridad de membrana

La integridad de la membrana espermática es un pre-requisito fundamental para el apropiado metabolismo y funciones espermáticas como la unión a la zona pelúcida, penetración y la fusión con el *oolemma* durante la fecundación (Rodríguez-Martínez, 1998). La importancia del mantenimiento de esta característica del espermatozoide se justifica por la incapacidad de la célula espermática para sellar o restaurar la integridad de la membrana cuando sufre daños (Den Daas, 1992).

La integridad de esta membrana es el requerimiento mínimo para que el espermatozoide sea móvil (De Leeuw et al., 1991). El espermatozoide con la membrana plasmática afectada no es capaz de mantener las concentraciones citoplasmáticas de iones y de co-factores esenciales como el nucleótido adenina, imprescindible para el movimiento flagelar. Es posible que algunas células inmóviles puedan aparentemente

mantener algún grado de integridad de la membrana por lo cual, son todavía capaces de excluir los marcadores que indican la muerte celular pese a que otras alteraciones hacen que esté inmóvil (De Leeuw et al., 1991). Por estos motivos, cuando la célula está fluorescente (marcada) puede ser calificada con toda seguridad como célula muerta; sin embargo, cuando la célula no adquiere fluorescencia se califica como célula viva, aunque esto no es tan seguro (De Leeuw et al., 1991).

La evaluación de la integridad de la membrana plasmática proporciona una valiosa información sobre los métodos de procesamiento del semen y la identificación de los puntos del proceso que más contribuyen a las alteraciones en la membrana del espermatozoide (Johnson et al., 1996). El grado de lesión de las membranas plasmática y acrosomal está relacionado con la fertilidad de la muestra procesada, pero solamente en los casos en que el daño sea extenso (Rodríguez-Martínez, 1998).

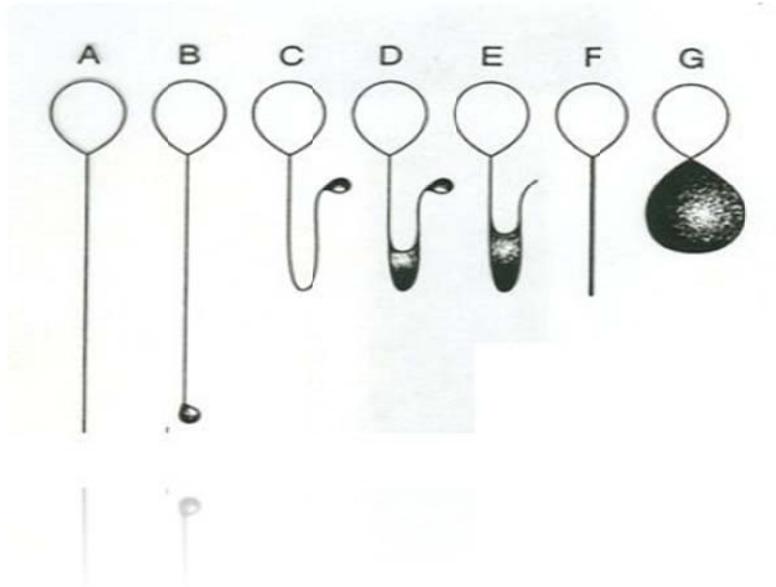
Una de las técnicas de valoración de la integridad de la membrana plasmática es la ausencia de inclusión de colorantes, porque la membrana esté íntegra; estas técnicas son conocidas como recuentos de vivos y muertos y para ellas se necesitan combinaciones de colorantes como eosina/nigrosina, eosina/nigrosina/Giemsa, Hoescht® 33258, carboxifluoresceína / yoduro de propidio, y SYBR-14/yoduro de propidio (Smith y Murray, 1997). En las 3 últimas técnicas de tinción mencionadas es necesario recurrir a la microscopía de fluorescencia. La presencia de glicerol en una muestra, en porcentajes que excedan el 4%, puede interferir con las tinciones vivos/muertos, haciendo disminuir los porcentajes de espermatozoides viables probablemente porque el glicerol induzca un aumento de la permeabilidad de la célula al colorante (Mixner y Saroff, 1954).

4.6. Funcionalidad de la membrana plasmática

La funcionalidad de la membrana puede ser evaluada por medio de la incubación de los espermatozoides en un medio hipo-osmótico, mediante el **test de endósmosis**. El influjo del agua al interior del espermatozoide provoca la hinchazón y el enrollamiento de la cola, indicativo de que el transporte del agua a través de la membrana se produce con normalidad, es decir, que la membrana está intacta y presenta una actividad funcional normal. El hinchamiento de la membrana es observado de modo especial en la membrana de la cola del espermatozoide, pues ésta es más distensible y está menos unida a las estructuras de soporte que la membrana de los otros compartimentos. La

respuesta a esta prueba está correlacionada con la capacidad del espermatozoide de penetrar los ovocitos.

Fig. 4. Prueba de endósmosis: Representación esquemática de los cambios morfológicos registrados en el espermatozoide humano tras someterlo a estrés hipoosmótico. A) endósmosis negativa, B-G) distintos tipo de cambios morfológicos en la cola del flagelo que se corresponden con una endósmosis positiva (Adaptada de Jeyendran et al., 1984)



4.7. Pruebas de funcionalidad mitocondrial

Existen pruebas para determinar la funcionalidad mitocondrial del espermatozoide. El objetivo de estas pruebas consiste en evaluar la capacidad y el ritmo de respiración de las mitocondrias espermáticas.

Entre las funciones de la mitocondria se destaca la producción de ATP mediante fosforilación oxidativa, ya que el ATP se considera necesario para la motilidad espermática (Silva y Gadella, 2006). Para determinar esta función mitocondrial se utilizan sondas fluorescentes como la rodamina 123 y recientemente otro tipo de sonda como la JC 1. Estas sondas determinan el potencial de membrana mitocondrial, al ser bombeadas activamente dentro de la mitocondria. Los espermatozoides que poseen un mayor potencial de membrana mitocondrial (mitocondria activa), bombean mayor cantidad de colorante dentro de su mitocondria (Gillan et al., 2005; Mocé y Graham, 2008).

A pesar de que estos test evalúan estructuras y funciones en la fisiología espermática, existen otra serie de procesos importantes ocurridos *in vivo* que este tipo de pruebas no pueden evaluar, y que actualmente son evaluados por pruebas de interacción entre gametos

4.8 Reacción acrosómica

Finalizada la capacitación espermática, tiene lugar la reacción acrosómica (RA), la cual está considerada como un proceso de exocitosis del acrosoma del espermatozoide, consecuencia de la fusión de la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa. Este proceso es indispensable para que el espermatozoide pueda atravesar la zona pelúcida. El tiempo requerido para su desarrollo varía en función de la especie y de las condiciones físicas y bioquímicas. Se conoce que un aumento del calcio intracelular desencadena el proceso de exocitosis de la RA (Breitbart et al., 1997).

La RA *in vivo* sucede cuando el espermatozoide interactúa con la zona pelúcida. En condiciones *in vitro*, la RA puede ser inducida artificialmente por la incubación de los espermatozoides en un medio definido o por la exposición a inductores de la RA. Se conocen numerosos inductores de la RA entre los que se incluyen la progesterona, el fluido folicular, las secreciones de las células del *cumulus*, el sulfato de esterol, los glicosaminoglicanos y el ionóforo de calcio (Gordon, 2003). Este último por sus características hidrofóbicas, es capaz de transportar iones Ca^{++} del medio externo a través de las membranas celulares e inducir un flujo de calcio hacia el interior del espermatozoide, y por consiguiente aumentar el calcio libre dentro de la célula, e inducir directamente la RA (Pereira et al., 2000).

4.9 Integridad del acrosoma

El espermatozoide eyaculado y fresco no puede experimentar la reacción acrosómica verdadera cuando es expuesto a inductores biológicos de la misma, debiendo primeramente sufrir el proceso de capacitación (Cross y Meizel, 1989). La capacitación espermática implica algunas alteraciones fisiológicas previas a la reacción acrosómica en la membrana del espermatozoide y es por tanto un pre-requisito para ella. La reacción acrosómica consiste en la fusión de la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática, resultando en la liberación del contenido acrosomal (Way et al., 1995). La capacidad para sufrir la reacción acrosómica resulta *in vivo* del contacto del

espermatozoide con la zona pelúcida (Harrison, 1998); pudiendo esta capacidad del espermatozoide para responder a los inductores de la reacción acrosómica ser utilizada como marcador de este estado fisiológico de capacitación (Cross y Meizel, 1989).

En el proceso de dilución, refrigeración y congelación queda particularmente afectada la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide, pero también la membrana de las mitocondrias, del acrosoma y el flagelo (Hammerstedt et al., 1990). Estos datos son significativos, teniendo en cuenta que el acrosoma contiene enzimas que desarrollan un papel crucial en la penetración de la zona pelúcida y en sus mecanismos celulares (Bedford, 1970). La desintegración del acrosoma derivada de la refrigeración y de la congelación es probablemente capaz de afectar a la habilidad fecundante del espermatozoide (Watson, 1975). La reacción acrosómica se produce tras la exposición a las condiciones ambientales del lugar de fecundación o tras la unión específica del espermatozoide a la zona pelúcida (Den Daas, 1992); así que el porcentaje de células que poseen un acrosoma intacto y que son aptas para exhibir reacción acrosómica, tras la debida estimulación, es una importante característica seminal (De Leeuw et al., 1991). Por tanto, es necesario evaluar correctamente el status acrosomal.

Entre otras tinciones utilizadas en la evaluación del acrosoma destacan el método Giemsa (Watson, 1975), la eosina/nigrosina, la eosina/nigrosina/Giemsa, el Hoescht® 33258 y las lectinas como el *Pisum sativum* (PSA) asociado a la fluoresceína FITC (isotiocianato de fluoresceína), de las cuales las 2 últimas exigen el uso de la microscopía de fluorescencia.

De Leeuw et al. (1991) sugieren una técnica de tinción que incluye el marcador deviability celular fluorescente, Hoechst® bisbenzimidaz 33258, recurriendo para su visualización a la microscopía de fluorescencia, asociada al microscopio de contraste de fases para observación del acrosoma, permitiendo así la diferenciación entre reacción acrosómica verdadera de la pérdida degenerativa de las membranas acrosomales *postmortem*.

La mayor ventaja de esta técnica es, según los autores, que puede ser utilizada en muestras congeladas/ descongeladas sin utilizar las técnicas habitualmente utilizadas en la evaluación del status acrosomal que, frecuentemente, exigen centrifugación para remover el diluyente o el colorante y por otra parte, no se realiza la tinción en portas que puede provocar, debido a las sucesivas inmersiones, una mayor pérdida en espermatozoides vivos.

Un asunto de considerable interés es saber si es suficiente una única prueba laboratorial o si es necesaria la combinación de varios análisis para la evaluación de una muestra, dado que el examen de la integridad acrosomal exige equipamiento adecuado y es más lento que la evaluación de la motilidad (Berndtson et al., 1981). En los trabajos de Kjaestad et al. (1993) no se verificó correlación entre motilidad e integridad acrosomal, ni entre este último parámetro y la fertilidad *in vivo*. Los trabajos de Berndtson et al. (1981), igualmente en semen congelado y descongelado, también constataron que la motilidad y la integridad acrosomal representan características distintas de la integridad del espermatozoide que varían de manera independiente. De este modo, ninguna de las pruebas puede ser utilizada en sustitución de otra. Saacke (1983) observó que los daños en la integridad acrosomal experimentados por los espermatozoides durante la congelación y la descongelación podrían estar latentes en el momento de la descongelación, evidenciándose el rápido deterioro del acrosoma entre 2 y 4 h de incubación a 37°C, a diferencia de la motilidad que sufrió antes de las 2-4 h una dramática disminución. Este autor recomienda el uso combinado de pruebas, que denomina de “características irreversibles”, como son la observación de la integridad de la membrana y del acrosoma conjuntamente con la motilidad, a fin de evitar errores de apreciación de los métodos de preservación.

Por su parte, Harrison y Vickers (1990) evidenciaron que el status acrosomal en el espermatozoide de cerdo y morueco no refleja el estado de la membrana plasmática, existiendo más células con membrana plasmática intacta que con acrosomas intactos.

En el espermatozoide de morueco la integridad de la membrana se correlacionó más con la motilidad visual, lo que no ocurrió en el cerdo.

5. DIÁMETRO TESTICULAR

El diámetro testicular del carnero sufre variaciones estacionales determinadas, tanto por modificaciones del fotoperiodo cuanto de la temperatura media, oscilación térmica diaria y humedad relativa. El momento del aumento y disminución en el diámetro testicular en carneros, en función de la estación del año, varía entre razas, demostrando también una interacción entre raza y estación para la producción espermática.

El tamaño de los testículos ha demostrado ser un buen indicador de la capacidad espermatogénica de un semental, como lo atestiguan numerosos trabajos realizados en diferentes especies, principalmente la bovina (Blockey, 1989), a punto tal que en esta

especie se tiene en cuenta como criterio de selección y constituye ya una práctica corriente (De la Vega, 1998). La medida más práctica para evaluar el tamaño de los testículos es la circunferencia escrotal (CE), la cual tiene una alta correlación con el peso y el volumen testicular (Glauber, 1990). A su vez, el peso testicular está en función directa con la cantidad de tejido parenquimático productor de esperma y, por lo tanto, con el volumen y la concentración espermática del eyaculado (Barbosa et al., 1991). Así una selección por mayor CE se traducirá en una producción seminal más rica en espermatozoides.

6. ANALISIS DE TESTOSTERONA

El radioinmunoensayo (RIA) permite la cuantificación exacta de compuestos biológicos presentes en el organismo en concentraciones muy bajas como ng/ml o incluso pg/ml. El RIA es una técnica inmunológica propuesta en 1959 por Yallow y Berson que se basa en una reacción antígeno anticuerpo donde uno debe producir un anticuerpo específico contra la sustancia que queremos determinar y tener gran afinidad. Ese antígeno es la hormona que queremos determinar, a este también se lo llama Antígeno Frío (Hormona Natural); además a la muestra se le añadirá otro antígeno con una cantidad constante y conocida, a este se lo conoce como Antígeno Caliente (Hormona Radioactiva). Se toma una pequeña cantidad de este anticuerpo, que se mezcla con cierta cantidad de líquido extraído del animal y en el que existe la hormona objeto de la medición (suero, plasma, orina, saliva), luego se mezcla simultáneamente con una cantidad adecuada de la hormona patrón purificada que se ha marcado con un isótopo radioactivo. Estos competirán en igualdad de condiciones para unirse con el anticuerpo altamente específico a la hormona. La cantidad de hormona que se une al anticuerpo será proporcional a su concentración en el líquido evaluado. Cuando la unión ha alcanzado el equilibrio, se separa el complejo anticuerpo-hormona del resto de la solución, y la cantidad de hormona marcada que se ha unido al complejo se mide por medio de un contador de centelleo. Si la cantidad de hormona radioactiva ligada al anticuerpo es elevada significa que solo existía una pequeña cantidad de hormona natural para competir con la radioactiva, pero si solo se une una pequeña cantidad de hormona radioactiva, la cantidad de hormona natural es elevada. Para cuantificar se realiza soluciones patrones de distintas concentraciones de la hormona sin marcar, para

posteriormente trazar una curva patrón, en la cual se extrapolan los valores obtenidos de la muestra.

7. CARACTERISTICAS PRODUCTIVAS DE LA REGIÓN PATAGÓNICA ARGENTINA

La Argentina se extiende por más de 33° de latitud entre su extremo norte, la confluencias de los ríos Grande de San Juan y Mojinete, a 46°21'S y el punto más austral del territorio continental argentino, el cabo San Pio, en la isla Grande de Tierra del Fuego, a 55°03' S. A su vez, se extiende de este a oeste por 20° de longitud, desde la localidad de Bernardo de Irigoyen, en la provincia de Misiones, a 53° 35' O y el Cordón Mariano Moreno de los Andes Patagónicos en la provincia de Santa Cruz, a 73° 38' O. Argentina cuenta con dos regímenes pluviales, el Atlántico y el Pacífico. El primero penetra desde el este y el noreste y cubre la mayor parte del norte y centro del país, y al tener mayor penetración en verano, provoca mayores lluvias en esa época.

El régimen del Pacífico procede del oeste, y produce precipitaciones en la cordillera y la Patagonia, preferentemente en invierno.

Las temperaturas guardan su obvia distribución latitudinal y altitudinal, con medias de alrededor de 23° en el norte de Formosa y de 5°C en sur de Tierra del Fuego.

La producción ovina es, sin duda, la principal actividad agropecuaria de la región patagónica concentrando más del 60% de las existencias ovinas del país. La zona norte de la región se encuentra dedicada principalmente a la producción de lana fina siendo la producción de carne un complemento que solo en algunas áreas agro ecológicas alcanza a un 40 ó 50% de los ingresos de la empresa. Por su parte en el extremo sur de la Patagonia predominan los sistemas de producción doble propósito carne/lana crusa o crusa fina, con una importante participación de los ingresos por venta de animales.

Si se analiza el mercado de carne ovina internacional, se observa que se presentan condiciones favorables para la comercialización de las carnes patagónicas en el mercado, debido a su calidad intrínseca y al status sanitario (libre de aftosa) que posee la región.

El mercado externo muestra un escenario de demanda firme de carne ovina para los próximos años. En este contexto la Argentina presenta además un mercado interno con una demanda insatisfecha, ya que en los últimos años la gran mayoría de los excedentes de corderos se exportan, haciendo más difícil aún adquirir corderos en la región. El

crecimiento del turismo y la gastronomía, tanto en la región como en otras provincias del país han transformado al cordero en un producto reconocido y valorado.

Si bien la dicotomía entre producción de carne y lana fina es un concepto instalado, ejemplos en otros países demuestran que es posible desarrollar razas doble propósito capaces de producir, en determinadas condiciones o ambientes, ambos productos (carne y lana fina).

Para abordar este antagonismo Suráfrica desarrolló la raza Dohne Merino. Si bien no presenta la especialización de la raza Merino en la producción de lana, esta raza podría adaptarse para la producción de carne en áreas de mayor potencial forrajero de la Patagonia, permitiendo así incrementar la producción de carne sin afectar significativamente el diámetro de la lana. Esto posibilitaría, en algunos casos, continuar con sistemas de producción de lana fina, que maximizarían beneficios económicos con mayores ingresos por venta de carne

8. RAZA DOHNE MERINO

Según Scott (1997), hay una clasificación de las razas ovinas de acuerdo a la duración de su época reproductiva que las denomina como:

- a) Razas con estación reproductiva larga como la Rambouillet, Merino, Dorset, y razas exóticas que se han desarrollado en regiones ecuatoriales.
- b) Razas con estación reproductiva corta o restringida; Southdown, Cheviot, Shropshire, y razas de lana larga que se originaron en Inglaterra y Escocia.
- c) Razas con estación reproductiva intermedia; Suffolk, Hampshire, Columbia, Corriedale, y todos los cruces que involucren ovejas de lana fina.

El Dohne Merino (Fig. 5) es una raza doble propósito (lana/carne), con lana fina de buena calidad (menos de 22 micras) y alta producción de cordero, desarrollada por el Departamento de Agricultura de Suráfrica usando ovejas Merino Peppin y carneros Merino alemán de carne. Las progenies se volvieron a cruzar entre ellas y fueron seleccionadas por alta fertilidad, rápidas tasas de crecimiento de los corderos y lana merino fina, en condiciones comerciales de campo natural. El programa de mejora comenzó en 1939 y la Sociedad de Criadores se formó en 1966. La selección, desde 1970, se ha realizado con la ayuda de tests de *performance*, pruebas de progenie y registros de producción; todos los animales testados son mantenidos en un esquema computarizado de registros. El Dohne es hoy una de las razas laneras líderes en

Suráfrica y de notable crecimiento en Australia. Su alta prolificidad (1,10-1,50 corderos/parto) se combina con altas tasas de crecimiento de los corderos (350 g/día hasta el destete) haciendo del Dohne un productor de carne muy eficiente.

Los corderos para sacrificio alcanzan normalmente pesos de venta de al menos 40 kg entre los 4 y 6 meses de edad. Los pesos de las ovejas adultas varían entre 55 y 65 kg dependiendo del ambiente. Las ovejas producen entre 4 y 6 kg lana de 19 a 22 micras de muy alta calidad.

Fig.5 Morueco raza Dohne merino



OBJETIVOS

Está demostrado el efecto de la melatonina exógena sobre el desarrollo folicular y la tasa de ovulación, ya que dicha hormona aumenta el número de folículos ovulatorios debido a una disminución del proceso de atresia de los folículos pequeños y medianos presentes en la onda folicular previa a la ovulación (Bister et al., 1999; Noël et al., 1999). Por tal motivo consideramos que bajo esta premisa, un tratamiento de superovulación para la producción de embriones in vivo en ovejas con implantes de melatonina exógena posibilitaría una mayor producción de embriones viables, mejorando la tasa de ovulación. Por tal motivo el primer experimento tiene como objetivo evaluar el estudio del efecto de la melatonina exógena sobre la actividad ovárica y la calidad embrionaria en tratamientos superovulatorios de ovejas donantes de embriones de la raza Dohne Merino, tanto en estación reproductiva como en anestro estacional.

Como en el caso de la hembras, la utilización de implantes de melatonina en machos disminuye el grado de anestro estacional que, aunque en éstos es poco marcado, se refleja en un déficit de las aptitudes reproductivas. Así, se ha comprobado el efecto de los implantes de melatonina en moruecos para mejorar la producción y calidad del esperma en centros de inseminación artificial (Beltrán de Heredia, 1995; Alcaide et al., 2001). La aplicación del tratamiento en moruecos parece incrementar la libido (Bravo y Roy, 2003) y los índices reproductivos de las ovejas cubiertas por los machos implantados (García Pastor et al., 2004). No hay información del efecto de los implantes de melatonina en latitudes superiores a 40° en hemisferio sur, ni en raza Dohne Merino; por tal motivo, *el estudio del efecto de la melatonina exógena sobre los parámetros de calidad seminal en muestras de semen fresco y descongelado en moruecos raza Dohne Merino* ha sido **el objetivo del segundo experimento** del presente trabajo.

Por último y de acuerdo con lo revisado por Abecia et al. (2011), que indican el tratamiento con melatonina se asocia con una disminución significativa de la proporción de ovejas no cíclicas que responden al efecto macho y una notable mejora de los parámetros reproductivos, y sin datos de este tipo de experiencias en Argentina, se plantea como **objetivo de este tercer experimento** *evaluar los efectos de la melatonina exógena sobre los índices reproductivos de hembras en anestro estacional bajo un manejo netamente extensivo*

MATERIALES Y METODOS

**EXPERIMENTO 1. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON MELATONINA
EXÓGENA SOBRE LA PRODUCCION DE EMBRIONES *IN VIVO* EN
ESTACION REPRODUCTIVA Y EN EL PERIODO DE ANESTRO
ESTACIONAL SOBRE OVEJAS DOHNE MERINO**

Este experimento se desarrolló en el laboratorio de reproducción animal de la estación experimental de INTA de la ciudad de Trelew, provincia del Chubut (43°S 65°O) en el laboratorio de reproducción de INTA habilitada por SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria de Argentina) en dos años sucesivos y en diferentes periodos de estación sexual.

1.1. Animales

La primera experiencia del experimento 1 se realizó en estación reproductiva utilizando 22 ovejas adultas de raza Dohne Merino, llevándose a cabo entre los meses de febrero y abril de 2010.

Los animales fueron divididos en 2 lotes homogéneos de 11 ovejas; el lote M (melatonina) recibió un implante subcutáneo de melatonina de 18 mg (Melovine, Ceva Salud Animal, Barcelona, España) por oveja y el lote C (control) no recibió ningún implante.

La segunda experiencia del experimento 1 fue realizada en anestro estacional, entre septiembre y noviembre del año 2012, en un lote de 12 ovejas Dohne Merino; 6 de ellas (lote M) recibieron un implantes de melatonina y las otras 6 no recibieron implantes y se utilizaron como control (lote C).

1.2. Tratamiento de superovulación

Para ambas experiencias los protocolos de trabajo fueron similares (Fig. 6). Los implantes fueron colocados 48 días antes del inicio del tratamiento superovulatorio. Como tratamiento de sincronización de celo se utilizaron esponjas intravaginales impregnadas de acetato de medroxiprogesterona (60 mg; Progoston, Syntex, Buenos Aires, Argentina), colocadas 37 días después de la colocación del implante de melatonina. A los 6 días de colocada la esponja se realizó un recambio de la misma y se inyectaron 3,7 mg de cloprostenol (Ciclase, Syntex, Buenos Aires, Argentina).

Sesenta y dos horas antes de la retirada de esponja se comenzó con el tratamiento superovulatorio consistente en 8 dosis decrecientes de FSH porcina (Folltropin, Bioniche, Armidale, Australia), con un total de 256 mg equivalentes a 12,8 ml por animal.

Las esponjas intravaginales se mantuvieron durante 14 días y el día de la extracción se inyectó 200 UI de eCG (Novormon, Syntex, Buenos Aires, Argentina).

Se detectaron los celos con moruecos provistos de mandil cada 6 h a partir de las 12 h de extracción de las esponjas y se realizaron dos inseminaciones intrauterinas (IAIU) por ovejo donante de embriones, a tiempo fijo, con semen descongelado previa evaluación de la calidad seminal. Las inseminaciones se realizaron a las 33 y 48 h de la retirada de las esponjas por vía laparoscópica, previa aplicación de 0,2 ml de xilacina intramuscular para tranquilización y relajación del animal (Fig. 7).

A los 58 días de colocado el implante se realizó la recuperación embrionaria.

Fig. 6. Esquema del protocolo aplicado para la superovulación de ovejas Dohne Merino. IAIU: Inseminación artificial intrauterina

Día	Mañana (8 am)	Tarde (18 pm)
-37	Colocación de implantes de melatonina Lote M	
0	Colocación de esponjas	
6	Recambio de esponja + Cloprostenol 3,7 mg	
11		48 mg FSH
12	48 mg FSH	36 mg FSH
13	36 mg FSH	24 mg FSH
14	24 mg FSH+ extracción de esponjas+ 200 UI eCG.	20 mg FSH+ detección de celo
15	20 mg FSH+ detección de celo	IAIU
16	IAIU	
19		Ayuno
21	Recuperación Embrionaria	

1.3. Recuperación de embriones

La recuperación de embriones se realizó mediante laparotomía, lavando el útero con una solución de lavado comercial (Bovipro, Minitube, Verona, Estados Unidos) a través de una sonda Foley a los 6 días tras la retirada de las esponjas (Fig. 8). Previamente, las ovejas se sedaron con una inyección intramuscular de 0,5 ml de Xilacina al 2% (Rompún, Bayer, Buenos Aires, Argentina), anestesiándose en forma parenteral con una inyección intravenosa de 6 ml de Ketamina (Ketamina 50, Holliday Scott, Buenos Aires, Argentina). Este protocolo permitió mantener la anestesia durante todo el tiempo de la recuperación de embriones.

Fig.7 Aplicación de anestésico



Fig. 8. Incisión para lavado de útero.



El animal se colocó sobre una camilla de sujeción en decúbito dorsal con una inclinación anteroposterior de 30-45°. Se afeitó, se lavó cuidadosamente el campo operatorio y se desinfectó con yodo. Se realizó una incisión de 5-7 cm del abdomen a nivel de la línea blanca por delante de la ubre, para permitir la exteriorización de los ovarios y cuernos uterinos y contar los cuerpos lúteos para contrastar la respuesta ovulatoria (Fig. 8).

Fig. 9. Observación de la tasa de ovulación



Fig. 10. Búsqueda de embriones



El lavado de cada cuerno se realizó separadamente. Se efectuó una punción en la base del cuerno, a nivel del ligamento intercornual, por la cual se introdujo una sonda Foley número 8. Así, la luz uterina se obstruyó por el inflado de la ampolla situada en el extremo del catéter. En el extremo opuesto del cuerno, cerca de la unión útero-tubárica, se realizó una segunda punción para introducir un catéter en la luz uterina por el cual se inyectó el medio de lavado (20 ml a 37°C) que se recuperó en el extremo opuesto del cuerno a través de la sonda Foley en una placa de Petri.

Una vez terminado el lavado de los dos cuernos, se reintrodujo el tracto en la cavidad abdominal, y se lavó con una solución fisiológica con heparina al 2,5% para evitar las adherencias, aplicándose antibióticos en la zona para evitar las infecciones. Se suturó el peritoneo y la capa muscular con una sutura reabsorbible, y finalmente se cerró la piel con suturas no absorbibles. A los animales se les inyectó un antibiótico y un anti-inflamatorio vía intramuscular así como prostaglandina (1 ml Cloprostenol, Syntex, Buenos Aires, Argentina) vía intramuscular para inducir la regresión de los cuerpos lúteos existentes y evitar la implantación de los embriones no recuperados.

Los embriones se identificaron y evaluaron mediante una lupa binocular a 20 y 40 aumentos (Fig. 10), de acuerdo a su estadio de desarrollo y a su morfología (Wintenberger-Torres y Sevellec, 1987), de manera que se consideraron como viables las mórulas compactas y los blastocistos jóvenes, expandidos y eclosionados (Forcada et al., 2006), siempre y cuando no tuvieran imperfecciones y mostraran una forma esférica y simétrica, de acuerdo con los criterios de valoración morfológica de Linder y Wright (1983). Por lo demás, y dado que tanto los blastocistos (Széll y Windsor, 1994;

Naitana et al., 1995; 1997) como las mórulas compactas (Martinez y Matkovic, 1998) mantienen una muy buena viabilidad tras la congelación, ambos estadios, excepto los blastocistos totalmente eclosionados, fueron considerados aptos para ser conservados mediante la citada técnica.

1.4. Análisis estadístico

Los parámetros evaluados en este ensayo fueron los siguientes:

- Hora de salida en celo tras la retirada de la esponja.
- Tasa de ovulación: número de cuerpos lúteos
- Número de estructuras recuperadas tras el lavado del útero
- Número de embriones
- Número de embriones viables: mórulas compactas y blastocistos, incluso los totalmente eclosionados.
- Número de embriones congelables: mórulas compactas y blastocistos, excepto los totalmente eclosionados
- Tasa de recuperación (% embriones recuperados en relación a tasa de ovulación)
- Tasa de fecundación (% de embriones en relación a recuperados)
- Tasa de viabilidad (% embriones viables en relación a recuperados)
- Tasa de congelabilidad (% embriones congelables en relación a recuperados).

Todos los valores anteriores fueron expresados como media \pm E.S. para cada grupo, y entre grupos y recuperaciones sucesivas dentro de cada grupo fueron comparados mediante análisis de varianza, siendo los factores comparados el tratamiento o no con melatonina y la estación.

EXPERIMENTO 2. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON MELATONINA EXÓGENA A LO LARGO DEL FOTOPERIODO CRECIENTE SOBRE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD SEMINAL DE MORUECOS DE RAZA DOHNE MERINO.

Este experimento se desarrolló en el laboratorio de reproducción animal de la estación experimental de INTA de la ciudad de Trelew, provincia del Chubut (65° de longitud Oeste y a los 43° de latitud Sur) en el laboratorio de reproducción de INTA habilitada por SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria de Argentina), entre los meses de septiembre a diciembre de los años 2011 y 2012.

2.1. Animales y tratamientos

La primera experiencia se realizó con un lote de 20 moruecos raza Dohne Merino, divididos en 2 grupos homogéneos: uno de los lotes (n=10) fue tratado el 1 de septiembre de 2010 con 3 implantes de melatonina por macho (lote M), siendo el resto (n=10) el lote no tratado, control (lote C). La segunda experiencia fue realizada entre septiembre y diciembre del año 2012, con moruecos entre las razas Merino y Dohne Merino.

Estudiando las mismas variables que en la primera experiencia se utilizaron 24 moruecos, 12 raza Dohne Merino a los cuales a 6 se les colocó 3 implantes subcutáneos de melatonina (lote M) y los otros 6 se tomaron como control (lote C) y 12 moruecos raza Merino con similar tratamiento que el anterior. Como se mencionó anteriormente el protocolo de trabajo fue similar en ambos experimentos.

2.2. Protocolo experimental

El mismo día del tratamiento se comenzó con la toma de datos de medición del perímetro escrotal, CC y extracción de sangre para determinación de niveles plasmáticos de testosterona. Estas determinaciones se obtuvieron en forma quincenal.

Los animales se mantuvieron estabulados con una adecuada dieta de heno de alfalfa, maíz y alimento balanceado, para cubrir sus necesidades de mantenimiento.

A partir de los 30 días de la colocación de los implantes y durante 10 semanas los moruecos fueron sometidos en forma semanal a la extracción de semen para evaluación de calidad seminal.

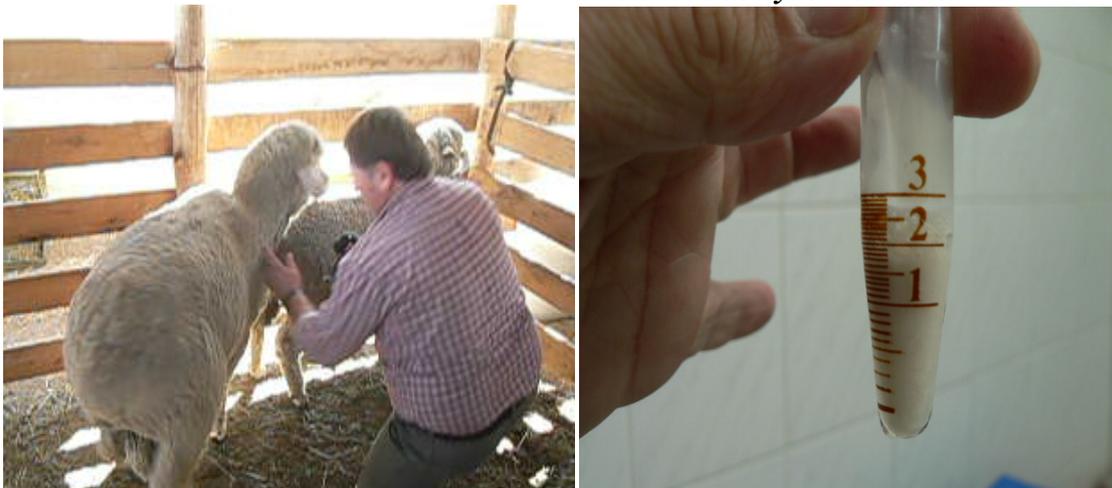
2.3. Obtención de semen

Para la extracción de semen se utilizó una oveja estrogenizada con 0,25 ml de estradiol (Konig, Buenos aires, Argentina) dos veces por semana para estimular la libido de los moruecos (Fig. 11).

Se utilizó una vagina artificial la cual proporciona estimulación térmica y mecánica para provocar la eyaculación. La vagina se cargó con 150 ml de agua a 50 C° permitiendo una temperatura interior de 38-40°C.

Antes de cada extracción se realizó la limpieza de la zona inguinal y prepuberal del morueco para no contaminar la colecta. La muestra era recogida en un tubo de vidrio de 3 ml graduado y templado para evitar pérdidas de espermatozoides por shock térmico (Fig. 12).

Fig.11 Momento de extracción de semen **Fig. 12. Tubo colector para determinación de volumen de eyaculado**



2.4. Evaluación de calidad seminal

2.4.1 Volumen del eyaculado

La determinación del volumen se efectuó mediante la observación directa de la graduación marcada en el tubo de colecta con una precisión de 0,1 ml.

2.4.2. Motilidad masal microscópica

La evaluación de la onda de movimiento espermático, comúnmente denominada MMm se llevó a cabo utilizando una escala subjetiva de 0 a 5, donde cada valor corresponde a la siguiente descripción:

0. Ausencia de ESPZ móviles
1. Algunos ESPZ se mueven en su sitio
2. Presencia de ESPZ móviles, pero insuficiente cantidad como para formar ondas
3. Presencia de ondas o remolinos muy lentos (50-70% ESPZ móviles)
4. Las ondas o remolinos se forman rápidamente (70-90% ESPZ móviles)
5. Velocidad de formación de ondas extremadamente alta (>90% ESPZ móviles)

Para esta determinación, se descargó una alícuota de 6 μ l del eyaculado sobre un portaobjetos colocado sobre una platina térmica a 37 °C. Se utilizó un microscopio óptico utilizando un aumento de 40x y se evaluó la zona ubicada en el borde de la gota.

2.4.3. Concentración espermática (millones de espermatozoides/ml)

Se realizó haciendo una dilución del semen y contando en cámara de Neubauer:

Recuento en Cámara de Neubauer

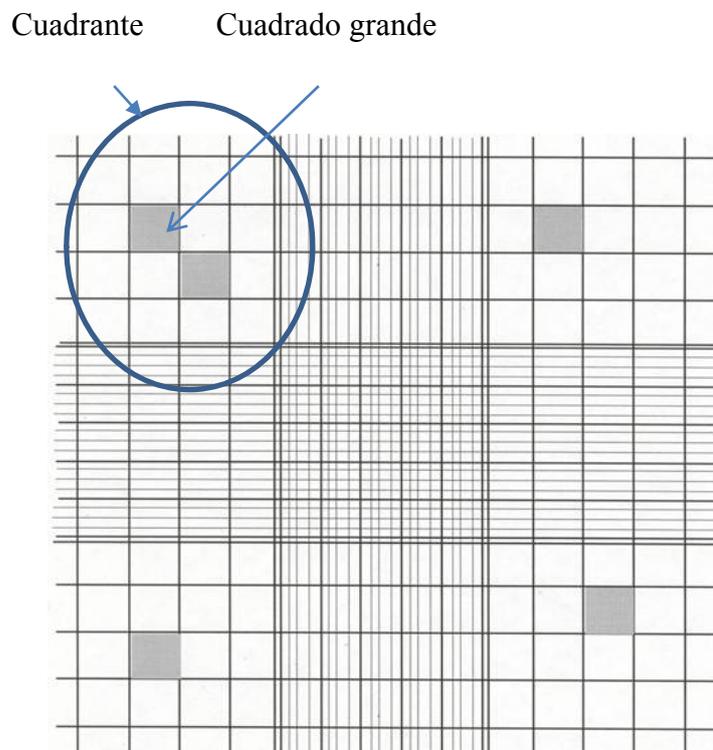
La cámara de recuento consta de una pieza de vidrio en la que se encuentra labrado el cuadrulado en que se depositará el material a contar. Se cuentan los espermatozoides en los cuadrados grandes, en cada uno de los cuadrantes (Fig. 6). Las dimensiones de los cuadrantes de 1 mm de lado por 0,1 mm de profundidad, determinan un volumen de 0,1 mm³.

El recuento en cámara se llevó a cabo a través de los siguientes pasos:

- La cámara se carga con una muestra de semen, diluida en agua 400 veces, (5 μ l de semen en 2 ml de agua).

- Una vez cargada la cámara y habiendo verificado que su carga es homogénea, contamos el número de espermatozoides en un cuadrado grande por cada cuadrante. En uno de los cuadrantes elegido al azar, se realiza el conteo de espermatozoides en 2 cuadrados grandes, contándose en total 5 cuadrados grandes. En el diagrama y en gris, se ejemplifica la elección de los 5 cuadrados grandes donde se realizó el conteo espermático.

Fig. 13. Cuadrícula de recuento de espermatozoides en cámara de Neubauer



- La concentración de espermatozoides/ml se calcula multiplicando la suma de los espermatozoides contados en los 5 cuadrados grandes por 12.800.000 que es una constante que se obtiene por cálculos de dilución de seme, volúmenes de los cuadrados, cantidad de cuadrados en cada cuadrante y conversión de mm^3 a cm^3 .

Por lo que la fórmula definitiva es la siguiente:

Dilución 1:400

Espermatozoides/ml: $\frac{\text{Suma de esperm.} \times 0.1 \text{ mm}^3 \times 10.000 \text{ ml/mm}^3 \times 400 \times 16}{5}$

Espermatozoides/ml: Suma de esper.x12.800.000

2.4.4. Porcentaje de espermatozoides vivos y muertos (Eosina-Nigrosina)

Inmediatamente tras la obtención del semen se realiza una dilución de 2 µl de semen en 20 µl de citrato de sodio al 2,9 % para poder realizar bien el conteo. Se toma una muestra de 3 µl de esa dilución y se mezcla rápidamente con 3 µl del colorante eosina/nigrosina a 37 C°, se homogeniza durante 1min y se realiza un frotis.

Se observa a microscopio realizandoun conteo de un total de 200 células en varios campos, los espermatozoides con el acrosoma teñido son aquellos que presentan una membrana alterada, mientras que los espermatozoides vivos se observan de color blanco (Fig. 14).

Fig. 14. Tinción de eosina/nigrosina para ver permeabilidad de membrana.



2.5 Circunferencia escrotal

Esta determinación se realizó con el animal en pie con el uso de una cinta métrica metálica, sujetando el escroto del morueco, colocando los testículos en el fondo de la mano y midiendo su tamaño en el punto medio de mayor circunferencia. Las mediciones se registraron en cm.

2.6. PV y CC.

Se realizó una palpación de la zona lumbosacra para medir el grado de engrasamiento y desarrollo muscular. El rango utilizado para realizar la condición corporal (CC), varía entre 0 y 5 (Rusel et al., 1969) Una CC igual a 0 corresponde a un animal extremadamente flaco próximo a la muerte y la CC igual a 5, a un animal con un grado de engrasamiento excesivo.

Tras la medición de la CC los animales pasaban a la balanza de peso para tomar la medida en kg.

2.7. Congelación de semen para evaluación de calidad seminal al descongelado

Entre los 60 y los 70 días de colocado el implante se realizó la congelación del semen de cada animal que respondió a la extracción del material para evaluar la calidad del mismo al descongelado.

Tras la evaluación de la calidad seminal se incorporó al semen la preparación del diluyente. El mismo se realizó utilizando 10 ml de diluyente comercial triladyl, 30 ml de agua bidestilada apirógena estéril y 10 ml de yema de huevo.

Una vez procesadas la muestra para obtención de datos de calidad seminal se colocó el diluyente al mismo volumen de semen obtenido, esta adición nos permitió mantener el semen el tiempo que nos lleve realizar los cálculos de diluciones y no perder calidad de la muestra.

Se calculó la cantidad de espermatozoides totales en la muestra multiplicando la concentración espermática por el volumen de semen obtenido, a través de esto pudimos estimar las dosis a congelar estimando una concentración de 100 millones de espermatozoides por pajuela. Teniendo en cuenta que cada pajuela tiene un volumen de 0,25 ml se calculó el volumen total de la dilución. Finalmente para la colocación del

volumen final del diluyente se restó el volumen de semen y la cantidad de diluyente colocado al final del procesamiento del mismo.

Cálculo de diluyente:

- Concentración espermática x volumen de semen: Espermatozoides totales
- Numero de dosis : $\frac{\text{Espermatozoides totales}}{100.000.000 \text{ (esper./pajuela)}}$
- Numero de dosis x 0,25 ml (volumen de pajuela) : $\frac{\text{Volumen total}}{\text{(Semen+ Diluyente)}}$
- Volumen total –volumen de semen: Volumen del diluyente.

Un vez colocado el diluyente se procedió al descenso de temperatura de 37 C° a 6 C°, bajando 3 grados de temperatura cada 2 minutos. Posteriormente se mantuvo durante 24 h en nevera a 6° C para que se estabilizara la muestra con el crioprotector y se realizó la carga en pajuelas de 0,25 ml rotuladas y selladas con alcohol polivinilico.

Las pajuelas se congelaron en vapores de nitrógeno líquido a 20 cm de altura del nitrógeno durante 2 minutos y a 9 cm durante 3 minutos, a partir de allí se dejan en el nitrógeno líquido.

2.8. Análisis del semen descongelado

2.8.1. Movilidad espermática total (MET)

Este método consiste en visualizar y estimar subjetivamente la proporción (%) de ESPZ móviles, mediante la observación de al menos 2 campos microscópicos, utilizando un microscopio óptico (400x). Para ello, se colocó una alícuota de 6 µl de cada pool de semen entre porta y cubre objetos sobre una platina térmica a 37°C.

2.8.2 Movilidad individual rectilínea progresiva (MIP)

Esta técnica consiste en visualizar y estimar subjetivamente la proporción (%) de ESPZ móviles con desplazamiento de avance.

Para realizar esta determinación se descargó una alícuota de 6 µl de cada pool entre porta y cubreobjetos y se observó en un microscopio óptico (400x).

2.8.3 PRUEBAS DE FUNCIONALIDAD ESPERMÁTICA

Integridad de la membrana plasmática (MP)

Las muestras de semen fueron coloreadas con eosina y nigrosina, según una modificación del método descrito por Mortimer (1994) igual a la evolución del semen fresco.

Funcionalidad de la membrana plasmática del compartimiento flagelar (HOS Test) (Fig. 15)

Esta metodología se denomina prueba Hipoosmótica (Prueba HOS; Hypoosmotic Sweeling Test). El fundamento de la misma se basa en el aumento de volumen que experimentan las células espermáticas con MP del compartimiento flagelar intacta cuando son sometidas a un choque osmótico al diluir la muestra en un medio hipotónico. Dicho aumento de volumen se debe a la entrada de agua a la célula, la cual provoca la expansión de las membranas en un intento de las mismas por resistir la diferencia de presión osmótica entre el medio intra y extracelular. De este modo, la disminución de la relación entre superficie y volumen provoca el enrollamiento del flagelo del ESPZ.

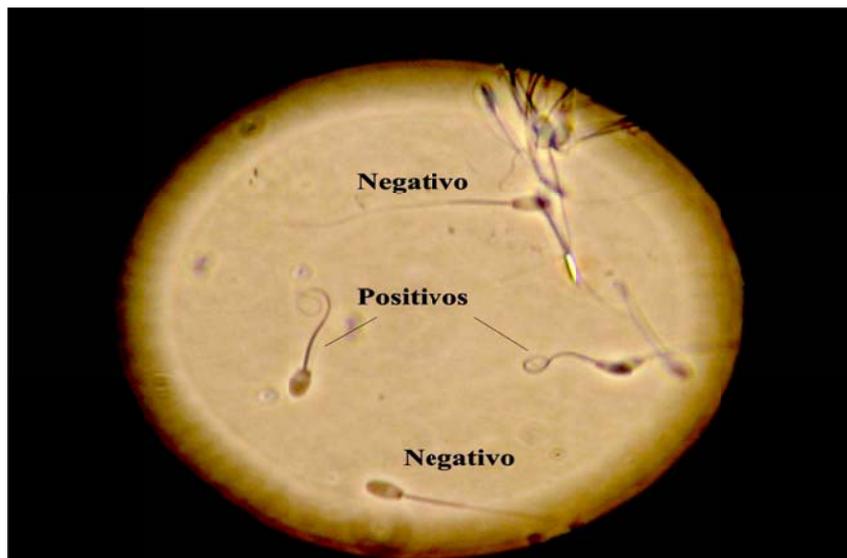
Para el estudio de la funcionalidad de la MP del compartimiento flagelar se utilizó un método basado en el descrito por Jeyedran et al. (1984) para la especie humana, adaptado al estudio de semen de ovino por García Artiga (1994). La prueba HOS se llevó a cabo como se describe a continuación:

- Se incubó en baño maría a 37°C, durante 30 min., una alícuota de 20 µl de semen en 500 µl de un medio hipoosmótico ajustado a 100 mOsm/l (ver Anexo).
- Transcurrido ese tiempo, se agregaron 50 µl de una solución HOS stop (ver Anexo) para detener la reacción.
- Para su determinación se colocó una gota (6 µl) entre porta y cubreobjetos, y se determinó microscópicamente (400x) el porcentaje de células

positivas (ESPZ con flagelo enrollado = HOS +) contando un máximo de 200 células.

- Se consideraron negativos los casos en que el flagelo se mostró recto o en forma de látigo.

Fig. 15. Espermatozoides sometidos a la prueba HOS. ESPZ negativos (membrana no funcional) y ESPZ positivos (membrana funcional, HOS+).



Lavado y acondicionamiento de los espermatozoides congelados/descongelados

Con el propósito de obtener una población de células espermáticas vivas, el contenido de las pajuelas correspondiente a cada tratamiento, luego de realizar las evaluaciones citadas, fue acondicionado por centrifugación a través de un gradiente de Percoll[®], de la siguiente manera:

- Se colocaron en tubos eppendorf por sotoposición dos soluciones de Percoll de 45 y 90%, 300 μ l de cada una de ellas.
- Sobre la capa superior de la columna de Percoll se depositaron 200 μ l del contenido de la pajuela y se procedió a su centrifugado (600g durante 10 minutos a temperatura ambiente).

Se recuperaron 80 μ l del sedimento de cada centrifugado en donde se realizaron las correspondientes determinaciones.

Funcionalidad mitocondrial (Fig. 16)

Para determinar la actividad mitocondrial de los ESPZ se realizó un test que emplea la coloración de Rhodamina 123 (Rh 123) en combinación con Ioduro de Propidio (IP), adaptado de Grasa et al. (2004). El fundamento de esta prueba consiste en que la Rh 123 (fluorocromo lipofílico y de naturaleza catiónica) se acumula selectivamente en el interior de las mitocondrias activas, atraída por el potencial de membrana mitocondrial, generando fluorescencia verde a nivel de la porción intermedia de los ESPZ (Rh+, mitocondria funcional). Los ESPZ que no emiten fluorescencia a este nivel, se consideran como no reactivos (Rh-). Por otro lado, el IP entra en las células con membranas dañadas, uniéndose al ADN del núcleo y emitiendo una fluorescencia roja (IP + =células no viables).

Los ESPZ viables no se tiñen con el IP y sus cabezas emiten una fluorescencia verde de menor intensidad que la porción intermedia. Del resultado de la acción de ambos colorantes se realizó una adaptación de la interpretación descrita por Grasa et al. (2004), identificándose los patrones definidos en el siguiente cuadro:

Patrones de viabilidad celular y funcionalidad de mitocondrias.

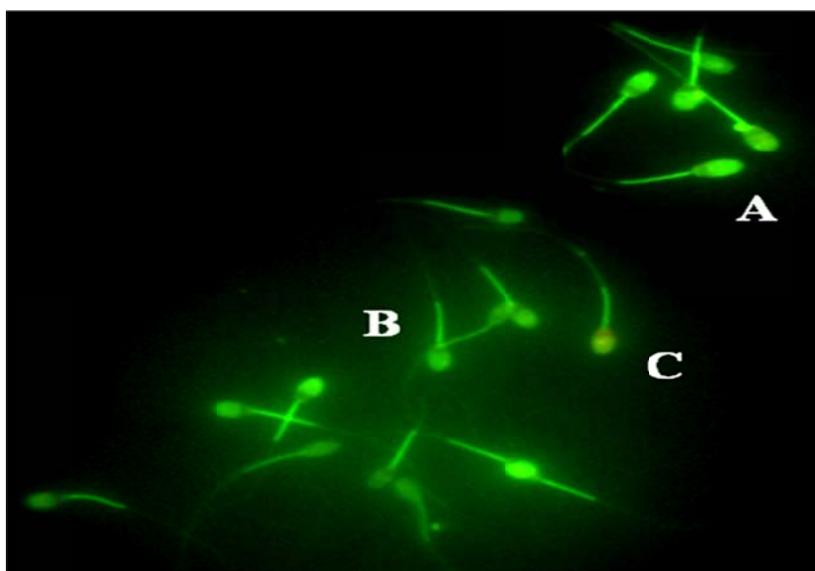
Interpretación	Rh 123	IP
ESPZ viables con mitocondrias funcionales	+	-
ESPZ viables con mitocondrias no funcionales	-	-
ESPZ no viables con mitocondrias no funcionales	-	+

Esta prueba se realizó en un tubo de vidrio en el cual se colocó 1 ml de solución isotónica, en BM a 37 °C. Luego se agregaron 250 µl de la muestra del semen diluido en TRIS (1:300), 3 µl de la solución de trabajo Rh 123, esta mezcla se incubó durante 15 minutos. Posteriormente, se agregaron 25 µl de la solución de trabajo IP dejando incubar otros 15 minutos y finalmente se detuvo la reacción mediante el agregado de 10 µl de una solución isotónica formolada (ver Anexo) dejando incubar otros 5 minutos. Luego, las muestras se retiraron del baño maría para ser almacenadas al abrigo de la luz y a temperatura ambiente. La observación se

realizó en microscopio de epifluorescencia a 400x. Se colocó una muestra de 5 μ l entre porta y cubreobjetos, donde se contaron un mínimo de 200 células, estableciéndose los porcentajes de células Rh+, Rh- y también de los IP+ e IP -.

Todo este proceso se realizó al resguardo de la luz directa y el tiempo transcurrido desde el final de la incubación hasta la observación al microscopio no fue superior a las 3 horas.

Fig. 16. Espermatozoides sometidos a la reacción de Rh 123. A: ESPZ viable con mitocondrias funcionales B: ESPZ viable con mitocondria no funcional C: ESPZ no viable con mitocondrias no funcionales



Estado del acrosoma según los diferentes patrones de la Prueba de la Clortetraciclina (Fig. 17)

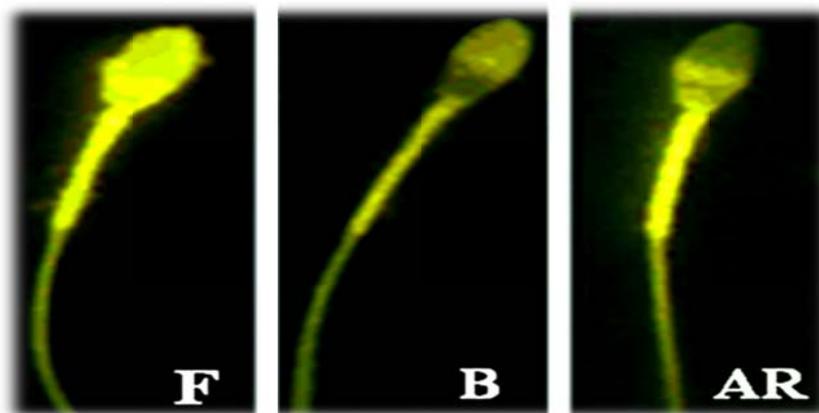
La prueba de la Clortetraciclina (Prueba CTC) se basa en la propiedad de unión de este antibiótico (Clortetraciclina) al calcio (Ca^{++}) de membrana. La distribución del Ca^{++} en la membrana plasmática sufre cambios durante el proceso de capacitación espermática, los cuales pueden ser evidenciados mediante esta prueba. De este modo, cuando una muestra de ESPZ es sometida a la Prueba de la CTC es posible diferenciar el estado de la capacitación espermática del comienzo de la reacción acrosómica.

El procedimiento empleado para realizar la técnica fue basado en Pérez-Peet al. (1996) como se describe a continuación:

- Se descongeló un buffer-CTC (ver Anexo)
- Luego, una solución de CTC (750 μ M) se diluyó en 2 ml de la solución CTC-buffer.
 - La solución CTC- buffer fue filtrada a través de una membrana de acetato de celulosa (Microclar[®]) de 0,22 μ m con el propósito de que no quedaran partículas groseras en la suspensión y mantenida a 4 °C, hasta el momento de ser utilizada.
 - En un tubo Eppendorf se colocó una alícuota de 10 μ l de la muestra de ESPZ y se le añadieron 20 μ l de la solución CTC-buffer. Ambos se homogeneizaron durante 20 segundos, al resguardo de la luz.
 - La reacción colorimétrica anterior fue detenida mediante la adición de 10 μ l de la mezcla de dos soluciones fijadoras: A (Tris-HCL 1 M + 1% (v/v) glutaraldehído EM (25%) + 5 ml de agua bidestilada estéril) y B (Tris 1 M + 1% (v/v) glutaraldehído EM (25%) + 10 ml de agua bidestilada estéril), pH 7,8.
 - Se colocaron 5 μ l de la muestra fijada entre porta y cubreobjetos y se evaluó el estado de capacitación utilizando un microscopio de epifluorescencia (Nikon[®] Eclipse TE-300 Japón) a 400x. El colorante fue excitado con luz ultravioleta y se utilizó un filtro barrera de amplio rango (LP) (380 nm de excitación y 420 nm de emisión). Se contaron no menos de 200 ESPZ y fueron clasificados de acuerdo a los patrones-CTC descriptos por Fraser et al. (1995):
 - Patrón F-CTC: ESPZ no capacitados, fluorescencia uniformemente distribuida en toda la cabeza con una banda brillante en la región ecuatorial.
 - Patrón B-CTC: ESPZ que han iniciado el proceso de capacitación; fluorescencia uniforme aunque menos intensa que la anterior y pérdida de la banda ecuatorial o fluorescencia en la parte anterior de la cabeza sin fluorescencia en la región posacrosomal.
 - Patrón AR-CTC: ESPZ con reacción acrosómica, no se observa ninguna fluorescencia sobre la cabeza o sólo una delgada banda fluorescente en el segmento ecuatorial.

Fig. 17. Espermatozoides de carnero congelados/descongelados expuestos a la prueba de la CTC. Clasificación de los patrones-CTC según el estado del acrosoma.

F: no capacitado; B: capacitado y AR: reaccionado



2.9. Medición de niveles de testosterona en sangre

Las muestras para la determinación de testosterona plasmática fueron tomadas de forma quincenal a partir del momento de la aplicación de los implantes.

La testosterona se determinó mediante un radioinmunoensayo (RIA) desarrollado en el laboratorio del INTA. El antisuero fue obtenido por inoculación a conejos del complejo 6-oxima- BSA. El trazador es testosterona tritiada (NEN) y la separación de la hormona libre de la unida al anticuerpo por Carbón:Dextrán. El RIA se realiza en el extracto etéreo del suero, purificado en columna de alúmina y tiene una sensibilidad de 0,04 ng/dl. La sensibilidad del kit fue de 0,04 ng/dl.

Se expresaran los coeficientes de variación intra e interensayos y el valor mínimo detectable de testosterona para cada experimento.

2.9. Análisis estadístico

Evaluación de las variables cuali-cuantitativas de los eyaculados enteros obtenidos con vagina artificial y de los eyaculados reconstituidos de semen congelado. El estudio se realizó a través de un modelo mixto como medidas repetidas en el tiempo, a través de SAS, en donde las variables en estudio fueron las siguientes:

- Volumen
- Motilidad masal
- Porcentaje de espermatozoides vivos
- PV
 - CC
 - Circunferencia escrotal
 - Análisis de testosterona en sangre.
 - Evaluación del semen descongelado

El estudio del semen descongelado fue a través de un análisis de varianza donde las variables en estudio para ambos tratamientos fueron:

- Movilidad Espermática Total
- Movilidad Espermática Rectilínea Progresiva
- Espermatozoides con membrana plasmática integra (Eosina/Nigrosina)
- Espermatozoides con membrana plasmática funcional (HOS Test +)
- Espermatozoides con mitocondrias funcionales
- Patrón F-CTC
- Patrón B-CTC
- Patrón AR-CTC

EXPERIMENTO 3: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON MELATONINA EXÓGENA A LO LARGO DEL FOTOPERIODO CRECIENTE SOBRE LOS RESULTADOS REPRODUCTIVOS DE OVEJAS RAZA MERINO CON MANEJO NETAMENTE EXTENSIVO.

Este experimento se realizó completamente en el campo Experimental de INTA de Río Mayo que se encuentra en la provincia de Chubut en la Cordillera Patagónica Septentrional (45°S 70°O), dependiente de la Estación Experimental de INTA Trelew.

3.1 Animales y diseño experimental

Se utilizaron 120 ovejas Merino adultas. Divididas en dos grupos homogéneos en lo referente a PV, CC y edad. El grupo M, implantado, estuvo conformado por 60 ovejas a las cuales se les colocó un implante subcutáneo de melatonina de 18 mg el 2 de septiembre de 2010, un mes antes del momento de mayor anestro estacional (octubre). El grupo C, control, estuvo conformado por 60 ovejas y no recibió ningún tipo de tratamiento hormonal (Fig. 18).

Fig. 18. Colocación de implante de melatonina *Fig. 19 Manejo Extensivo*



Ambos grupos tuvieron un manejo netamente extensivo (Fig. 19), por lo tanto sin suplementación alimentaria alguna, y fueron sometidas inmediatamente de colocados los implantes a un mes de efecto macho. Los primeros días de octubre se introdujeron 15 moruecos adultos raza Dohne Merino para realizar las cubriciones, pintados con una mezcla de ferrite de color rojo con grasa en la zona del pecho para marcar las ovejas que iban mostrando celo y fueran montadas por los machos. Los machos permanecieron en el rebaño durante 45 días. Ambos lotes permanecieron juntos en todo momento. Cada 10 días se hacían los repuntes, que consisten en salir a caballo

a observar si había algún morueco lejos del lote de ovejas para juntarlos nuevamente. El día 26 de enero de 2011, se realizó el diagnóstico ecográfico de gestación.

3.2. Análisis estadístico

Análisis de varianza a través del SAS tomando como variables en estudio para ambos tratamientos:

- Porcentaje de ovejas en celo.
- Porcentaje de preñez
- Porcentaje de ovejas paridas.

RESULTADOS

**EXPERIMENTO 1. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON MELATONINA
EXÓGENA SOBRE LA PRODUCCION DE EMBRIONES IN VIVO EN
ESTACION REPRODUCTIVA Y EN EL PERIODO DE ANESTRO
ESTACIONAL SOBRE OVEJAS DOHNE MERINO**

Se partió de la premisa de realizar los lavados uterinos a todas las ovejas a pesar de que no evidenciaran signos de celo, exceptuando el caso de dos ovejas del grupo de animales tratados con implante de melatonina en estación reproductiva que no fueron lavadas al encontrarnos con dos problemas diferentes en la cirugía *in situ*, en el primer caso una adherencia en la parte final del útero y en el segundo caso por presentar una infección uterina, cuestiones ajenas al tratamiento en estudio.

Los resultados de la respuesta al tratamiento con melatonina en cuanto a la producción de embriones *in vivo* en estación reproductiva y en anestro estacional se exponen en la Tabla 2.

No se detectaron diferencias significativas entre tratamientos ni durante la estación reproductiva ni durante el anestro estacional entre los parámetros estudiados. Únicamente se observó, durante la estación reproductiva, un efecto significativo ($p < 0,05$) del tratamiento sobre el momento de manifestación de los celos en relación a la retirada de la esponja, siendo dicho momento posterior en las ovejas que recibieron el tratamiento con implantes de melatonina. Esta diferencia no se evidenció en el ensayo en anestro estacional, siendo los promedios de hora de manifestación de celos similares para ambos grupos.

Las tasas de ovulación, las estructuras recuperadas y los porcentajes de fecundación y viabilidad embrionaria mostraron valores similares para ambos grupo en estudio, tanto en estación reproductiva como en anestro estacional, sin diferencias entre ambas.

La observación de los ovarios en el momento de la recuperación embrionaria permitió registrar en dos animales del grupo melatonina, la presencia de un cuerpo lúteo en regresión. Esta apreciación se basó en la apariencia de las estructuras luteales como estructuras avasculares, pálidas y con un diámetro inferior a 3 mm, como así también un cuerpo lúteo quístico, con una imagen típica de un quiste de un tamaño de 5 mm.

Se pudo observar durante el ensayo en anestro estacional, diferencias significativas ($p < 0,05$) a favor del tratamiento con melatonina para la obtención de embriones degenerados o muertos.

Tabla 2: Comparación de la respuesta ovulatoria y la producción de embriones (medias \pm E.S.) en ovejas de raza Dohne Merino tratadas o no con melatonina, en estación reproductiva (Recuperación 1) y en anestro estacional (Recuperación 2).

	Melatonina		Control	
	Recuperación 1	Recuperación 2	Recuperación 1	Recuperación 2
Ovejas en celo %	9/11 (82%)	6/6 (100%)	10/11 (91%)	6/6 (100%)
Inicio de Celo, horas	31,1 \pm 1,04 ^a	25,5 \pm 1,1	25,2 \pm 0,98 ^b	27 \pm 0,98
Tasa de Ovulación (%)	8,36 \pm 1,88	15,8 \pm 2,77	13,18 \pm 1,88	20,8 \pm 2,77
ESTRUCTURAS RECUPERADAS				
Oocitos	3,14 \pm 1,31	5,5 \pm 2,1	1,81 \pm 1,05	3,16 \pm 2,1
Embriones Viables	2,28 \pm 1,79	4 \pm 1,8	6,9 \pm 1,43	4,8 \pm 1,8
Embriones Degenerados	2,57 \pm 0,96	0,6 \pm 1,74 ^a	2,09 \pm 0,77	3 \pm 1,74 ^b
Tasa de Fecundación (%)	58%	52,67%	69,2%	59,32%
Tasa de Viabilidad (%)	22,83%	43,39%	53,65%	58,13%

Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$) dentro del mismo ensayo.

EXPERIMENTO 2: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON MELATONINA EXÓGENA A LO LARGO DEL FOTOPERIODO CRECIENTE SOBRE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD SEMINAL DE MORUECOS DE RAZA DOHNE MERINO.

Durante el primer ensayo realizado, 16 animales de un total de 22 (8 Control y 8 Melatonina) respondieron manifestando signos de libido, por lo que pudieron ser muestreados de forma semanal. En el segundo año la respuesta fue similar, de un total de 22 animales, respondieron 12 (6 Control y 6 Melatonina), destacando que todos ellos ya estaban entrenados y se habían sometido a muestreo de extracción de semen en estación reproductiva. Los resultados de los parámetros fenotípicos y de calidad seminal del experimento en ambos años se pueden observar en la Tabla 3. Durante el desarrollo del segundo ensayo (Año 2) el grupo control experimento un incremento significativo ($p < 0,05$) del volumen de eyaculado, aunque esto mismo no pudo observarse en el primer ensayo (Año 1).

No se advirtieron diferencias significativas para los parámetros de motilidad masal, concentración espermática y porcentaje de espermatozoides vivos y muertos. El tratamiento no influyó sobre el peso vivo y la condición corporal. La circunferencia escrotal se incrementó de manera significativa ($p < 0,05$) a favor del grupo de animales con implantes de melatonina en ambos años (Fig. 20).

Todos los moruecos sufrieron un incremento de la circunferencia escrotal en forma paulatina, tanto en el grupo tratado como en el control. Durante el primer ensayo el aumento de la circunferencia escrotal comienza a partir de los 15 días de aplicado el implante. En el segundo experimento se observa el aumento significativo ($p < 0,05$) del desarrollo de la circunferencia escrotal a partir de los 30 días posteriores a la colocación del implante tanto para el grupo de animales en tratamiento como para grupo el control (Fig. 20).

Fig. 20. Evolución de la circunferencia escrotal en ambos experimentos (Año 1; Año2) a partir de los 30 días de la colocación de implantes (día 1) en el grupo melatonina y el grupo control.() Indican diferencias significativas ($p < 0,05$) en cada muestreo.**

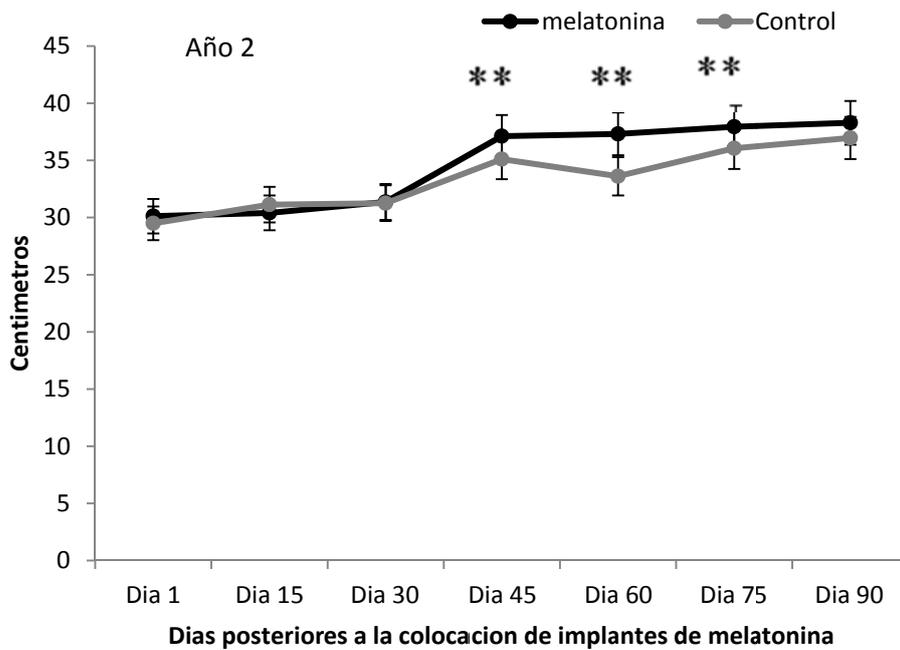
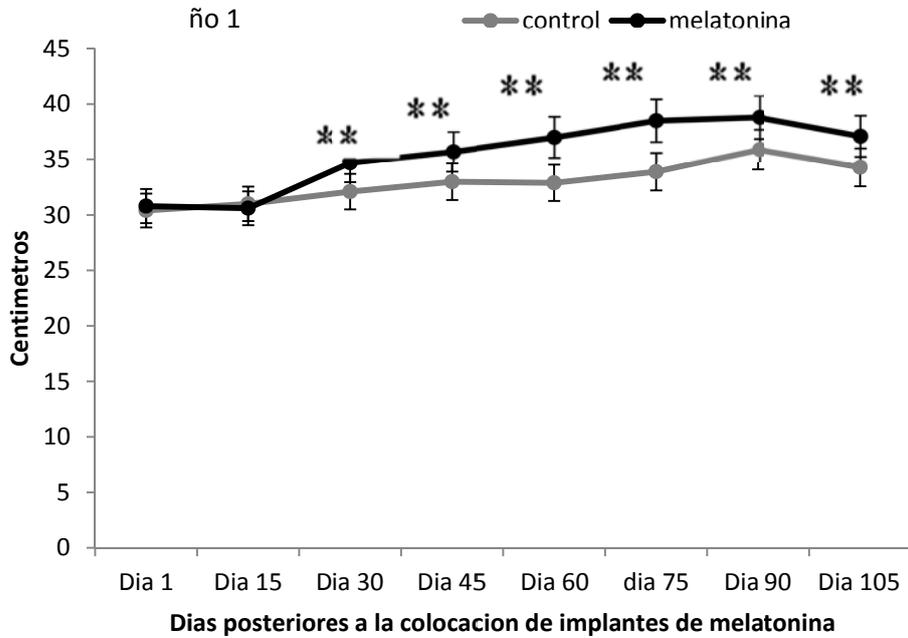


Tabla 3. Resultados de parámetros fenotípicos y reproductivos de calidad seminal (media± E.S.) de dos años consecutivos sobre animales con 3 implantes subcutáneos de melatonina (Melatonina) y no implantados (Control).

	Melatonina		Control	
	Año 1	Año 2	Año 1	Año 2
Numero de análisis	71	66	69	66
Volumen	0,87 ± 0,12	0.96± 0.13 ^{a*}	0,85 ± 0,13	1,26 ± 0.09 ^b
Motilidad Masal	2,8 ± 0,13	2.97±0.11	3,1 ± 0,11	3.27± 0.11
Concentración 10⁹ esp./ml	4,79 ± 2,93	2,82±1,15	4,02 ± 2,52	2,74±1,15
Porcentaje de Vivos	78,7 ± 3,88	81,43±1,32	76,8 ± 4,20	81,24±1,32
Peso Corporal	94,85± 2,59	81.7± 1.60	93,18 ± 2,42	80.8±1.53
Condición Corporal	3,07 ± 0,15	2,79±0,08	3,02 ± 0,17	2,71±0,08
Circunferencia Escrotal	37,1 ± 0,9 ^{**}	34,85±0,40	34,2 ± 1,00 ^{a**}	33,43±0,38

*, ** indican diferencias significativas entre lotes p<0,05 y p<0,01, respectivamente.

La evolución en ambos ensayos en las muestras de semen fresco sobre el desarrollo de la concentración espermática, porcentaje de espermatozoides vivos y volumen de eyaculado se puede observar en las Fig. 21, 22 y 23 respectivamente, sin evidenciar diferencias estadísticas sobre el tratamiento en estudio.

Fig. 21. Evolución de las medias de concentración espermática de animales implantados con Melatonina y Control durante los dos experimentos (Año 1; Año 2) en anestro reproductivo.

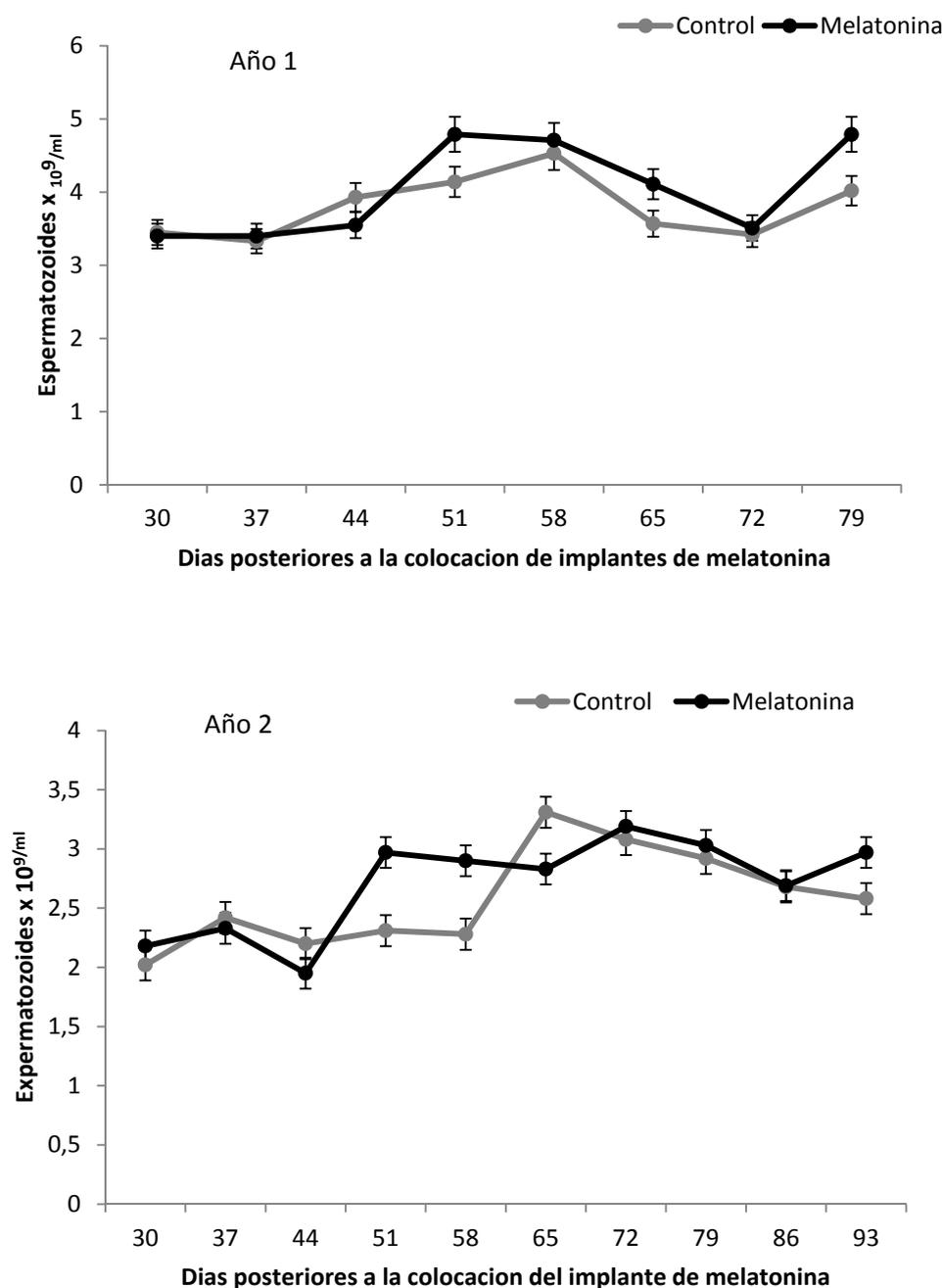


Fig. 22. Evolución de las medias de porcentajes de espermatozoides vivos a través de tinción de eosina-nigrosina de animales implantados con melatonina y control durante los dos experimentos (Año 1; Año 2) en anestro reproductivo.

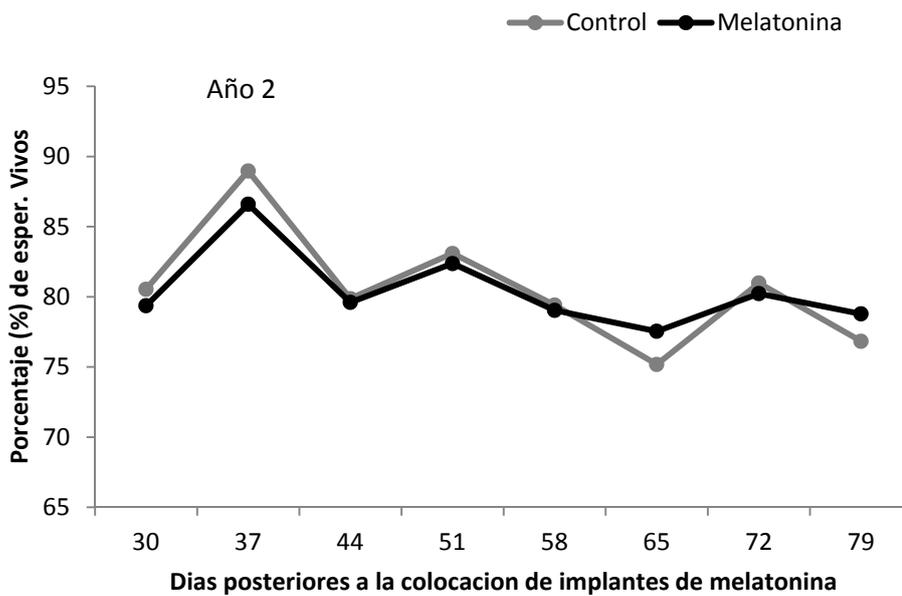
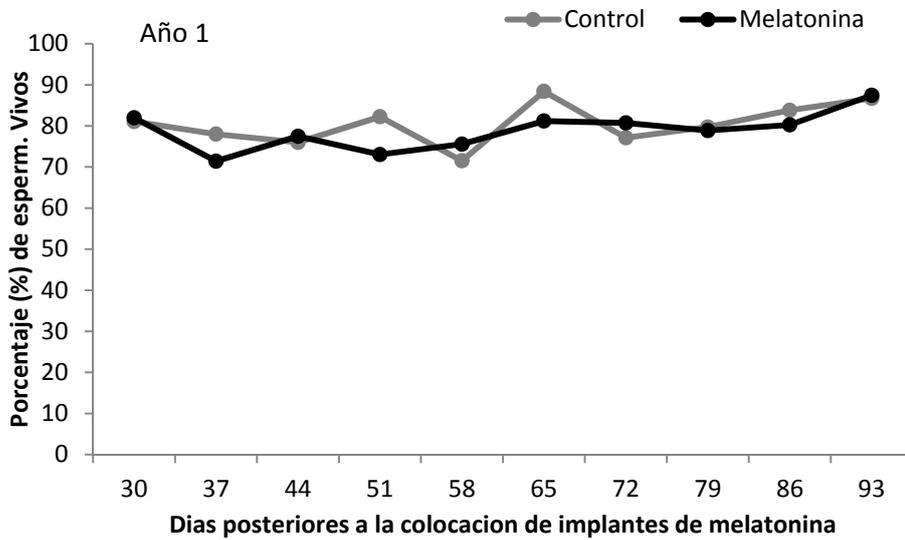
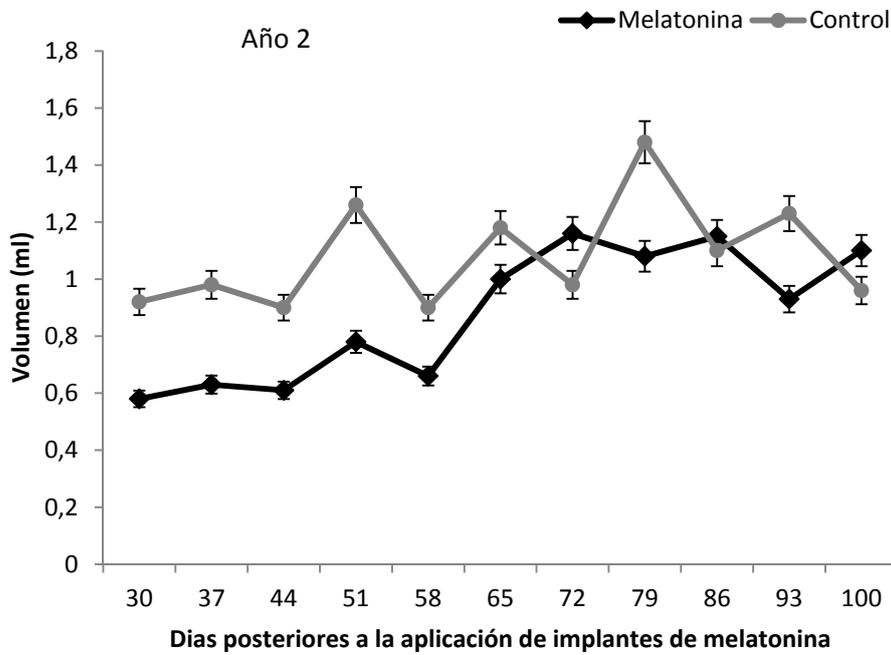
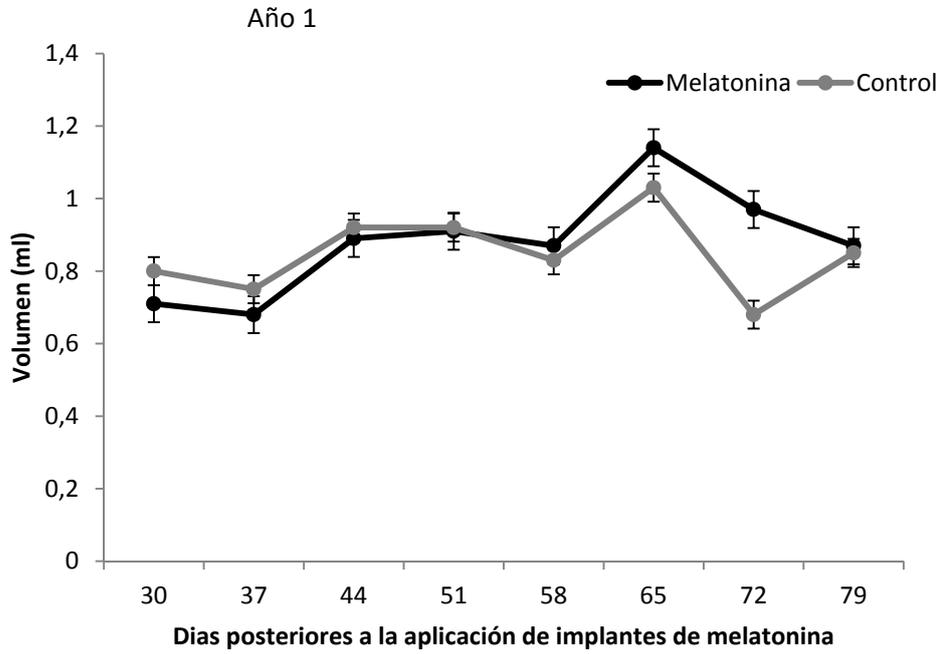


Fig. 23. Evolución de las medias de volumen de eyaculado (ml) de animales implantados con melatonina y control durante los dos experimentos (Año1; Año 2) en anestro reproductivo. () Indican diferencias significativas ($p < 0,05$) en cada muestreo.**



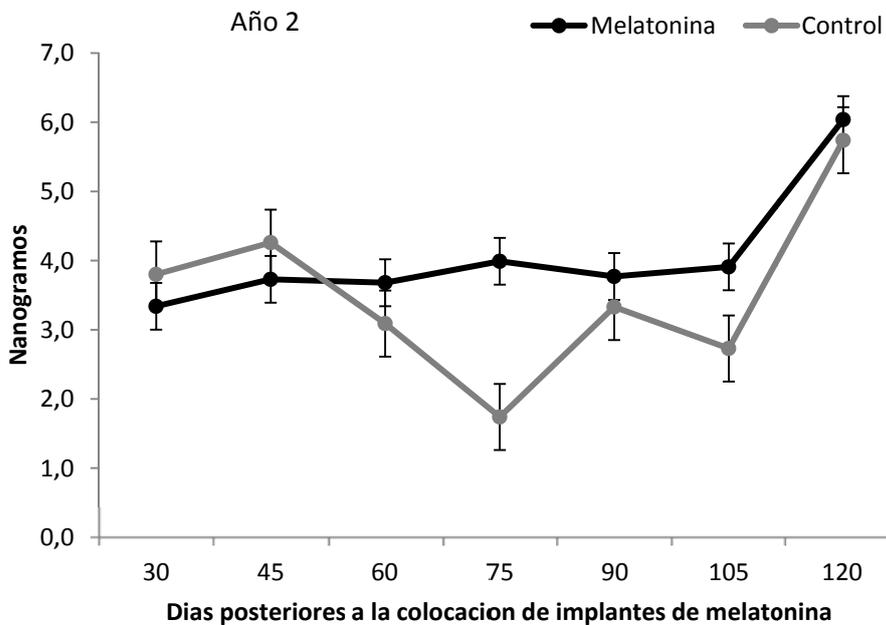
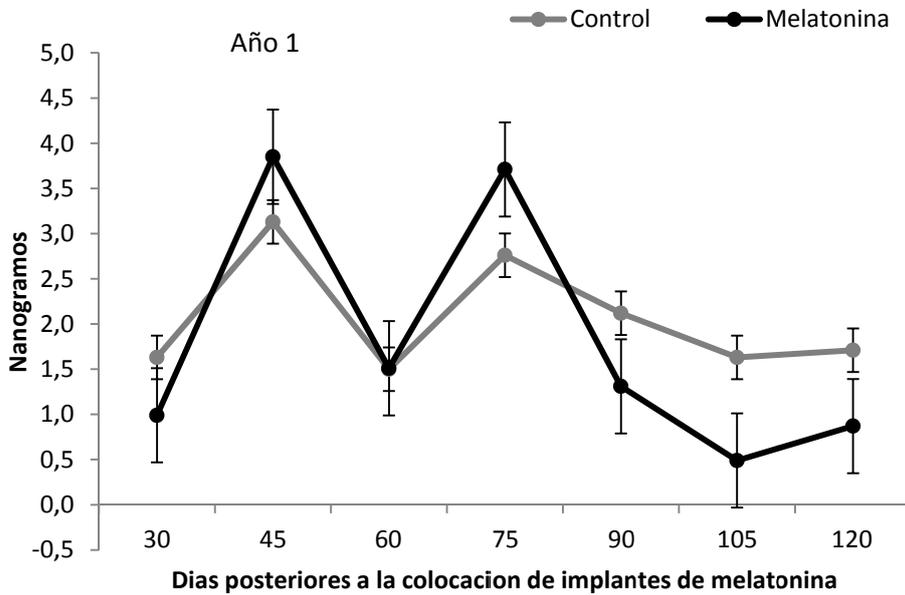
Tras la colocación de los implantes se apreció un rápido aumento, durante los primeros 15 días de los niveles de testosterona en el primer ensayo, en ambos grupos, para posteriormente mostrar un patrón irregular de ascenso y descenso sin diferencias significativas entre tratamientos. El momento de máximo valor encontrado fue a los 45 días de colocado el implante para ambos grupos en estudio y el nivel mínimo detectable fue a los 105 días para el grupo melatonina y a los 60 para el grupo control en el primer ensayo (Fig.24). Los niveles de testosterona durante el segundo ensayo mostraron un aumento paulatino durante todo el periodo en estudio en el grupo de animales implantados con melatonina, siendo más irregular para el grupo control con un valor máximo para ambos grupos a los 120 días de colocado el implante y un valor mínimo a los 75 días en el grupo control y al inicio de las mediciones para el grupo de animales implantados con melatonina.

En la Tabla 4 se puede apreciar las medias (\pm E.S.) para cada experimento, el valor mínimo y máximo detectable en cada ensayo, y su respectivo coeficiente de variación para cada año.

Tabla 4. Resultado de valores de testosterona en sangre expresados como medias (\pm E.S.), valores mínimos y máximo detectables (ng/ml) y coeficiente de variación intra e inter ensayo para ambos grupos en estudio (Melatonina; Control) durante los dos experimentos en anestro reproductivo (Año 1; Año2).

	Melatonina		Control	
	Año 1	Año 2	Año 1	Año 2
Medias	2,66 \pm 2,21	4,47 \pm 2,37	2,71 \pm 2,21	4,08 \pm 2,4
Valor mínimo detectable	0,25	0,50	0,23	0,46
Valor Máximo detectable	12	14,30	10,1	10
Coeficiente de Variación	92,87	55,92	81,63	98,78

Fig. 24: Evolución de los niveles de testosterona sobre animales con implantes de melatonina (Melatonina) y en el grupo de animales control (Control) a partir de los 30 días de aplicación del implante durante los dos experimentos (Año1; Año2) en anestro reproductivo.



En la Tabla 5 se puede observar los resultados del análisis de distintos parámetros de calidad seminal sobre el semen descongelado de ambos tratamientos en ambos años en estudio.

No se observaron diferencias significativas entre tratamientos en motilidad rectilínea progresiva, vigor, porcentajes de espermatozoides vivos y muertos y test de permeabilidad de membrana (Test de Hos). Sí se observan diferencias significativas en la evaluación de motilidad espermática total en el primer experimento a favor del grupo control sobre el grupo melatonina de las muestras de semen descongelado, no evidenciándose esta diferencia en los muestreos de semen descongelado del segundo año en estudio. Tampoco se evidenciaron diferencias significativas en los resultados en la prueba de funcionalidad mitocondrial con rhodamina e ioduro de propidio para ambos experimentos evidenciando valores similares en las medias obtenidas de espermatozoides viables con y sin mitocondrias funcionales y sobre espermatozoides no viables para ambos tratamientos. Los mismos resultados se observaron al realizar la tinción de clortetraciclina (CTC), obteniéndose resultados similares en sobre los espermatozoides capacitados, no capacitados y con reacción acrosomal, sin evidenciar diferencias estadísticas sobre la variables en estudio (Tabla 5).

Tabla 5. Resultados de evaluaciones de parámetros de funcionalidad espermática (media± E.S.) de ambos ensayos (Año 1; Año 2) sobre animales con 3 implantes subcutáneos de melatonina (Melatonina) y no implantados (Control).

	Melatonina		Control	
	Año 1	Año 2	Año 1	Año 2
Motilidad Espermática Total	16,25 ± 13,02 ^a	33,33 ± 19,41	32,86 ± 14,96 ^b	31,67 ± 19,41
Motilidad rectilínea progresiva	20 ± 20,7	33,33 ± 25,82	24,29 ± 22,25	28,33 ± 19,41
Vigor	2,63 ± 1,3	3,17 ± 0,98	3,43 ± 0,53	3,67 ± 0,52
% espermatozoides vivos	19,81 ± 9,03	35,37 ± 8,19	37,75 ± 10,41	31,47 ± 12,38
Test hiposmótico positivo	19,7 ± 11,24	27,68 ± 15,05	26,27 ± 15,58	30,25 ± 18,08
RHODAMINA				
No viables con mitocondrias funcionales	45,04 ± 5,08	61,97 ± 13,94	61,6 ± 17	73,05 ± 15,81
Viables con mitocondrias funcional	47,54 ± 7,59	35,22 ± 12,62	35,48 ± 15,65	23,40 ± 14,47
Viables con mitocondrias no funcionales	7,35 ± 3,83	2,82 ± 3,02	2,96 ± 3,33	3,55 ± 2,59
CLORTETRACICLINA (CTC)				
No capacitados	3,64 ± 2,02	12,48 ± 5,47	5,37 ± 2,77	10,93 ± 6,00
Capcitados	48,37 ± 17,77	60,83 ± 9,75	50,49 ± 3,97	67,12 ± 10,84
Con reacción Acrosomal	47,97 ± 18,76	25,02 ± 7,37	43,83 ± 5,33	21,97 ± 5,69

Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

EXPERIMENTO 3: RESULTADO DE LOS ÍNDICES REPRODUCTIVOS DE HEMBRAS EN ANESTRO ESTACIONAL BAJO UN MANEJO NETAMENTE EXTENSIVO

Llamativamente no hemos tenido resultados para su análisis estadístico durante la elaboración de este experimento. No se detectó ciclicidad ovárica, traducido en falta permanente de celos en ambos lotes en estudio. Cada 15 días se realizó las recorridas a caballo del cuadro donde se encontraban las ovejas de ambos lotes en estudio con los moruecos para dar servicio observando que cada vez que se realizaba esta maniobra las ovejas estaban totalmente separadas de los machos, evidenciando una ausencia total de manifestación de celo.

Es importante destacar que antes del inicio del ensayo se realizó un diagnóstico de gestación para evitar la elección accidental de animales que pudieran estar gestantes antes del experimento.

También es importante destacar que si bien los animales, por la situación de sequía que atraviesa la zona Patagónica desde hace ya varios años, se encontraban en una baja condición corporal y peso vivo, con un promedio de 37, 51± 3,81 kg de PV y 1,45±0,15 de CC para el grupo control y 38,07± 4,59 kg de PV y 1,47± 0,11 de CC para el grupo melatonina, se cree que este factor no es responsable de los resultados obtenidos, observando una mejora del estado nutricional a los 50 días de colocado el implante con un aumento promedio de PV 4,13±2,92 kg y 0,320±0,24 puntos más de condición corporal el grupo control y 3,76±2,03 kg de aumento de peso vivo y 0,34±0,21 puntos de condición corporal para el grupo con implantes de melatonina. A los 45 días de finalizado el servicio a campo se realizó el diagnóstico de gestación ecográfica corroborando la falta de manifestación de celo sin lograr ninguna gestación detectable en ambos grupos.

DISCUSIÓN

**EXPERIMENTO 1. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON MELATONINA
EXÓGENA SOBRE LA PRODUCCION DE EMBRIONES IN VIVO EN
ESTACION REPRODUCTIVA Y EN EL PERIODO DE ANESTRO
ESTACIONAL SOBRE OVEJAS DOHNE MERINO**

Un tratamiento de superovulación se considera efectivo cuando los animales sometidos a dicho tratamiento presentan una tasa de ovulación superior a aquélla referida como normal para la raza bajo estudio. En este experimento la raza Dohne Merino ha cumplido con esta premisa, aunque esto no fue acompañado por un efecto del tratamiento con melatonina bajo estudio, que no ha logrado generar diferencias con los lotes control. Si bien esto se manifiesta más sensiblemente durante la estación reproductiva los resultados mejoraron notablemente en el lote tratado con implante de melatonina durante el anestro estacional, en donde también el grupo control dio resultados muy elevados respecto a la tasa de ovulación aunque sin marcar diferencias significativas, y similares al lote tratado con melatonina para las estructuras recuperadas, siendo los embriones viables obtenidos en nuestro experimento aceptables tanto para la estación reproductiva como en anestro estacional.

Estos resultados han sido muy superiores a los obtenidos por Forcada et.al. (2006) y similares en base al tratamiento en estudio, ya que, trabajando con ovejas de raza Rasa Aragonesa tratadas con melatonina en anestro estacional, y colocando esponjas con progestágenos 28 días después del inicio del tratamiento, de manera similar a nuestra experiencia, el tratamiento con 8 dosis decrecientes de FSH ovina dio lugar a una respuesta ovulatoria media de 11 cuerpos lúteos para el grupo de animales implantados con melatonina y 12,9 para el grupo control. Esto se repite en el caso de los embriones viables, ya que obtuvieron como resultado 3,6 embriones para el grupo melatonina y 4,2 para el grupo control, no evidenciando diferencias estadísticas significativas para el tratamiento. Sin embargo, estos mismos autores (Forcada et al., 2006) observaron que colocando esponjas 77 y 88 días después de los implantes de melatonina, los resultados de tasa de ovulación son levemente superiores en los animales implantados que el grupo control (12,5 vs. 11,1 cuerpos lúteos respectivamente), y significativamente superiores para el tratamiento con melatonina en lo referente a embriones viables y congelables, aunque, no obstante estos valores son inferiores a los obtenidos en nuestro ensayo.

La similitud entre las ovejas tratadas con implantes de melatonina y el grupo control en términos de tasa de ovulación en el experimento en anestro estacional sugiere que el tratamiento con gonadotrofinas exógenas parece anular el efecto estacional respecto a la tasa de ovulación. Esto concuerda con lo observado por Samartzi et al. (1995), que trabajando con ovejas Chios y realizando dos tratamientos superovulatorios con eCG tanto en otoño como en primavera obtuvieron resultados similares en lo que respecta a la tasa de ovulación y producción de embriones. Se ha demostrado que a nivel ovárico, el mecanismo que controla la tasa de ovulación durante la época reproductiva es aún funcional durante el anestro estacional (Webb et al. 1992), manteniendo ovulaciones espontáneas que indican que el tratamiento con melatonina pueda inducir aumentos significativos en la tasa de ovulación (Haresing et al., 1990).

La alta tasa de ovulación obtenida en nuestro estudio en anestro estacional en ambos grupos indica una muy buena respuesta al tratamiento con gonadotropinas de las ovejas Dohne Merino; sin embargo, esto no se vio reflejado en el ensayo en estación reproductiva. Así, el grupo control mantuvo valores altos de tasa de ovulación, pero en el grupo de animales con implantes de melatonina este valor fue inferior, llegando a la mitad de los valores expresados en dicha época. Por lo tanto, en estación reproductiva la tasa de ovulación media de las hembras donantes de embriones y tratadas con implantes de melatonina fue menor que la observada, en la misma raza de oveja, con el mismo régimen hormonal de superovulación, durante el anestro en ambos lotes en estudio. Esto concuerda con otras observaciones, aunque en razas menos estacionales y en latitudes más bajas que en el presente experimento (Robinson et al., 1991; Samartzi et al., 1995). El fallo de la melatonina exógena para aumentar la tasa de ovulación en nuestro estudio sugiere que la FSH probablemente haya reclutado todos los folículos independientemente de los mecanismos de disminución de la atresia folicular por parte de la melatonina (McEvoy et al., 1988)

Quizás un efecto antagónico de la melatonina exógena con la melatonina natural podría ser la causa de los bajos resultados del tratamiento durante la estación reproductiva, no evidenciando se en tal magnitud en anestro estacional por el aumento de la duración de la secreción de la melatonina endógena y por el efecto de las gonadotrofinas.

La producción de embriones viables en nuestro ensayo en el grupo control fue menor en anestro estacional que en estación reproductiva; quizás esto muestre que hay un efecto del fotoperiodo que afecta a la recuperación de embriones viables. Durante el anestro

estacional se observó un aumento de la tasa de embriones degenerados y retardados (no viables) en el grupo de animales control; esto mismo se vio disminuido significativamente en el lote de animales implantados con melatonina. Este hecho también fue reflejado por Forcada et al. (2006), quienes demostraron que la aplicación de implantes de melatonina reduce significativamente el número y la tasa de embriones no viables (degenerados y retardados) en ovejas superovuladas durante el anestro.

Los mecanismos involucrados en la mejora de la viabilidad embrionaria por la melatonina no son totalmente conocidos, si bien podrían ser explicados en parte por el efecto luteotrófico de la hormona pineal, observado tanto *in vivo* (Durotoye et al., 1997) como *in vitro* (Abecia et al., 2002), así como por sus efectos a nivel del eje hipotálamo-hipofisiario ya descritos hace años (Malpaux et al., 1997), y también por sus propiedades antioxidantes y de captación de radicales libres (Chetsawang et al., 2006).

El estudio de la presentación de los celos en ovejas inducidas a la superovulación resulta de utilidad para brindar información que permita planificar adecuadamente el período de cubriciones o incluso el momento más adecuado para IA en su caso. Los resultados obtenidos en el experimento en estación reproductiva demuestran una significativa diferencia en la presentación de celos siendo más temprana en el grupo de ovejas control ($25,2 \pm 0,98$ vs $31,1 \pm 1,04$ h, para el Grupo C y el grupo Grupo M, resp.) y teniendo en cuenta que durante este protocolo se utilizaron dos inseminaciones artificiales a tiempo fijo a las 33 y 48 h de retirada de esponjas, esta respuesta tardía en la manifestación de celo y posible ovulación pudo afectar a la obtención de embriones, teniendo en cuenta que, aunque no hubo diferencias significativas entre tratamientos, el grupo control mostros valores sensiblemente superiores en embriones viables y menores en recuperación de oocitos.

Viguie et al. (1995) mostraron la eficacia de la melatonina a través de la inducción de un aumento significativo de la pulsatilidad de GnRH y LH en ovejas en anestro a medio plazo, después de 74 días de tratamiento, esto quizás explique la falta de respuesta en nuestra experiencia que comenzó 37 días después de la colocación del implante.

Estas diferencias observadas en el agrupamiento de los celos en el presente estudio sugieren la necesidad de realizar una programación diferencial de las inseminaciones de acuerdo a la presentación de celo.

A pesar de la alta variabilidad de los parámetros examinados, nuestros resultados indican que el uso de la melatonina durante el anestro estacional tiene un efecto positivo

en corto plazo en la viabilidad de los embriones, lo que resulta en un aumento de las tasas viabilidad a causa de una disminución significativa en el número los embriones no viables (degenerado y retardado). Los resultados de nuestro estudio indican que la melatonina exógena puede mejorar la viabilidad de los embriones recolectados en ovejas Dohne Merino después de la superovulación en el periodo de anestro estacional. Sin embargo, este efecto no se ve reflejado durante la estación reproductiva.

El tratamiento con melatonina de ovejas donantes de embriones en anestro estacional no mostro beneficios en términos de mejora de tasa de ovulación y de producción de embriones para hembras raza Dohne Merino en la región Patagónica Argentina.

EXPERIMENTO 2: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON MELATONINA EXÓGENA A LO LARGO DEL FOTOPERIODO CRECIENTE SOBRE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD SEMINAL DE MORUECOS DE RAZA DOHNE MERINO.

En el presente experimento y a modo general, no hemos observado diferencias significativas del tratamiento con melatonina sobre los parámetros de calidad seminal. Esto difiere con trabajos previos sobre el mismo tema. Así, Beltrán de Heredia (1995), utilizando moruecos de raza Laxta, encontró mejoras significativas en el volumen del eyaculado y concentración espermática con el uso de melatonina a partir de la novena semana de colocado el implante, aunque sin modificar los parámetros que definen la calidad de los eyaculados. Otros estudios en diferentes razas revelan que la melatonina administrada en época desfavorable puede mejorar dicha calidad del espermatozoide (Chemineau et al., 1992; Garde et al., 1996; Kaya et al., 2000).

En nuestros experimentos el volumen de eyaculado mostro diferencias significativas a favor del grupo control solo durante el segundo experimento, esto marca diferencias según a lo observado por Bravo (2003), quien utilizando implantes de melatonina en 12 machos de razas Ile de France, Merino Precoz y Fleischschaf, con muestreos semanales durante 4 meses, no encontraron diferencias estadísticas sobre el volumen de eyaculado pero sí sobre la concentración espermática a favor del tratamiento con melatonina.

En el resto de los parámetros estudiados, ya sea motilidad masal, concentración espermática y porcentaje de espermatozoides vivos y muertos, el comportamiento por semanas es similar en ambos grupos, sin demostrar una tendencia definida para ningún tratamiento.

Kaya et al. (2000) observaron que los implantes de melatonina durante la época reproductiva no inciden sobre los parámetros de calidad seminal, aunque encontraron una mejoría significativa sobre la morfología espermática y la motilidad individual cuando es administrada fuera de la estación reproductiva.

Hemos podido observar un aumento significativo de la circunferencia escrotal a partir de los 30 días del inicio del tratamiento hasta los 90-100 días de colocado el implante a favor del grupo de animales con melatonina. El aumento experimentado en todos los machos, tratados y no tratados, coincide con lo observado previamente en razas mediterráneas, con un incremento del tamaño testicular desde la primavera hasta el final del verano (Avdi et al., 2004; Santiago-Moreno et al., 2005). Estos resultados están en

concordancia con lo observado por Palacín et al. (2008) que obtuvieron diferencias estadísticas a favor del tratamiento con melatonina en circunferencia escrotal en moruecos Assaf, Manchega y Rasa Aragonesa.

En el morueco se ha demostrado que el volumen testicular sufre una serie de variaciones estacionales a lo largo del año, aumentando durante la estación reproductiva (Colas et al., 1986; Chemineau et al., 1988) aunque esto puede diferir según las razas (Baril et al., 1993). La menor actividad en invierno es probablemente resultado de la correlación entre el fotoperiodo y la alimentación (Gastel et al., 1995), aunque en este trabajo los animales fueron alimentados de manera similar durante toda la etapa experimental descartando por lo tanto a la alimentación como factor de variación. Ortavant et al. (1988) relacionaron la variación del peso testicular en moruecos Île-de-France con el fotoperiodo y con los cambios que éste ejerce a nivel pituitario sobre la secreción de LH y FSH.

Los resultados obtenidos de las determinaciones de testosterona no mostraron diferencias significativas entre ambos grupos en estudios. Es particularmente llamativa en ambos experimentos la evolución de la testosterona, ya que ésta fue muy irregular aunque en general los valores del grupo melatonina fueron más elevados que el control, sin mostrar diferencias estadísticas en ambos grupos en estudio, quizás eso explique el efecto significativo que ha tenido la evolución de la circunferencia escrotal. Kaya et al. (2000) utilizando moruecos de raza Merina obtuvieron diferencias estadísticas en los niveles de testosterona plasmática fuera de estación reproductiva a partir de los 70 días de colocados los implantes, no encontrando diferencias en estación reproductiva e incluso con valores superiores para el grupo control durante esta estación del año.

Los resultados de nuestros experimentos también difieren de los obtenidos por Casao et al. (2013) quienes, a partir de la cuarta semana de la colocación de implantes en machos de raza Rasa Aragonesa obtuvieron diferencias estadísticas significativas a favor del grupo tratado con melatonina, expresando niveles máximos de testosterona a partir de la semana 12 de la colocación del implante. A diferencia de nuestra experiencia, el valor máximo expresado en el lote de animales con implantes de melatonina fue en la tercera quincena (45 días) en el primer ensayo, similar a lo observado por Kokolis et al. (2000) y en la semana 16 en la segunda experiencia. La acción de la melatonina sobre los niveles de testosterona, tanto en sangre como en plasma seminal, podría ser debido al efecto estimulante de la hormona pineal en el eje hipotálamo-hipófisis, provocando el

aumento del nivel de testosterona a través de un aumento de secreción de GnRH y el LH (Misztal et al., 2002). Aunque este mecanismo de acción está aún bajo estudio, algunos recientes trabajos han sugerido que la melatonina podría actuar en el eje reproductivo a través de la acción directa sobre la expresión del gen GnRH y la regulación de la proteína G acoplada a receptores de melatonina y serotonina en las neuronas de GnRH del hipotálamo mediante la unión a sus receptores que llevaría a causar un aumento en la secreción de pulsos de GnRH y un aumento inmediato de la secreción pulsátil de LH (Viguie et al., 1995), que también llevaría a un aumento en la testosterona de liberación entre dos y cuatro semanas después del cambio de las condiciones de fotoperíodo (Rosa y Bryant, 342 2003). Sin embargo, estudios recientes en la rata y el hámster que han mostrado la presencia del receptor MT1 de melatonina en las células de Leydig (Frungeri et al., 2005) y su acción directa en la secreción de andrógenos (Valenti y Giusti, 2002), sugieren una acción más directa de la melatonina sobre la secreción de testosterona en los testículos. La testosterona encontrada en el plasma seminal podría provenir de los fluidos de los túbulos seminíferos, *intersticium* y la *rete testis*, donde también se puede medir (Comhaire y Vermeulen, 1976). La testosterona en el testículo es esencial para la espermatogénesis y por lo tanto la fertilidad además, la testosterona podría inhibir la apoptosis celular espermática (Ruwanpura et al., 2010) y por lo tanto aumentarla calidad seminal, aunque por lo anteriormente mencionado los resultados sobre los parámetros de calidad seminal son muy variables.

Con respecto a los resultados de la evaluación del semen descongelado de ambos ensayos, solo se encontraron diferencias significativas sobre la motilidad espermática total a favor del grupo control en el primer experimento, el resto de las variables no generaron diferencias estadísticas significativas tal como ocurrió en el trabajo de Wales y White (1963). Casao et al. (2007) demuestran cómo el tratamiento durante el anestro en machos de raza Rasa Aragonesa tratados con implantes de melatonina incrementa el porcentaje de espermatozoides móviles progresivos, aunque otros autores no encontraron diferencias significativas para este parámetro (Kaya et al., 2000).

Si bien en estos estudios se utilizaron técnicas subjetivas de valoración de la motilidad, el aumento de motilidad progresiva debería estar relacionado con una mejora de la fertilidad in vivo, ya que sólo los espermatozoides con buena motilidad progresiva pueden atravesar el cuello del útero (Mortimer, 1997, 2000).

El resto de las evaluaciones de calidad espermática (funcionalidad mitocondrial y estado de capacitación) se realizaron tras pasar el semen por gradientes de Percoll con el fin de lograr una mayor población de células vivas sin evidenciar diferencias estadísticas entre tratamientos. Para el caso de la evaluación del estado de capacitación con CTC Gillan et al. (1999) indicaron que la dilución, la congelación y la descongelación del semen inducen cambios estructurales que conducen a una capacitación prematura en los espermatozoides. Sin embargo, es posible que las células muertas pierdan su contenido acrosomal, debido a la rotura de membranas, presentando una similitud con los cambios acrosomales producidos durante la capacitación (Martiet al., 2000). Por lo tanto, es necesario evaluar el estado de capacitación sólo en aquellos espermatozoides que sobreviven a la congelación.

Watson (1995) sugirió que el frío que sufren los espermatozoides a través del procedimiento de congelación genera una capacitación prematura de los mismos y causa una menor fertilidad detectados en procedimientos in vitro.

EXPERIMENTO 3: RESULTADO DE LOS ÍNDICES REPRODUCTIVOS DE HEMBRAS EN ANESTRO ESTACIONAL BAJO UN MANEJO NETAMENTE EXTENSIVO

Las bondades del uso de implantes de melatonina en la especie ovina para mejorar los parámetros reproductivos durante el anestro estacional han sido ampliamente contrastadas en el hemisferio norte. Palacín et al. (2011), en un metaanálisis realizado sobre 139 experiencias realizadas en España, demostraron que los implantes de melatonina incrementan de manera significativa la fertilidad en un 29%, la prolificidad en 0,08 corderos/parto, y la fecundidad en 0,25 corderos extra producidos/oveja tratada. Sin embargo, los estudios realizados en el hemisferio sur son más escasos y contradictorios. De hecho, apenas hay información del uso de implantes en Argentina ni en zonas del hemisferio sur tan extremas como el paralelo 45°.

Nowers et al. (1994), al sur de África (32°S) sobre ovejas Dohne Merino observaron que los implantes de melatonina generaban diferencias significativas en la presentación de celos, siendo estos más tempranos y mejorando las performances reproductivas.

Gonzalez Morales (1998) en Chile (39°S) observó sobre ovejas raza Austral que el uso de implantes de melatonina permitía detectar celo a los 37 días post-implante y que el número de hembras en estro iba aumentando a medida que pasaban los días produciéndose un alza de ovejas en estro entre los 57 y 62 días postimplante siendo el promedio de 61 días.

Por otro lado Kenawey y Gilmore (1984) en el sur de Australia (34°S) pudieron observar el papel de la glándula pineal y la melatonina en la pubertad, aplicándole implantes de melatonina a corderas nacidas de ovejas pinealectomizadas, pudiendo observar que la pubertad se demoraba significativamente en las corderas tratadas con melatonina que en las del grupo control.

En otras experiencias utilizando animales de distintas razas y bajo diferentes latitudes no se observaron diferencias significativas entre animales tratados y no tratados respecto a la proporción de ovejas cíclicas en el momento de la introducción de machos en mayo (30 vs. 31%; Zuñiga et al., 2002), enero (75 vs. 69%) y marzo (26 vs. 26%; Forcada et al., 2002), Aunque Palacín et al. (2008) pone de manifiesto la posible inducción de la actividad ovárica por la acción de la melatonina.

Sin embargo en nuestra experiencia hemos observado una falta total de manifestaciones de celo para ambos tratamientos en estudio, y esto se tradujo con la falta de libido de

parte de los moruecos, que, siendo este un manejo ultra extensivo y al ser cuadros tan grandes, se les hacían recorridas a caballo cada 15 días por si algún macho se alejaba de las hembras y pudiera detectar las hembras en celo pero siempre los machos estaban apartados de las hembras.

Por supuesto que, en base a los objetivos planteados en este experimento, en el que esperábamos una respuesta de ciclicidad ovárica mayor en los animales tratados con melatonina y al menos un pequeño porcentaje de ovejas del grupo control que por el efecto macho realizado muestren signos de actividad ovárica, pero no la nulidad de respuesta en ambos tratamientos.

Gomez Brunet et al. (1995) informó que la melatonina parece no tener efecto sobre la secreción de LH antes o inmediatamente después de la introducción de los machos. Así, tanto ovejas tratadas como no tratadas con melatonina durante el anestro, responden a la introducción de los machos con un incremento en la frecuencia de los pulsos de LH, pero no observó cambios significativos en la amplitud de los pulsos, en los niveles medios de LH, en el intervalo entre la introducción de machos y el pico de LH, ni en la magnitud de dicho pico.

Abecia et al. (2005) en ovejas raza Rasa Aragonesa aplicando un implante subcutáneo de melatonina en anestro estacional y con 40 días de efecto macho observó un efecto significativo del tratamiento sobre la ciclicidad temprana luego del efecto macho y en consecuencia en la curva de partos.

Si bien la condición corporal de las ovejas al momento de colocar los implantes no era la ideal para ambos grupos en estudio por los años de sequía que viene sufriendo la regio Patagónica Argentina, y teniendo en cuenta lo observado por (Rondon et al.,1994), que indican que la colocación de un solo implante en estación reproductiva permite que ovejas de inferior condición corporal tengan la misma respuesta ovárica que animales con mejor estado corporal, siendo importante destacar que nuestro experimento fue en anestro reproductivo, momento en el cual en un manejo netamente extensivo es la etapa de recuperación de los aporte forrajeros naturales y en donde los animales comienzan a recuperar su estado corporal tras la salida del invierno, por lo que creemos que su condición corporal baja al inicio del experimento no fue la causa de la respuesta obtenida.

CONCLUSIONES

En las condiciones en las que se han realizado los experimentos que se presentan en esta memoria de Tesis Doctoral, en lo que especialmente se refiere a situación geográfica y razas empleadas, podemos concluir que:

- La melatonina exógena puede mejorar la viabilidad de los embriones recolectados en ovejas Dohne Merino después de la superovulación en el periodo de anestro estacional, sin embargo, este efecto no se ve reflejado durante la estación reproductiva.
- El tratamiento con melatonina de ovejas donantes de embriones en anestro estacional no mostro beneficios en términos de mejora de tasa de ovulación y de producción de embriones para hembras raza Dohne Merino en la región Patagónica Argentina
- El uso de implantes de melatonina en anestro estacional sobre moruecos raza Dohne Merino en la región Patagónica Argentina logra modificar en forma significativa la circunferencia escrotal sin modificar los parámetros de calidad seminal tanto en muestreos de semen fresco como en semen descongelado.
- Los implantes de melatonina en hembras Merino manejadas a campo en forma ultraextensiva en la región Patagónica Argentina no manifestaron respuesta favorable a la presentación de celo complementadas con el tratamiento de efecto macho.
- Son necesarios más estudios que nos permitan conocer las posibilidades de uso de los implantes de melatonina en un sistema ultra extensivo como el de la región Patagónica Argentina.

ANEXO

DILUYENTE PARA CONGELACIÓN

(Según protocolo de Maxwell, 1996)

Tris [hydroxymethyl] amino-methane 99,9 % Trizma base® SIGMA T1410	4,356 g
Glucosa D-(+)-Glucose® SIGMA G6152	0,598 g
Acido Cítrico Citric acid monohydrate® SIGMA C7129	2,386 g
Estreptomicina Streptomycin sulfate salt®	0,100 g
Penicilina G Benzilpenicillin Sodium salt® SIGMA P3032	0,060 g
Agua pura c.s.p. Bamstead/ultraline®, modelo D 11931 (USA)	76 ml
Glicerol 99 % Glycerol® SIGMA G2025	7 ml
Yema de huevo	10 ml

Nota: Alicuotar en tubos a razón de 10 ml c/u. Conservar congelado a -20 °C hasta 1 hora antes de su uso. Descartar el remanente diario.

SOLUCIÓN DE CITRATO DE SODIO 2,92 %

Citrato de Sodio Sodium citrate® MALLINCKRODT 0754	2,92g
Agua pura c.s.p. Bamstead/Ultraline®, modelo D 11931 (USA)	100 ml

Nota: Conservar en nevera hasta su uso.

TINCIÓN EOSINA NIGROSINA

Citrato de sodio dihidratado	2,45 g
Nigrosina	2 g
Eosina	1 g
Agua bidestilada estéril	100 ml

SOLUCIÓN HOS

(Según Paulenz, 1992)

Citrato de Sodio	0,49 g
Sodium citrate® MALLINCKRODT 0754	
Fructosa	0,90 g
D-(+)-Fructose® SIGMA F3510	
Agua pura c.s.p	100 ml
Bamstead/Ultraline®, modelo D 11931 (USA)	

Nota: Ajustar la osmolaridad a 100 mOsm/l pH a 7,5-7,8 (ajustar adicionando hidróxido de sodio (Sodium hydroxide® SIGMA S5881). Alicuotar en botellas con tapa a razón de 50 ml c/u y conservar en nevera a 5°C hasta su uso.

SOLUCIÓN HOS FORMOL (STOP)

Solución HOS 1 ml

Solución formol al 38 % 3 µl

Formaldehyde solution® SIGMA F8775

Nota: Conservar a 5 °C hasta su uso.

SOLUCIÓN ISOTÓNICA (Según protocolo de Harrison y Vickers, 1990)

Cloruro de sodio (140 mM) 0,810 g

Sodium chloride® SIGMA S5806

Glucosa (10 mM) 0,180 g

D-(+)-Glucose® SIGMA G6152

Cloruro de Potasio (2,5 mM) 0,018 g

Potassium chloride® SIGMA P8136

Alcohol Polivinilico (0,5 g/ml) 0,050 g

Polyvinyl alcohol® SIGMA P8136

Polivinilpirrolidona (0,5 g/ml) 0,050 g

Polyvinylpyrrolidone® SIGMA P0930

Hepes (20 mM) 0,560 g

HEPES Sodium salt® SIGMA H9136 o H7006

Agua pura c.s.p. 100 ml

Bamstead/ultraline®, modelo D 11931 (USA)

Nota: Ajustar el pH a 7,5 con el agregado de Hidróxido de Sodio (Sodium hydroxide® SIGMA S6881) y la osmolaridad a 300 mOsm/l. Conservar a 5 °C hasta su uso.

SOLUCIÓN ISOTÓNICA FORMOLADA

Solución de formol al 38 %	10 µl
Formaldehyde solution® SIGMA F8775	
Solución isotónica	1470 µl

Nota: Conservar a 5 °C hasta su uso.

SOLUCIÓN DE IODURO DE PROPIDIO (PI)

(Según protocolo de Harrison y Vickers, 1990)

a) Solución Stock (1mg/ml)

Ioduro de propidio	0,010 g
Propidium iodide® SIGMA P4170	
Agua pura c.s.p.	10 ml
Bamstead/Ultraline®, modelo D 11931 (USA)	

Nota: Conservar a 5 °C y al abrigo de la luz

b) Solución de trabajo (0,5 mg/ml)

Solución stock de Ioduro de Propidio	500 µl
Agua pura	500 µl

Nota: Conservar a -20 °C y al abrigo de la luz hasta 1 hora antes del uso

SOLUCIÓN DE RHODAMINA 123 (Rh 123)

(Según protocolo de Grasa, 1997)

a) Solución Stock (0,4 mg/ml)

Rodamina 123 0,004 g

Rhodamine 123® SIGMA C5879

Dimetil sulfóxido (DMSO) 1 ml

Dimethyl sulfoxide® SIGMA C5879

Nota: Conservar a -20 °C y al abrigo de la luz

b) Solución de trabajo (0,2 mg/ml)

Solución stock de Rodamina 500µl

DMSO 500µl

Nota: Alicuotar en 20 tubos eppendorf con 100 µl c/u, conservar a -20 °C y al abrigo de la luz hasta 1 hora antes de su uso.

BIBLIOGRAFÍA

- ABECIA, J.A., FORCADA, F., LOZANO, J.M. (1999). A preliminary report on the effect of dietary energy on prostaglandin F_{2α} production in vitro, interferon-tau synthesis by the conceptus, endometrial progesterone concentration on days 9 and 15 of pregnancy and associated rates of embryo wastage in ewe. *Theriogenology* 52(7), 1203-1213.
- ABECIA, J.A., FORCADA, F., ZUÑIGA, O. (2002). The effect of melatonin on the secretion of progesterone in sheep and on the development of ovine embryos in vitro. *Veterinary Research Communications*, 26: 151-158.
- ABECIA, J.A., PONTES GONZÁLEZ, J.M., PONTES GARCÍA, J.M., MARTÍN, S., FORCADA, F., VALARES, J.A., PALACÍN, I., MARTINO, A. (2005). Use of melatonin implants for spring mating integrated in the STAR system in Manchega ewes. *Proceedings of 6th International Sheep Veterinary Congress, Greece*. Reproduction: 121-122
- ABECIA, J.A., SOSA, C., FORCADA, F., MEIKLE, A. (2006). The effect of undernutrition on the establishment of pregnancy in the ewe. *Reprod. Nutr. Dev.* 46, 367-378.
- ABECIA, J.A., VALARES, J.A., FORCADA, F., PALACÍN, I., MARTIN, S., MARTINO, A. (2007). The effect of melatonin on the reproductive performance of three sheep breeds in Spain. *Small Ruminant Research*, 69: 10-16.
- ABECIA, J.A., FORCADA, F., CASAO, A., PALACÍN, I. (2008). Effect of exogenous melatonin on the ovary, the embryo and the establishment of pregnancy in ewes. *Animal*, 2, 399-404
- ABECIA, J.A., FORCADA, F., GONZÁLEZ-BULNES, A. (2011). Pharmaceutical control of reproduction in sheep and goats. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 27, 67-79
- AMANN RP (1989). Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *J Andrology*;10:89-98.
- ANZAR, M.; HASSAN, M.M.; GRAHAM, E.F.; DEYO, R.C.M.; SINGH, G. (1991) - Efficacy of the Hamilton Thorn motility analyzer (HTM-2030) for the evaluation of bovine semen. *Theriogenology* 36: 307- 317.
- ARROYO, L.J., GALLEGOS-SÁNCHEZ, J., VILLA-GODOY, A., BERRUECOS, J.M., PERERA, G., VALENCIA, J. (2007). Reproductive activity of Pelibuey and Suffolk ewes at 19° north latitude. *Animal Reproduction Science*. 102: 24-30.
- ARENDRT, J., LAUD, C.A., SYMONS, A.M., PRYDE, S.J. (1983). Plasma melatonin in ewes after ovariectomy. *Journal of Reproduction and Fertility*, 68: 213-218.

- AVDI, M., BANOS, G., STEFOS, K., CHEMINEAU, P. (2004). Seasonal variation in testicular volume and sexual behavior of chios and serres rams. *theriogenology*, 62: 275- 282.
- BARBOSA R., P. BARBOSA, M. DE ALENCAR, F. DE OLIVEIRA E V. FONSECA. (1991). Biometría testicular e aspectos do sêmen de touros das raças Canchim e Nelore. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 15 (3-4): 159-170.
- BARRELL, G.K., MOENTER, S.M., CARATY, A., KARSCH, F.J. (1992). Seasonal-changes of gonadotropin-releasing-hormone secretion in the ewe. *Biology of Reproduction*, 46: 1130-1135.
- BARI, F., KHALID, M., WOLF, B., HARESIGN, W., MURRAY, A. & MERRELL, B. (2001). The repeatability of superovulatory response and embryo recovery in sheep. *Theriogenology*.56 (1): 147-155.
- BARIL G., CHEMINEAU P., CONGIE Y., GUÉRIN Y., LEBOEUF B., ORGEUR P., (1993). Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins. étude fao production et santé animales, 83, Roma, 227 pp.
- BEDFORD, J.M. (1970) - Sperm capacitation and fertilization in mammals. *Biol Reprod Supplement 2*: 128-158.
- BELTRAN DE HEREDIA, I.; (1995) Estudio de la producción y la calidad del semen de morueco de raza latxa. resultados obtenidos con distintas técnicas de congelación e inseminación. Tesis doctoral. Universidad de zaragoza.
- BERLINGUER, F., LEONI, G., BOGLIOLO, L., PINTUS, P. P., ROSATI, I., LEDDA, S. & NAITANA, S. (2004). FSH different regimes affect the developmental capacity and cryotolerance of embryos derived from oocytes collected by ovum pick-up in donor sheep. *Theriogenology*.61 (7-8): 1477-1486.
- BERNARD, S., MACEDO, N., MALPAUX, B., CHEMINEAU, P. (2001). Comparison of immune parameters of sheep with naturally high or low plasma concentrations of melatonin. *J. Pineal Res.*, 31: 248-255.
- BERNDTSON, W.E.; OLAR, T.T.; PICKETT, B.W. (1981) - Correlation between post-thaw motility and acrosomal integrity of bovine sperm. *J Dairy Sci* 64: 346-349.
- BETTENCOURT, E. M., BETTENCOURT, C. M., SILVA, J. C. E., FERREIRA, P., MANITO, C. I., MATOS, C. M., ROMÃO, R. J. & ROCHA, A. (2008). Effect of season and gonadotrophin preparation on superovulatory response and embryo quality in Portuguese Black Merinos. *Small Ruminant Research*.74 (1-3): 134-139.
- BISTER, J.L., NOEL, B., PERRAD, B., MANDIKI, S.N.M., MBAYAHAGA, J., PAQUAY, R. (1999). Control of ovarian follicles activity in the ewe. *Domestic Animal Endocrinology*, 17: 315-328.

- BITTMAN, E.L., KAYNARD, A.H., OLSTER, D.H., ROBINSON, J.E., YELLON, S.M., KARSCH, F.J. (1985). Pineal melatonin mediates photoperiodic control of pulsatile luteinizing-hormone secretion in the ewe. *Neuroendocrinology*, 40: 409-418
- BLONDIN, P., COENEN, K., GUILBAULT, L. A. & SIRARD, M. A. (1996). Superovulation can reduce the developmental competence of bovine embryos. *Theriogenology*.46 (7): 1191-1203.
- BOLAND MP, AL-KAMALI AA, CROSBY TF, HAYNES NB, HOWLES CM, (1985). The influence of breed, season and photoperiod on semen characteristics, testicular size, libido and plasma hormone concentration in rams. *AnimReprodSci* 9: 241-252.
- BRAVO, J.A.(2003) Influencia de los implantes de melatonina sobre las características espermáticas y actividad sexual del morueco en estación no sexual. *Seoc. Badajoz*.
- BREITBART H, RUBINSTEIN S, LAX Y.(1995) Regulatory mechanisms in acrosomal exocytosis. *Rev Reprod. Sep*; 2(3): 165-74.
- BUDWORTH, P.R; AMANN, R.P.; CHAPMAN, P.L. (1988) - Relationships between computerized measurements of motion of frozen-thawed bull spermatozoa and fertility. *J Androl* 9: 41-54
- CAHILL, L. P., DRIANCOURT, M. A., CHAMLEY, W. A. & FINDLAY, J. K. (1985). Role of intrafollicular regulators and FSH in growth and development of large antral follicles in sheep. *J ReprodFertil.* 75 (2): 599-607.
- CASAO, A., VEGA, S., PÉREZ-PE, R., CEBRIÁN-PÉREZ, J.A., MUIÑO-BLANCO, T., ABECIA, J.A., FORCADA, F., PALACÍN, I. (2007). Efecto de los implantes de melatonina en la motilidad del semen de morueco de raza rasa aragonesa en época de anestro. *Itea*, i: 6-8.
- CASAO, A., CEBRIAN, I., ASUMPCAO, M.E., PEREZ-PE, R., ABECIA, J.A., FORCADA, F., CEBRIAN-PEREZ, J.A. & MUINO-BLANCO, T. (2010a). Seasonal variations of melatonin in ram seminal plasma are correlated to those of testosterone and antioxidant enzymes. *ReproductiveBiology and Endocrinology*, Vol.8, (Jun), pp. 1477-7827, 1477-7827.
- CASAO, A., MENDOZA, N., PEREZ-PE, R., GRASA, P., ABECIA, J.A., FORCADA, F., CEBRIAN-PEREZ, J.A. & MUINO-BLANCO, T. (2010b). Melatonin prevents capacitation and apoptotic-like changes of ram spermatozoa and increases fertility rate. *Journal of Pineal Research*, Vol.48, No.1, (Jan), pp. 39-46, 0742-3098

- CASAO, A., PÉREZ-PÉ R., ABECIA J.A., FORCADA F., MUIÑO-BLANCO T., CEBRIÁN-PÉREZ J.A. (2013). The effect of exogenous melatonin during the non-reproductive season on the seminal plasma hormonal profile and the antioxidant defence system of Rasa Aragonesa rams. *Anim. Reprod. Sci.*
- CHAGAS E SILVA, J., LOPES DA COSTA, L., CIDADÃO, R. & ROBALO SILVA, J. (2003). Plasma progesterone profiles, ovulation rate, donor embryo yield and recipient embryo survival in native Saloia sheep in the fall and spring breeding seasons. *Theriogenology*.60 (3): 521-532.
- CHEMINEAU, P., A. DAVEAU, F. MAURICE, AND J. A. DELGADILLO. (1992). Seasonality of estrus and ovulation in not modified by subjecting female alpine goats to a tropical photoperiod. *Small Rumin. Res.* 8:299–312.
- CHEMINEAU, P., MALPAUX, B., PELLETIER, J., LEBOERU, B., DELETANG, F., POBEL, P., BRICE, G. (1996). Emploi des implants de mélatonine et des traitements photoperiodiques pour maîtriser la reproduction chez les ovins et les caprins. *INRA Prod. Anim.*, 91 (1): 45-60
- CHETSAWANG, B., PUTTHAPRASART, C., PHANSUWAN-PUJITO, P. & GOVITRAPONG, P. (2006). Melatonin protects against hydrogen peroxide-induced cell death signaling in SH-SY5Y cultured cells: involvement of nuclear factor kappa B, Bax and Bcl-2. *Journal of Pineal Research*. 41 (2): 116-123.
- CHUPIN, D., COGNIE, Y., COMBARNOUS, Y., PROCUREUR, R. & SAUMANDE, J. (1987). Effect of purified LH and FSH on ovulation in the cow and the ewe. In: O'Callaghan, J. R. (ed.) *Follicle Growth and Ovulation Rate in Farm Animals*, p 63-72. Dordercht
- CLARKE, I.J., THOMAS, G.B., YAO, B., CUMMINS, J.T. (1987). GnRH secretion throughout the ovine estrous-cycle. *Neuroendocrinology*, 46: 82-88.
- CLARKE, I.J. (1988). Gonadotropin-releasing hormone-Secretion (GnRH) in anestrous ewes and the induction of GnRH surges by estrogen. *Journal of Endocrinology*, 117: 355-360.
- CLEMMENS, J.W., JARZUNKA, M.J., WITT-ENDERBY, P.A. (2001). Down-regulation of mt1 melatonin receptors in rat ovary following estrogen exposure. *Life Sciences* 69, 27-35.
- COETZEE, K.; KRUGER, T.F.; LOMBARD, C.J.; SHAUGHNESSY, D.; OEHNINGER, S.; ÖZGÜR, K.; POMEROY, K.O.; MULLER, C. (1999) - Assessment of interlaboratory sperm morphology readings with the use of a Hamilton Thorne Research integrated visual optical system semen analyzer. *Fertility and Sterility* 71: 80-84.
- COGNIE, Y. (1992). Progress in reproduction techniques in sheep. *World Sheep and Wool Congress*, Argentina.

- COLAS, G. (1980). Seasonal-variations of semen quality in adult Île-de-France rams .1. Study of cell morphology and massal motility of sperm. *Reproduction Nutrition Development*, 20: 1789-1799
- COLAS, G., GUERIN, Y., LEMAIRE, Y., MONTASSIER, Y., DESPIERRES, J. (1986). Seasonalvariations in the testicular diameter and sperm morphology of Vendean and Texel rams. *Reproduction Nutrition Development*, 26: 863-875.
- COMHAIRE F.H.,;VERMEULEN A. (1976)Testosterone concentration in the fluids of seminiferous tubules, the interstitium and the rete testis of the rat. *J Endocrinol*. Aug;70(2):229-35.
- CONTI, A., CONCONI, S., HERTENS, E., SKWARLO-SONTA, K., MARKOWSKA, M., MAESTRONI, G.J.M. (2000).Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *Journal of Pineal Research*, 28: 193-202.
- CROSS, N.L.; MEIZEL, S. (1989)- Minireview-methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biol Reprod* 41: 635-641.
- D'ALESSANDRO, A., MARTEMUCCI, G., TOTEDA, F., GAMBACORTA, M. & MANCHISI, A. (1996).Superovulation and embryo production in ewes using a commercial p-FSH.*Small RuminantResearch*. 19: 255-261
- DAVIS, R.O.; SIEMERS, R.J. (1995) - Derivation and reliability of kinematic measures of spermotion. *Reprod Fertil Dev* 7: 857-869.
- DE LEEUW, A.M.; DEN DAAS, J.H.; WOELDERS, H. (1991) - The fix vital stain methodsimultaneous determination of viability and acrosomal status of bovine spermatozoa. *J Androl* 12: 112-118.
- DEMOUSTIER, M. M., BECKERS, J. F., VAN DER ZWALMEN, P., CLOSSET, J., GILLARD, J. L. & ECTORS, F. (1988). Determination of porcine plasma follitropin levels during superovulation treatment in cows. *Theriogenology*.30 (2): 379-386.
- DE LA VEGA A. (1998). Un enfoque actualizado sobre evaluación reproductiva de los toros. *Publicación Especial 36. Facultad de Agronomía y Zootecnia, UNT*. 46 pp.
- DEN DAAS, N. (1992) - Laboratory assessment of semen characteristics. *Anim Reprod Sci* 28: 87- 94.
- DRIANCOURT, M. A., GIBSON, W. R. & CAHILL, L. P. (1985). Follicular dynamics throughout the oestrous cycle in sheep.A review.*Reproduction Nutrition Développement*.25 (1A): 1-15
- DRIANCOURT, M. A. (1987). Ovarian features contributing to the variability of PMSG-induced ovulation rate in sheep. *J ReprodFertil*.80 (1): 207-212.

- DRIANCOURT, M.A., GOUGEON, A., ROYERE, D., THIBAUT, C. (1993). Ovarian function in: Reproduction in mammals and man. C. Thibault, M.C. Levasseur, R.H.F. Hunter (eds.), Paris, Ellipses, 281-305.
- DRIANCOURT, M.A. (2001). Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals: implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*, 55(6):1211-1239
- DUROTOYE, L.A., WEBLEY, G.E., RODWAY, R.G. (1997). Stimulation of the production of progesterone by the corpus luteum of the ewe by the perfusion of melatonin in vivo and by treatment of granulosa cells with melatonin in vitro. *Research in Veterinary Science*, 62: 87-91
- EBLING FJ, CLAYPOOL LE, FOSTER DL. (1988). Neuroendocrine responsiveness to light during the neonatal period in the sheep. *J Endocrinol*. Nov;119(2):211-8.
- ENGLISH, J., POULTON, A.L., ARENDT, J., SYMONS, A.M. (1986). A comparison of the efficiency of melatonin treatments in advancing estrus in ewes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 77: 321-327.
- EVANS, A. C. O., DUFFY, P., HYNES, N. & BOLAND, M. P. (2000). Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. *Theriogenology*, 53 (3): 699-715.
- FARRELL, P.B.; PRESICCE, G.A.; BROCKETT, C.C.; FOOTE, R.H. (1998) - Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Therio* 49: 871-879.
- FISKE, V.M., PARKER, K.L., ULMER, A., SENG, H. O., AZIZ, N. (1984). Effects of melatonin alone or in combination with human chorionic gonadotropin or ovine luteinizing hormone on the in vitro secretion of oestrogen or progesterone by granulosa cells of rats. *Endocrinology* 114, 407-410.
- FITZGERALD JA, STELLFLUG JN, (1991): Effects of melatonin on seasonal changes in reproduction of rams. *J AnimSci* 69, 264-275.
- FOOTE, R. H., J. HAHN AND L. L. LARSON. (1970). Testicular measurements as predictors of sperm output and semen quality. *Proc. 3rd. Tech. Conf. A.I. and Reprod.* P. 31.
- FORCADA, F., ABECIA, J.A., SIERRA, I. (1992). Seasonal-changes in estrus activity and ovulation rate in Rasa-Aragonesa ewes maintained at 2 different body condition levels. *Small Ruminant Research*, 8: 313-324.
- FORCADA, F., ZARAZAGA, L., ABECIA, J.A. (1995). Effect of exogenous melatonin and plane of nutrition after weaning on estrous activity, endocrine status and ovulation rate in Salz ewes lambing in the seasonal anestrus. *Theriogenology*, 43: 1179-1193

- FORCADA, F. ABECIA, J.A., ZÚÑIGA, O., LOZANO, J.M. (2002). Variation in the ability of melatonin implants inserted at two different times after the winter solstice to restore reproductive activity in reduced seasonality ewes. *Australian Journal of Agricultural Research* 53, 167-173.
- FORCADA, F., J.A. ABECIA, J.A. CEBRIÁN-PÉREZ, M.T. MUIÑO-BLANCO, J.A. VALARES, AND I. PALACÍN. (2006). The effect of melatonin implants during the seasonal anestrus on embryo production after superovulation in aged high-prolificacy Rasa Aragonesa ewes. *Theriogenology* 65: 356-365.
- FORCADA F., ABECIA A., CASAO A.; VÁZQUEZ, I. (2009) INTERACCIONES AMBIENTALES SOBRE LA REPRODUCCIÓN EN OVINO. 2ª Congreso Internacional en Ciencias Veterinarias y Zootecnia. Universidad de Puebla, México.
- FORCADA, FORCADA, F., AIT AMER MEZIANE, M., MAUREL, M.C., BUFFONI, A., CASAO, A., VÁZQUEZ, M.I.; ABECIA, J.A., CALVO, J.L.; ASENJO, B.(2010) Efecto de los niveles de anticuerpos anti-ecg sobre la producción de embriones in vivo tras superovulaciones repetidas con un protocolo simplificado conteniendo ecg en ovejas de raza Ojalada. *Seoc*.
- FORTUNE, J.E.,(2002). Activation of primordial follicles.in: Eppig J., Hegele-harung Ch., Lessl M. (eds.) *The future of the oocyte basic and clinical aspects*. Springer. Nueva York, EEUU. pp 11-21.
- GARCÍA PASTOR, L., GONZÁLEZ, J., FIGUERAS, L., CALLEJAS, M., CEBRIÁN, L., ESPADA, M. (2004). Implantes de melatonina en moruecos. Efecto sobre algunos índices reproductivos en un rebaño de raza Rasa Aragonesa. *Producción Ovina y Caprina, SEOC Lérida, XXIX*: 149-151.
- GARDE LÓPEZ-BREA, J.J., PÉREZ-GUZMÁN PALOMARES, M.D., PÉREZ GARNELO, S.S., GARZÓN SIGLER, A. Y MONTORO ANGULO, V. 1996. Características seminales de corderos de raza Manchega tratados con implantes de melatonina. *Arch. Zootec.*, 45: 395-401.
- GÓMEZ BRUNET, A., LÓPEZ SEBASTIÁN, A., PICAZO, R.A., CABELLOS, B., GODDARD, S. (1995). Reproductive response and Lh-secretion in ewes treated with melatonin implants and induced to ovulate with the ram effect. *Animal Reproduction Science*, 39: 23-34.
- GASTEL T., BIELLI A., PEREZ R., LOPEZ A., CASTRILLEJO A., TAGLE R., FRANCO J., LABORDE D., FORSBERG M., RODRIGUEZ-MARTINEZ H., 1995. Seasonal variations in testicular morphology in Uruguayan Corriedale rams. *Animal Reproduction Science*, 40. (1): 59-75.
- GIBBONS, J.R., WILTBANK, M.C., GINTHER, O.J. (1997). Functional interrelationships between follicles greater than 4 mm and the follicle-stimulating hormone surge in heifers. *Biol. Reprod.* 57(5):1066-1073.

- GILLAN, L.; MAXWELL, W. (1999). The functional integrity and fate of cryopreserved ram spermatozoa in the female tract. *J Reprod Fertil* 54(1):271-283.
- GILLAN LINDSAY, EVANS GARETH, MAXWELL W.M.C. (2005). Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential *Theriogenology.*; 63: 445–457.
- GLAUBER C. (1990). El toro en el rodeo de cría: aporte a la eficiencia reproductiva y propuesta para su evaluación. *Veterinaria Argentina*, XII (70): 690-698.
- GONZALEZ-BULNES, A., SANTIAGO-MORENO, J., COCERO, M. J. & LOPEZ-SEBASTIAN, A. (2000). Effects of FSH commercial preparation and follicular status on follicular growth and superovulatory response in Spanish Merino ewes. *Theriogenology*. 54 (7): 1055-1064.
- GONZÁLEZ-BULNES, A., BAIRD, D.T., CAMPBELL, B.K., COCERO, M.J., GARCÍA-GARCÍA, R.M., INSKEEP, E.K.. (2004). Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. *Reproduction, Fertility and Development* 16(4):421-435.
- GONZALEZ MORALES, P.C. (1998). Actividad reproductiva de Ovejas del Genotipo Austral implantadas con Melatonina (Regulin)® Tesis de Grado
- GONZALEZ-REYNA, A., MARQUEZ-GARCA, E., LIZARRAGA-TRACY, H. & MARTNEZ-GONZALEZ, J. C. (1999). Dose response effects of PMSG on ovulation rate and follicular development in Pelibuey ewes treated with Syncro-mate-B implants. *Small Ruminant Research*.31: 149-155.
- GORDON I.(2003). Laboratory production of Cattle Embryos. Second Edition. CABI. Publishing.
- HAFEZ, E.S.E. (1952). Studies on the breeding season and reproduction of the ewe 1: the breeding season in different environments .2: the breeding season in one locality. *Journal of Agricultural Science*, 42: 189-231.
- HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. (1990) - Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl* 11: 73-88.
- HARESIGN W, PETERS AR, STAPLES LD (1990). The effect of melatonin implants on breeding activity and litter size in commercial sheep flocks in the UK. *Anim Prod* ; 50:111-121.
- HARRISON, R.A.P. (1998) - Sperm evaluation: what should be testing? In: K.Oono, D.A.Vaughan, Y.Nagamine, H.Kaneko, J.Noguchi, K.Shirata, S.Miyazaki, K.Kato (Eds), *Genetic Diversity and Conservation of Animal Genetic Resources*. Proceedings of the 6th MAFF International Workshop on Genetic Resources, Nov 4-5, 1998, Tsukuba, Japan, pp135-154.

- HARRISON, R.A.P; VICKERS, S.E. (1990)- Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fert* 88: 343-352.
- HENDERSON, K. M., WEAVER, A., WARDS, R. L., BALL, K., LUN, S., MULLIN, C. & MCNATTY, K. P. 1990. Oocyte production and ovarian steroid concentrations of immature rats in response to some commercial gonadotrophin preparations. CSIRO Publishing.
- HERNÁNDEZ FJ, SÁNCHEZ JJ, ABREU P, LÓPEZ-COVIELLA, TABARES L, PRIETO L, ALONSO R (2001): Estrogen modulates-adrenoceptor-induced signaling and melatonin production in female rat pinealocytes. *Neuroendocrinology* 73: 111-122.
- HIRSHFIELD, A.N.(1991). Development of follicles in the mammalian ovary. In: K.W. Jeon and M. Friedlander, editor. *International Review of Cytology*: academic press; p. 43-101
- HOLT, W.V. (1996) - Can we predict fertility rates? Making sense of sperm motility. In D.Rath, L.A. Johnson & K.F. Weitze (Ed), *Boar Semen Preservation III*, Proc 3rd Int Conf on Boar Semen Preservation, Mariensee, Germany, Aug 1995, *Repro Dom Anim* 31:17-24.
- IRVINE D.S. 1995. Computer assisted semen analysis system: sperm motility assessment. *Hum Reprod*; 10: 53-59
- ISHWAR, A. K. & MEMON, M. A. (1996). Embryo transfer in sheep and goats: a review. *Small Ruminant Research*.19: 35-43.
- JOHNSON, L.A.; MAXWELL, W.M.C.; DOBRINSKY, J.R.; WELCH, G.R. (1996) - Staining sperm for viability assessment. *Reprod Dom Anim* 31: 37-47.
- KJAESTAD, H.; ROPSTAD, E.; BERG, K.A. (1993) - Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. *Acta Vet Scand* 34: 299-303
- KARAGIANNIDIS A, VARSAKELI S, ALEXOPOULOS C, AMARANTIDIS I, 2000. Seasonal variation in semen characteristics of Chios and Friesian rams in Greece. *Small Rum Res* 37: 125-130.
- KARSCH, F.J., GOODMAN, R.L., LEGAN, S.J. (1980). Feedback basis of seasonal breeding - Test of an hypothesis. *Journal of Reproduction and Fertility*, 58: 521-535
- KARSCH, F.J., BITTMAN, E.L., FOSTER, D.L., GOODMAN, R.L., LEGAN, S.J., ROBINSON, J.E. (1984). Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. *Recent Progress in Hormone Research*, 40: 185-232.
- KARSCH, F.J., CUMMINS, J.T., THOMAS, G.B., CLARKE, I.J. (1987). Steroid feedback inhibition of pulsatile secretion of gonadotropin releasing hormone in the ewe. *Biology of Reproduction*, 36: 1207-1218.

- KARSCH, F.J., DAHL, G.E., EVANS, N.P., MANNING, J.M., MAYFIELD, K.P., MOENTER, S.M., FOSTER, D.L. (1993). Seasonal-changes in gonadotropin-releasing-hormone secretion in the ewe - Alteration in response to the negative feedback action of estradiol. *Biology of Reproduction*, 49: 1377-1383
- KAYA A, BASPINAR N, YILDIZ C, KURTOGLU F, ATAMAN MB, HALILOGLU S, (2000). Influence of melatonin implantation on sperm quality, biochemical composition of the seminal plasma and plasma testosterone levels in rams. *Rev Med Vet* 151, 1143–1146.
- KENNAWAY D.J; GILMORE T. A . (1994). Effects of melatonin implants in ewe lambs. *J. Reprod. Fert.* 70, 39-45.
- KOKOLIS N, THEODOSIADOU E, TSANTARLIOTOU M, REKKAS C, GOULAS P, SMOKOVITIS A, (2000): The effect of melatonin implants on blood testosterone and acrosin activity in spermatozoa of the ram. *Andrologia* 32, 107–114.
- KUMAR, V., LINCOLN, G.A. (1995). Effects of a one-hour light-pulse on the timing of the circadian-rhythm in melatonin secretion in rams. *Journal of Pineal Research*, 18: 21-27.
- LANGFORD GA, AINSWORTH L, MARCUS GJ, SHRESTHA JNB, (1987). Photoperiod entrainment of testosterone, luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and prolactin cycles in rams in relation to testis size and semen quality. *BiolReprod* 37: 489-499.
- LASTER, D. B. (1972). Disappearance and uptake of ¹²⁵I FSH in the rat, rabbit, ewe and cow. *J Reprod Fertil.* 30 (3): 407-415
- LEGAN, S.J., KARSCH, F.J., FOSTER, D.L. (1977). Endocrine control of seasonal reproductive function in ewe - Marked change in response to negative feedback action of estradiol on luteinizing-hormone secretion. *Endocrinology*, 101: 818-824.
- LEGAN, S.J., WINANS, S.S. (1981). The photoneuroendocrine control of seasonal breeding in the ewe. *General and Comparative Endocrinology*, 45: 317-328
- LEONI, G., BOGLIOLO, L., PINTUS, P., LEDDA, S. & NAITANA, S. 2001. Sheep embryos derived from FSH/eCG treatment have a lower in vitro viability after vitrification than those derived from FSH treatment. *Reprod. Nutr. Dev.* 41 (3): 239-246.

- LINCOLN, G.A., ALMEIDA, O.F.X., KLANDORF, H., CUNNINGHAM, R.A. (1982). Hourly fluctuations in the blood-levels of melatonin, prolactin, luteinizing-hormone, follicle-stimulating-hormone, testosterone, tri-iodothyronine, thyroxine and cortisol in rams under artificial photoperiods, and the effects of cranial sympathectomy. *Journal of Endocrinology*, 92: 237-250.
- LINCOLN, G.A., EBLING, F.J.P. (1985). Effect of constant release implants of melatonin on seasonal cycles in reproduction, prolactin secretion and molting in rams. *Journal of Reproduction and Fertility*, 73: 241-253.
- LINCOLN, G.A., DAVIDSON, W. (1977). Relationship between sexual and aggressive behavior, and pituitary and testicular activity during seasonal sexual cycle of rams, and influence of photoperiod. *Journal of Reproduction and Fertility*, 49: 267-276.
- LODGE, J.R. AND W.G. SALISBURY, (1970), Seasonal variations and male reproductive efficiency, in the testis. A.D. Johnson, W.R. Gómez and L.N. Vandermark. Academic Press. New York, U.S.A. vol. III:139.
- MALMGREN, L. (1997) - Assessing the quality of raw semen: a review. *Therio* 48: 523-530.
- MALPAUX, B., ROBINSON, J.E., BROWN, M.B., KARSCH, F.J. (1987). Reproductive refractoriness of the ewe to inductive photoperiod is not caused by inappropriate secretion of melatonin. *Biology of Reproduction*, 36: 1333-1341.
- MALPAUX, B., ROBINSON, J.E., WAYNE, N.L., KARSCH, F.J. (1989). Regulation of the onset of the breeding-season of the ewe - Importance of long days and of an endogenous reproductive rhythm. *Journal of Endocrinology*, 122: 269-278.
- MALPAUX, B., VIGUIE, C., SKINNER, D.C., THIERY, J.C., CHEMINEAU, P. (1997). Control of the circannual rhythm of reproduction by melatonin in the ewe. *Brain Research Bulletin*, 44: 431-438.
- MARTI, J.I.; CEBRIAN-PEREZ, J.A.; MUIÑO-BLANCO, T. (2000). Assessment of the acrosomal status of ram spermatozoa by RCA lectin binding and partition in an aqueous two-phase system. *J Androl*. 21(4):541-548.
- MCEVOY T.G., ROBINSON J.J., AITKEN R.P., ROBERTSON I.S. (1998) Melatonin treatment of embryo donor and recipient ewes during anestrus affects their endocrine status, but not ovulation rate, embryo survival or pregnancy. *Theriogenology* ;49:943-55.
- MCNATTY, K. P., HUDSON, N., GIBB, M., BALL, K., HENDERSON, K. M., HEATH, D. A., LUN, S. & KIEBOOM, L. E. (1985). FSH influences follicle viability, oestradiol biosynthesis and ovulation rate in Romney ewes. *J Reprod Fertil*. 75 (1): 121-131.

- MERMILLOD, P., OUSSAID, B., COGNIÉ, Y. (1999). Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the development potential of embryos. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 54:449-460.
- MISZTAL, T., ROMANOWICZ, K., BARCIKOWSKI, B., (2002). Melatonin – a modula-567 tor of the GnRH/LH axis in sheep. *Reprod. Biol.* 2, 267–275. 568
- MIXNER, J.P.; SAROFF, J. (1954) - Interference by glycerol with differential staining of bull spermatozoa. *J Dairy Sci* 37: 652.
- MOCÉ E, GRAHAM J.K. (2008). In vitro evaluation of sperm quality. *Animal Reproduction Science*; 105: 104–118
- MOENTER, S.M., CARATY, A., KARSCH, F.J. (1990). The estradiol-induced surge of gonadotropin-releasing-hormone in the ewe. *Endocrinology*, 127: 1375-1384
- MOENTER SM, CARATY A, LOCATELLI A, KARSCH FJ.(1991). Pattern of gonadotropinreleasing hormone (GnRH) secretion leading up to ovulation in the ewe: existence of a preovulatory GnRH surge. *Endocrinology* 129: 1175–1182.
- MONTGOMERY, G.W., GALLOWAY, S.M., DAVIS, G.H., MCNATTY, K.P. (2001). Genes controlling ovulation rate in sheep. *Reproduction* 121(6):843-852.
- MORTIMER, S.T., (1997). A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum. Reprod. Update* 3, 403-439.
- MORTIMER, S.T., (2000). CASA practical aspects. *J. Androl.* 21, 515-524.
- MUKASA-MUGERWA E, EZAZ Z, (1992).Relationship of testicular growth and size to age, body weight and onset of puberty in Menz ram lambs. *Theriogenology* 38: 979-988
- MUTIGA, E. R. & BAKER, A. A. (1982).Superovulatory response in merino ewes to three PMSG dose levels.*Theriogenology*.17: 100 (Abstract).
- NAITANA, S., DATTENA, M., GALLUS, M., LOI, P., BRANCA, A., LEDDA, S. & CAPPAL, P. (1995). Recipient synchronization affects viability of vitrified ovine blastocysts. *Theriogenology*. 43 (8): 1371-1378.
- NOEL, B., MANDIKI, S.M.N., PERRAD, B., BISTER, J.L., PAQUAY, R. (1999). Terminal follicular growth, ovulation rate and hormonal secretion after melatonin pretreatment prior to FGA-PMSG synchronisation in Suffolk ewes at the onset of the breeding season. *Small Ruminant Research*, 32: 269-277.

- NOWERS C.B.; COETZER W.A.; MORGENTHAL J.C. (1994). Effect of melatonin implants, flushing and teasing on the reproductive performance of spring-mated Dohne Merino ewes. *S. Afr. Tydskrif. eek.* 1, 9942, 4(1)
- O'CALLAGHAN, D., KARSCH, F.J., BOLAND, M.P., ROCHE, J.F. (1991). Role of short days in timing the onset and duration of reproductive activity in ewes under artificial photoperiods. *Biology of Reproduction*, 44: 23-28.
- OKADA, A., KAMADA, S., JEON, C.-W., MIYAMOTO, A. & FUKUI, Y. (2000). Incidence of Abnormal Corpus Luteum in Superovulated Ewes. *J. Reprod. Dev.* 46: 397-402.
- OKATANI HK, WATANABE K, MORIOKA N, SAGARA Y (1998): Estrogen modulates the nocturnal synthesis of melatonin in peripubertal female rats. *Journal of Pineal Research* 24:224-229
- ORTAVANT, R., P. MAULEON AND C. THIBAUT. (1964). Photoperiodic control of gonadal and hypophyseal activity in domestic mammals. *Ann. New York Acad. Sci.* 117:157.
- ORTAVANT, R., BOCQUIER, F., PELLETIER, J., RAVAUT, J.P., THIMONIER, J VOLLANDNAIL, P. (1988). Seasonality of reproduction in sheep and its control by photoperiod. *Australian Journal of Biological Sciences*, 41: 69-85.
- PALACIN, I., ABECIA, J.A., FORCADA, F., CASAO, A., CEBRIAN, J.A., MUINO, T., PALACIOS, C. & PONTES, J.M. (2008). Effects of exogenous melatonin treatment on out-of-season ram fertility. *Italian Journal of Animal Science*, Vol.7, No.2, pp. 199-206, 1594-4077
- PALACÍN I., FORCADA F AND ABECIA J.A. (2011) Meta-analysis of the efficacy of melatonin implants for improving reproductive performance in sheep Spanish *Journal of Agricultural Research*. 9(3), 730-743.
- PANG, S.F., LEE, P.P.N., CHAN, Y.S., AYRE, E.A. (1993). Melatonin secretion and its rhythms in biological fluids.. En: "Melatonin: Biosynthesis, Physiological effects and Clinical Applications". Eds. Yu, H.S., Reiter, R.J., CRC, Press. : 129-153
- PELLETIER, J., ALMEIDA, G. (1987). Short light cycles induce persistent reproductive activity in Île-de-France rams. *Journal of Reproduction and Fertility*, Suppl. 34: 215-226.
- PEREIRA RJ, TULI RK, WALLENHORST S, HOLTZ W. (2000) The effect of heparin, caffeine and calcium ionophore A23187 on in vitro induction of the acrosome reaction in frozen-thawed bovine and caprine spermatozoa *Theriogenology*. 2000; 54(2): 185-92.

- PORRAS, A.A.I. (1999). Efectos del fotoperiodo artificial sobre la actividad reproductiva de la oveja Pelibuey. Tesis de Doctorado en Ciencias Veterinarias. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- POULTON, A.L. AND T.J. ROBINSON. (1987). The response of rams and ewes of three breeds to artificial photoperiod. *J. Reprod. Fertil.* 79: 609-626.
- RASO, M., BURATOVICH, O. & VILLA, M. (2004). Comparación de 4 tratamientos de sincronización de celos en ovinos. *Carpeta Técnica, Ganadería* N° 9, Abril 2004. EEA INTA Esquel.
- RIESENBERG, S., MEINECKE-TILLMANN, S. & MEINECKE, B. (2001). Ultrasonic study of follicular dynamics following superovulation in German Merino ewes. *Theriogenology*. 55 (4): 847-865.
- ROBINSON, J.E., WAYNE, N.L., KARSCH, F.J. (1985). Refractoriness to inhibitory day lengths initiates the breeding-season of the Suffolk ewe. *Biology of Reproduction*, 32: 1024-1030.
- ROBINSON JJ, WIGZELL S, AITKEN RP, WALLACE JM, IRELAND S, ROBERTSON IS. (1991). The modifying effects of melatonin, ram exposure and plane of nutrition on the onset of ovarian activity, ovulation rate and the endocrine status of ewes. *Anim Reprod Sci*; 26:73-91.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. (1998)- Optimization of sperm quality in AI bulls. *Reprod Dom Anim* 33: 233-237.
- ROLLAG, M.D., NISWENDER, G.D. (1976). Radioimmunoassay of serum concentrations of melatonin in sheep exposed to different lighting regimens. *Endocrinology*, 98: 482- 489.
- ROLLINSON, D. H. L. (1955). Hereditary factors affecting reproductive efficiency in cattle. *Anim. Breed. Abstr.* 23 :215.
- RONDÓN Z; , ZARAZAGA L FERNANDO. FORCADA ; ABECIA A; MOZOTA J; LOZANO J.M . (1994) Estudio de la actividad sexual, tasa de ovulación y niveles plasmáticos de melatonina en ovejas de raza aragonesa con dos niveles de condición corporal constantes e implantadas o reimplantadas con melatonina exógena . XIX Jornadas SEOC.
- ROSA, H.J.D., JUNIPER, D.T., BRYANT, M.J. (2000). Effects of recent sexual experience and melatonin treatment of rams on plasma testosterone concentration, sexual behaviour and ability to induce ovulation in seasonally anestrous ewes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 120: 169-176.

- RUBIANES, E., UNGERFELD, R., VIÑALES, C., RIVERO, A. & ADAMS, G. P. (1997). Ovarian response to gonadotropin treatment initiated relative to wave emergence in ultrasonographically monitored ewes. *Theriogenology*.47 (8): 1479-1488
- RUWANPURA S, MCLACHLAN R, MEACHEM S (2010) Hormonal regulation of germ cell development. *J Endocrinol* 205: 117-131
- RYAN, J. P., HUNTON, J. R. & MAXWELL, W. M. C. (1991). Increased production of sheep embryos following superovulation of Merino ewes with a combination of pregnant mare serum gonadotrophin and follicle stimulating hormone. *Reprod. Fertil. Dev.* 3: 551-60.
- SCHIEWE, M. C., FITZ, T. A., BROWN, J. L., STUART, L. D. & WILDT, D. E. (1991). Relationship of estrus synchronization method, circulating hormones, luteinizing-hormone and prostaglandin F2 alpha receptors and luteal progesterone concentration to premature luteal regression in superovulated sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*. 93 (1): 19-30
- SAMARTZI F, BOSCO C, VAINAS E, TSAKALOF P. (1995). Superovulatory response of Chios sheep to PMSG during spring and autumn. *Anim Reprod Sci* 39:215-222.
- SANTIAGO-MORENO, J., GOMEZ-BRUNET, A., GONZALEZ-BULNES, A., TOLEDANO-DIAZ, A., MALPAUX, B., LOPEZ-SEBASTIAN, A. (2005). Differences in reproductive pattern between wild and domestic rams are not associated with inter-specific annual variations in plasma prolactin and melatonin concentrations. *Domestic animal endocrinology*, 28: 416-429.
- SCARAMUZZI, R.J., ADAMS, N.R., BAIRD, D.T., CAMPBELL, B.K., DOWNING, J.A., FINDLAY, J.K. (1993). A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reproduction, Fertility and Development*.5(5):459-478.
- SCHANBACHER BB, LUNSTRA DD, (1976). Seasonal changes in sexual activity and serum levels of LH and testosterone in Finnish Landrace and Suffolk rams. *J AnimSci* 43: 644-650.
- SETCHELL, B.P.,(1992). Domestication and reproduction. *Anim. Reprod. Sci.*28,195-202.
- SHEIKHELDIN, M. A., HOWLAND, B. E., AND PALMER, W. A. (1992). Seasonal profiles of melatonin in adult rams. *J. Pineal Res.* 12, 58–63.
- SMITH, J.F.; MURRAY, G.R. (1997) - Evaluation of different staining techniques for determination of membrane status in spermatozoa. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* 57: 246-250.

- SILVA P.F.N, GADELLA B.M, (2006).Detection of damage in mammalian sperm cells
Theriogenology. 65:958–978.
- SIMONETTI, L. (2008). Simplificación de los métodos de superovulación en ovejas de la raza Corriedale. Tesis de doctorado. Universidad Politécnica de Valencia
- SMITH, C. L. (1984). Dose effect of Follicle Stimulating Hormone for superovulation of crossbred Targheeewes : C.L. Smith, Department of Large Animal Clinical Sciences, Michigan State University, East Lansing, Michigan 48824. *Theriogenology*.21 (1): 262-262.
- SUGDEN D. (1989)Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland.*Experientia*,45:922-932.
- TEKPETEY, F. R., AND AMANN, R.P., (1988), Regional and seaseonal differences in concentratios of androgen and estrogen receptors in ram epididymal tissue. *Biol. Reprod*. 38; 1061-1060
- THIMONIER, J. (1989). Contrôlephotopériodique de l’activitéovulatoriechez la brevis. Existence de rythmesendogènes. ThèseUniversité François Rabelais, Tours.: 112.
- THOMPSON, J. G. E., SIMPSON, A. C., JAMES, R. W. & TERVIT, H. R. (1990). The application of progesterone-containing CIRD(TM) devices to superovulated ewes. *Theriogenology*.33 (6): 1297-1304.
- TORRÈS, S., COGNIÉ, Y. & COLAS, G. (1987). Transfer of superovulated sheep embryos obtained with different FSH-P. *Theriogenology*.27 (2): 407-419.
- TULI, R.K.; SCHMIDT-BAULAIN, R.; HOLTZ, W. (1992) - Computer assisted motility assessment of spermatozoa from fresh and frozen-thawed semen of bull, boar and goat. *Therio* 38: 487-490.
- UNGERFELD, R. & RUBIANES, E. (1999). Effectiveness of short-term progestogen priming for the induction of fertile oestrus with eCG in ewes during late seasonal anoestrus. *Anim. Sci*. 68: 349-353.
- VALENCIA, J., PORRAS, A., MEJÍA, O., BERRUECOS, J.M., TRUJILLO, J., ZARCO, L. (2006). Actividad reproductiva de la oveja Pelibuey durante la época del anestro: influencia de la presencia del macho. *Revista Científica, FCV-LUZ*. 16: 136-141
- VALENTI S, GIUSTI M.(2002) Melatonin participates in the control of testosterone secretion from rat testis: an overview of our experience. *Ann NYAcad Sci* : 966: 284-9.
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. (2002) - Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Therio* 57: 149-179.

- VIGUIÉ A, CARATY A, LOCATELLI A, MALPAUX B. (1995). Regulation of LHRH secretion by melatonin in the ewe. I. Simultaneous delayed increase in LHRH and LH pulsatile secretion. *Biol Reprod* ;52:1114–20.
- VIGUIÉ C, THIBAUT J, THIÉRY JC, TILLET Y, MALPAUX B (1997) Characterization of the short day-induced decrease in median eminence tyrosine hydroxylase activity in the ewe: temporal relationship to the changes in luteinizing hormone and prolactin secretion and short day-like effect of melatonin. *Endocrinology* 138: 499-506.
- VIÑALES, C., MEIKLE, A., FORSBERG, M. & RUBIANES, E. (1999). The effect of subluteal levels of exogenous progesterone on follicular dynamics and endocrine patterns during the early luteal phase of the ewe. *Theriogenology*.51: 1351-1361.
- VIÑALES, C., FORSBERG, M., BANCHERO, G. & RUBIANES, E. (2001). Effect of long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. *Theriogenology*.55: 993-1004.
- WATSON, P.F. (1975) - Use of Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. *Vet Rec* 97: 12-15.
- WATSON, P.F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev*. 7:871-891.
- WALES, R.G.; WHITE, I.G. Viability of diluted dog spermatozoa in vitro. *J. Reprod. Fertil.*, v.5, p.67-76, 1963
- WALLACE, J.M., ROBINSON, J.J., WIGZELL, S., AITKEN, R.P. (1988). Effect of melatonin on the peripheral concentrations of LH and progesterone after estrus, and on conception rate in ewes. *Journal of Endocrinology*, 119: 523-530.
- WAY, A.L.; HENAULT, M.A.; KILLIAN, G.J. (1995) - Comparison of four staining methods for evaluating acrosome status and viability of ejaculated and cauda epididymal bull spermatozoa. *Theriogenology* 43: 1301-1316.
- WEBSTER, G.M., HARESIGN, W. (1983). Seasonal-changes in LH and prolactin concentrations in ewes of 2 breeds. *Journal of Reproduction and Fertility*, 67: 465-471.
- WEBSTER, J.R., SUTTIE, J.M., VEENVLIET, B.A., MANLEY, T.R., LITTLEJOHN, R.P. (1991). Effect of melatonin implants on secretion of luteinizing-hormone in intact and castrated rams. *Journal of Reproduction and Fertility*, 92: 21-31.
- WEBB RW, BAXTER G, MCBRIDE D, RITCHIE M, SPRINGBETT AJ.(1992) Mechanism controlling ovulation rate in ewes in relation to seasonal anoestrus. *J Reprod Fertil* 992; 94:143-151.

- WILDEUS, S. (2000). Current concepts in synchronization of estrus: Sheep and goats. *J. Anim Sci.* 77 (E-Suppl): 1-14.
- WILLIAMS L.M., HELLIWELL R.J.A. (1993). Melatonin and seasonality in the sheep, *Animal Reproduction Science*, Pages 159-182.
- YALOW, R.S.; BERSON, S.A.(1959) Assay of Plasma Insulin in Human Subjects by Immunological Methods. *Nature* , 184, 1648-1649 .
- ZARAZAGA, L.A., FORCADA, F., ABECIA, J.A., LOZANO, J.M. (1996). Date of reinitiation of the breeding season could be related with relative changes in melatonin amplitude in ewes. En: *Pineal update: From molecular mechanisms to clinical implications*. 295-300. Eds.S.M.webb, M. Puig-Domingo, M. Moller, P.Pevet, PJD Publications. New York (USA)
- ZARAZAGA, L.A., MALPAUX, B., BODIN, L., CHEMINEAU, P. (1998).The large variability in melatonin blood levels in ewes is under strong genetic influence. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 37: 607-610.
- ZHAO, H., POON, A.M., PANG, S.F. (2000). Pharmacological characterization, molecular subtyping, and autoradiographic localization of putative melatonin receptors in uterine endometrium of estrous rats. *Life Sciences* 66, 1581-1591.
- ZUÑIGA, O., FORCADA, F., ABECIA, J.A. (2002). The effect of melatonin implants on the response to the male effect and on the subsequent cyclicity of Rasa Aragonesa ewes implanted in April. *Animal Reproduction Science*, 72: 165-174.