



*Trabajo de Fin de Master*

*Master en Iniciación a la Investigación en Ciencias Veterinarias*

# **USO DE LA COMBINACIÓN DE MELATONINA Y PROSTAGLANDINAS PARA LA SINCRONIZACIÓN DEL ESTRO EN OVEJAS DE RAZA RASA ARAGONESA**

**Manuel Agustín Silva**



**Departamento de  
Producción Animal  
y Ciencia de los Alimentos  
Universidad Zaragoza**

*Director: José Alfonso Abecia Martínez*

**2012**

## Índice de Contenidos

Agradecimientos.....	5
1. Resumen .....	7
1. Summary .....	8
2. Introducción.....	9
2.1. Actividad Reproductiva en la Oveja .....	11
2.2 Control del ciclo estral.....	15
2.2.1 Métodos no farmacológicos de control sexual .....	15
2.2.1.1.1. Aislamiento entre sexos.....	16
2.2.1.1.2. Las hembras deben encontrarse en el período de anoestro.....	17
2.2.1.1.3. Los machos .....	17
2.2.1.1.4. Las hembras .....	19
2.2.1.1.5. Respuesta endocrina a la introducción de machos.....	19
2.2.1.1.6. Tipos de Respuesta .....	20
2.2.1.1.7. Combinación con otros tratamientos.....	22
2.2.1.2.1. Protocolo de uso .....	23
2.2.2. Métodos Farmacológicos .....	24
2.2.2.1.1. Química, secreción y metabolismo .....	25
2.2.2.1.2. Mecanismo de acción y efectos fisiológicos .....	27
2.2.2.1.3. Protocolo de uso .....	29
2.2.2.2.1. Química, secreción y metabolismo. ....	31
2.2.2.2.2. Funciones .....	33
2.2.2.2.3. Protocolo de uso .....	34
2.2.2.3.1. Química, secreción y metabolismo .....	37
2.2.2.3.2. Funciones .....	38
2.2.2.3.3. Protocolo de uso .....	41
2.2.2.4.1. Protocolo de uso .....	43
3. Objetivos .....	44
4. Hipótesis.....	44
5. Material y Métodos .....	45
5.1. Instalaciones.....	45
5.2. Inducción de celo.....	45

5.2.1. Animales .....	45
5.2.2. Grupos experimentales .....	45
5.3. Control de estros .....	46
5.4. Diagnóstico de Gestación .....	46
5.5. Monitoreo hormonal de hembras .....	46
5.6. Análisis de progesterona .....	46
5.7. Análisis estadístico .....	47
6. Resultados .....	49
6.1. Porcentajes de ciclicidad .....	49
6.2. Inducción de celo .....	49
6.2.1. Celos de retorno (Ovejas Repetidoras) .....	49
6.3. Diagnóstico de Gestación .....	51
7. Discusión .....	52
8. Conclusión .....	55
9. Bibliografía: .....	56

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> <i>Épocas de reproducción y de partos en diferentes especies domésticas y en sus antecesores salvajes.....</i>	12
<b>Figura 2.</b> <i>Influencia del fotoperiodo y eventos hormonales del ciclo estral en la oveja.....</i>	13
<b>Figura 3.</b> <i>Dinámica folicular durante el ciclo estral en la oveja .....</i>	14
<b>Figura 4.</b> <i>Respuesta de ovejas a la introducción de machos desencadenando un ciclo estral normal.....</i>	21
<b>Figura 5.</b> <i>Respuesta de ovejas a la introducción de machos desencadenando un ciclo estral corto.....</i>	22
<b>Figura 6.</b> <i>Síntesis de melatonina en la glándula Pineal a partir del estímulo luminoso .....</i>	26
<b>Figura 7.</b> <i>Síntesis de los Eicosanoides.....</i>	33
<b>Figura 8.</b> <i>Mecanismo de la luteolisis.....</i>	34
<b>Figura 9.</b> <i>Biosíntesis de hormonas esteroideas en el ovario .....</i>	38
<b>Figura 10.</b> <i>Retención del cuerpo lúteo y establecimiento de la gestación .....</i>	40
<b>Figura 11.</b> <i>Cronograma del experimento llevado a cabo en el Grupo Melatonina (M).....</i>	47
<b>Figura 12.</b> <i>Cronograma del experimento llevado a cabo en el Grupo Melatonina-prostaglandinas (MP).....</i>	47
<b>Figura 13.</b> <i>Cronograma del experimento llevado a cabo en el Grupo Control (C). .....</i>	48

## Índice de Gráficos

<b>Gráfico 1.</b> <i>Porcentaje relativo de celos en los tres grupos.. .....</i>	50
<b>Gráfico 2.</b> <i>Porcentaje acumulado de celos en los tres grupos.....</i>	50
<b>Gráfico 3.</b> <i>Porcentaje de celos de retorno en los tres grupos.....</i>	51
<b>Gráfico 4.</b> <i>Tasa de Gestación por grupo.....</i>	51

## Agradecimientos

*Este trabajo no hubiese podido llevarse a cabo sin la ayuda, apoyo y colaboración de mucha gente que formaron y forman parte de mi vida.*

*A Alfonso, Gustavo, Genaro y todos los integrantes y colaboradores del Departamento de Producción Animal con quien compartí estos meses de trabajo como así también al plantel del Servicio de Apoyo a la Investigación Animal de la Facultad de Zaragoza por la colaboración brindada en el manejo de los animales..*

*A mi familia y amigos que con su afecto imprescindible e incondicional acortan distancias gigantes y me ayudan a seguir mi camino en la distancia.*

*A los amigos que coseché aquí en España completos responsable de mi amena estadía y que siempre llevaré en el corazón.*

*A todas las personas que conocí aquí, allá y donde quiera que voy.*

*Ustedes...también son totales partícipes de este trabajo...*

*“Por que solos no somos nada...solo somos la nada misma...”*

*Manuel Agustín Silva  
Julio de 2012, Zaragoza, España*

*La curiosidad es la base del conocimiento*

Aristóteles (384 A.C. - 322 A.C.)

## 1. Resumen

El objetivo del presente trabajo ha sido utilizar la melatonina exógena en combinación con prostaglandinas F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ) en primavera para estudiar la eficacia de dicha combinación en la sincronización de celos en ovejas. Se trabajó con 51 hembras y 4 machos de la raza Rasa Aragonesa. Las ovejas se dividieron en tres grupos experimentales (n=17/grupo) en base a los tratamientos recibidos, en un grupo se trató con melatonina (grupo M), en otro se combinó melatonina con una única inyección de PGF2 $\alpha$  (grupo MP) y el restante se dejó como control (grupo C). Machos y hembras se mantuvieron separados hasta el término de dichos tratamientos y luego se juntaron para las cubriciones. Se tomaron muestras sanguíneas de las hembras que fueron procesadas para determinar las concentraciones de progesterona con el fin de monitorear su estado reproductivo, dichas muestras se tomaron siete días antes de la introducción de machos, el día de la introducción y a los siete días posteriores. Las concentraciones de progesterona evidenciaron que el 100% de las ovejas presentaban actividad cíclica previa a la introducción de machos. Las hembras salieron en celo a partir del día de introducción de los machos (día 0) en el corral, mostrando el grupo MP una sincronía de sus celos los primeros días del período de cubrición, mostrando el día 2 un 41% de los individuos en celo y el día 3 un 65%. Los otros dos grupos mostraron actividad sexual creciente en el tiempo, cubriéndose en un lapso de 18 días, hecho que se puede adjudicar a que las hembras ya se encontraban cíclicas y a un posible efecto de “simpatía”. En cuanto a la tasa de preñez, diagnosticada por ecografía, cabe destacar que fue baja (55%) y sin diferencias significativas entre los grupos (MP: 59%, M: 53%, C: 53%), posiblemente por el alto número de ovejas en celo en un corto período de tiempo que imposibilitó a los machos cubrir a todas y por otro lado a un efecto del stress al que se sometieron los animales durante la experiencia.

En conclusión, la combinación de implantes de melatonina y una única inyección de PGF2 $\alpha$  en primavera demostró una capacidad de sincronizar los celos del grupo tratado, aunque sin alcanzar los valores habituales del clásico tratamiento de PGF2 $\alpha$  con doble inyección en 7-10 días.

## **1. Summary**

The goal of this work was to use exogenous melatonin in combination with PGF2 $\alpha$  on spring, to study its efficacy in the oestrus synchronization in sheep. Fifty-one female and 4 male Rasa Aragonesa sheep were included in the study. Ewes were divided in three experimental groups based on the treatment received. One group was treated with melatonin, another was treated with melatonin along with a single shot of PGF2 $\alpha$  and the last one was the control group. Rams and ewes were kept apart until the end of their treatment and were put together for the breeding. Blood samples from the female were taken and processed to establish the concentration of progesterone, in order to know their reproductive status; these samples were collected seven days prior to the introduction of males, the day of the introduction and seven days after the introduction. Progesterone concentrations showed that 100% of the female sheep had a cyclical activity before the introduction of the male sheep. Ewes were in oestrus from the day of introduction of the male into the pen, and the group treated with PGF2 $\alpha$  showed oestrous synchronization the first days of breeding. On day 2, 41% of the individuals were in heat. The other two groups, the one treated with melatonin and the control group, showed a fast and growing sexual activity, which can be attributed to the fact that the female were already in cyclic stage and to a likely effect of "sympathy". Regarding the pregnancy rate, it is worth noting that it was low (55%) and with no significant differences among the groups (59% for the group treated with prostaglandine and 53% in the other two). This was possibly due to the high number of sheep in heat in a short period of time which prevented the male sheep to mate all of them and the stress the animals were subjected throughout the whole experience.

In conclusion, the combination of melatonin implants and a single shot of PGF2 $\alpha$  in spring showed the capability of synchronizing the oestrus in the group treated, although without reaching the usual figures of the traditional treated with PGF2 $\alpha$  and double shots within 7-10 days.



## 2. Introducción

Desde tiempos remotos el hombre ha hecho uso de los animales por diferentes motivos y propósitos, desde transporte, alimentación, vestimenta, compañía, etc. En el caso de la oveja (*Ovis aries*), el origen de su domesticación se encuentra en Oriente próximo, en el denominado creciente fértil, una región histórica que se correspondía con parte de los territorios del Antiguo Egipto, el Levante mediterráneo, Mesopotamia y Persia, áreas que actualmente pertenecen a territorios de Egipto, Israel, Cisjordania, la Franja de Gaza, y Líbano; amén de partes del río Jordán, Siria, Irak, el sudeste de Turquía y el sudoeste de Irán.

Las pruebas señalan que la domesticación tuvo lugar en torno al VII milenio a. C. (Zohary et al., 1998). La mayoría de los estudios atribuyen el origen silvestre de la especie al muflón asiático (*Ovis orientalis orientalis*), descartando así otros congéneres como el argali (*Ovis ammon*) o el urial (*Ovis orientalis vignei*) que se barajaban como posibles ancestros (Hiendleder et al., 2002).

Con el correr del tiempo el ser humano conoció y aprendió múltiples aspectos en los que respecta a domesticación, manejo y entendimiento de los animales, y la especie ovina fue de las más estudiadas y utilizadas.

Por ejemplo, como en muchas otras ciencias, Aristóteles dedicó importantes investigaciones a la biología, y sobre todo a la clasificación y la reproducción animal, siendo el primero en describir el cuádruple estómago de los rumiantes en el siglo IV AC. Según la antigua opinión, probablemente de origen oriental, al padre correspondía el papel principal en la procreación, la participación de la madre consistía en asegurar albergue y nutrición al embrión, y fue Aristóteles quién refutó el milenario error, y admitió la cooperación más o menos igual de los padres en la procreación, y proclamó que el semen no hace más que impulsar al óvulo femenino a desarrollarse en el útero. Su doctrina preparó así la tesis del origen bigerminal de los animales superiores (Aristóteles, 1994).

Este gran filósofo y científico griego ya era consciente de la estacionalidad reproductiva de algunas especies, como la oveja y la yegua, y se había

percatado de que los partos naturalmente se daban en primavera y que para que ello tuviera lugar tales animales se emparejaban en una determinada época del año de acuerdo a la duración de la gestación.

Con el pasar del tiempo y gracias a numerosos investigadores se concluyó que la oveja es una hembra con estacionalidad reproductiva, mostrando dicha actividad durante los días cortos del año, es decir en otoño-invierno. Esto es así, por el motivo que ya había predicho Aristóteles, que los partos se concentren en primavera, momento en el cual la oferta de alimentos y las condiciones ambientales son óptimas para la supervivencia de las crías. Esta distribución de la actividad durante el año está influida también por la edad y la raza, y además, de mucha importancia, por la ubicación geográfica de los animales.

Dicho patrón estacional reproductivo lleva a marcados períodos de alumbramiento, y si los animales son lecheros, a un patrón estacional de producción de leche.

Siguiendo la ley de oferta y demanda, tal situación causa una distribución estacional de los precios de carne y leche ovina, más bajos cuando la oferta de dichos productos es la más alta, es decir durante finales de primavera y comienzos de otoño, y viceversa, siendo altos en invierno y comienzos de primavera.

La inducción de ciclos estrales fuera de la temporada reproductiva permite salir de este patrón, logrando la reproducción durante la primavera y partos en el otoño, que resulta en la producción de corderos y leche durante el invierno, momento en el cual los precios están en alza y las condiciones y oportunidades de mercado favorecen la comercialización, como en Navidad.

Con tales objetivos desde hace ya décadas se utilizan varios métodos de control para la reproducción. Entre estos hayamos la utilización de melatonina, hormona secretada por la glándula pineal involucrada en la variación estacionaria de la actividad reproductiva, siendo secretada durante la noche determinando una mayor actividad sexual en otoño-invierno, cuando las noches son largas. Desde hace tiempo se emplean implantes subcutáneos liberadores

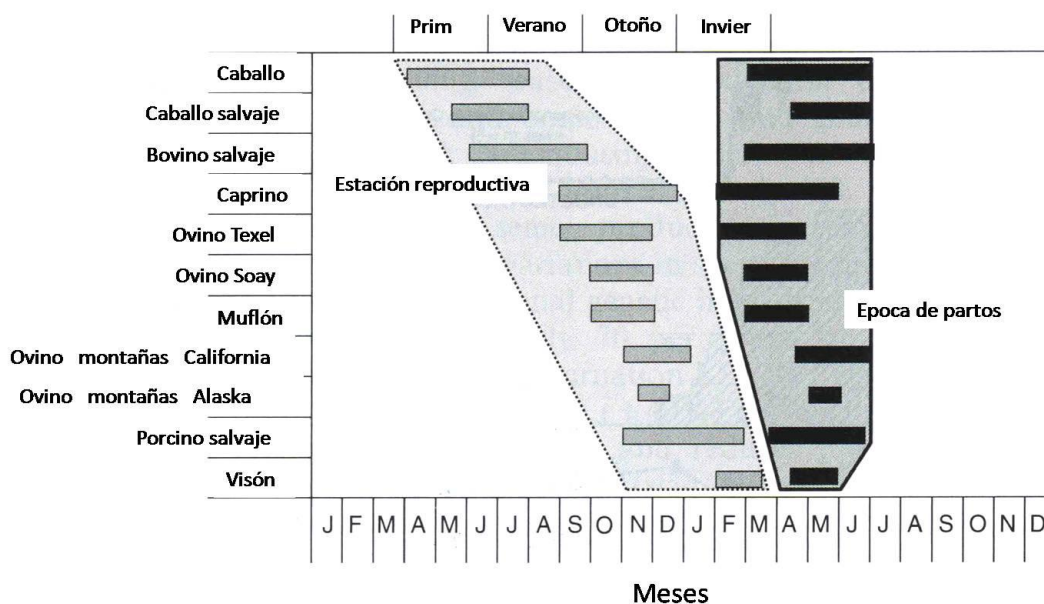
de melatonina que simulan noches largas en los animales, induciendo actividad sexual en momentos del año que normalmente no ocurriría.

## **2.1. Actividad Reproductiva en la Oveja**

La especie ovina presenta una actividad reproductiva determinada por el fotoperiodo, es decir, por la duración del día y de la noche y sus variaciones durante el año, siendo influida por lo tanto, por la latitud donde se encuentran los animales y la época del año, como así también por la raza y la edad (Ortavant et al., 1988; Arroyo et al., 2007) Las ovejas de razas europeas y mantenidas en latitudes alejadas de la línea del Ecuador, presentan una mayor actividad durante la época del año en que el número de horas de luz es menor, por eso se dice que es una especie de “días cortos”.

Así, la temporada reproductiva se trata de una sucesión de ciclos estrales, que generalmente, y con variaciones debidas a la latitud, comienzan a finales de verano o principios de otoño, en respuesta a la reducción de la duración del día, finalizando a finales del invierno o principios de primavera. Por su parte, el período de anoestro se extiende desde finales de invierno o principios de primavera hasta principios o mediados de verano, existiendo un período de transición entre la época reproductiva y el anoestro.

El propósito natural de este fenómeno es que los corderos nazcan en el momento más propicio para su supervivencia, es decir durante la primavera, período del año en el que la oferta forrajera y las buenas condiciones climáticas lo hacen posible (Figura 1).



**Figura 1.** Épocas de reproducción y de partos en diferentes especies domésticas y en sus antecesores salvajes (Ortavant et al., 1985). Adaptado en Abecia y Forcada, 2010

Cuanto más nos acercamos a la línea ecuatorial, el efecto de la estacionalidad se ve reducido, ya que la duración de las horas de luz y oscuridad llegan a igualarse (Carles y Kipngeno, 1986; Eloy et al., 1990).

El fotoperíodo tiene un efecto fisiológico a nivel del eje hipófisis-hipotálamo-gonadal, a través de una hormona llamada melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina), que es secretada por la glándula pineal localizada en el diencéfalo. La melatonina es secretada durante los momentos de ausencia de luz y uno de sus efectos es regir la secreción de GnRH (Hormona Liberadora de Gonadotrofinas) desde el hipotálamo, que en el caso de la oveja al tratarse de una especie de “días cortos”, potencia la misma (Figura 2).

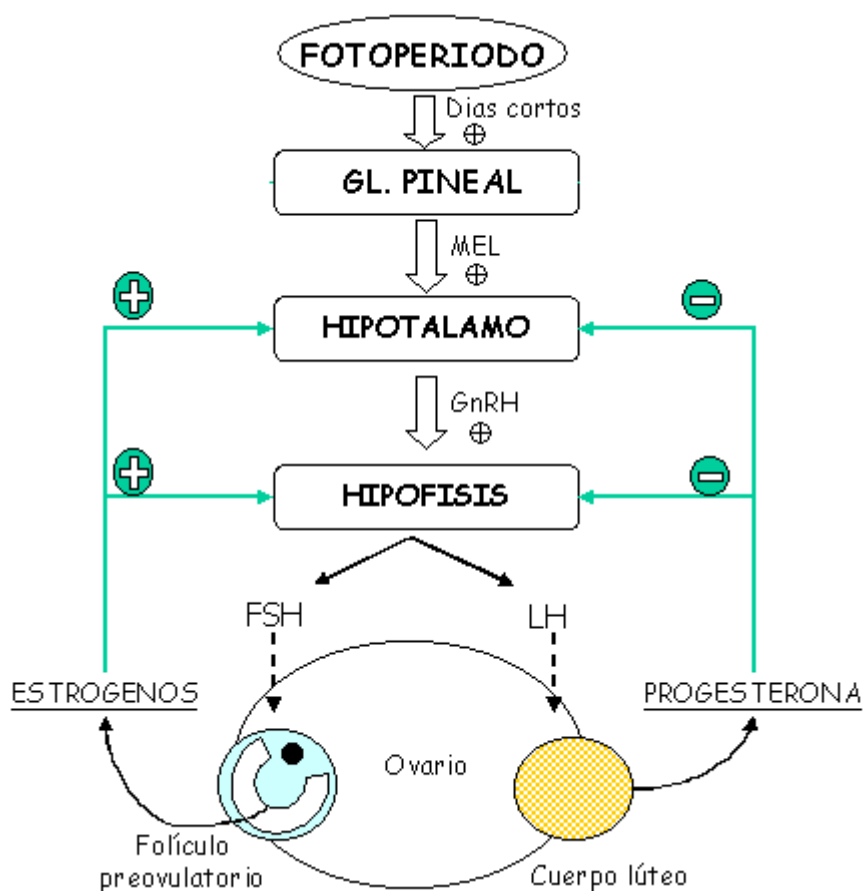
La GnRH estimula la liberación de las hormonas gonadotrópicas desde la adenohipófisis (Goodman et al., 2002), involucradas en el control del ciclo estral, que en las ovejas tiene una duración de 16-18 días (promedio: 17) (Marshall, 1904), y consta de una fase folicular o estrogénica y una luteal o pregestacional.

La fase luteal tiene una duración aproximada de 14 días (Goodman y Inskeep, 2006) y se caracteriza por la presencia de uno o más cuerpos lúteos en crecimiento o regresión que secretan progesterona, encargada del

mantenimiento de la gestación en caso de quedar la hembra preñada (Hansel y Convey, 1983). En el caso de no efectuarse la fecundación este/os cuerpo/s lúteo/s sufren una lisis mediada por una prostaglandina secretada por el útero, llamada PGF2 $\alpha$  (Bartlewsky et al., 1999).

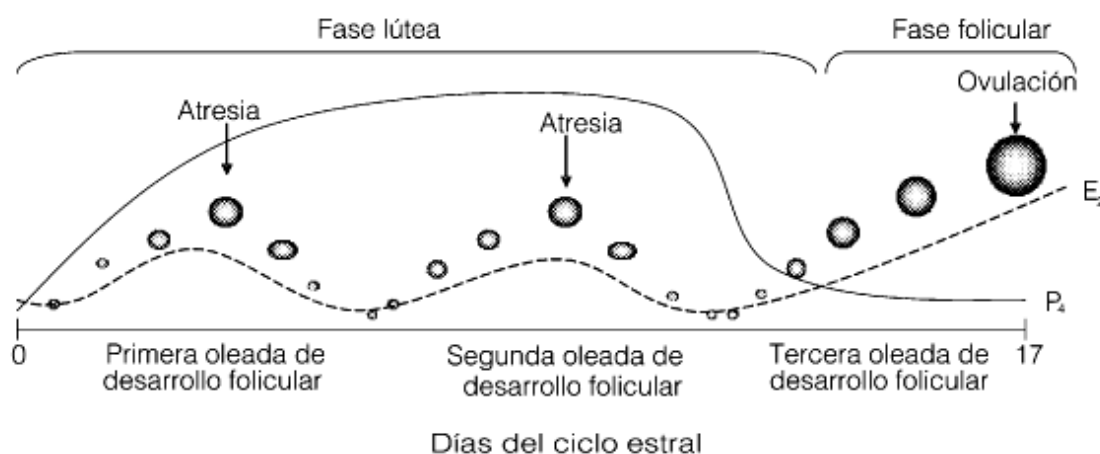
La fase folicular se caracteriza por la presencia de uno o más folículos en crecimiento continuo, los cuales secretan altos niveles de estradiol-17 $\beta$  (E2-17 $\beta$ ) e inhibina, los elevados niveles de los primeros son los responsables de la conducta de receptividad sexual (Gore-Langton y Armstrong, 1994), y el celo, que tiene una duración de entre 10 a 53 horas (Navarro y Torres, 1985).

Los estrógenos y la progesterona regulan la secreción de GnRH y de las gonadotropinas. Asimismo existen otras hormonas y factores de crecimiento, tales como foliculostatina, activina, inhibina y factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) implicados tanto en el control de la liberación de las gonadotropinas y del crecimiento y desarrollo folicular y la ovulación.



**Figura 2.** Influencia del fotoperiodo y eventos hormonales del ciclo estral en la oveja.

El crecimiento y desarrollo folicular se produce en oleadas u ondas, que varían de 2 a 4 en cada ciclo (Ginther et al., 1995; Leyva et al., 1998) y que, están compuestas por 3 etapas: *reclutamiento*, *selección* y *dominancia* (Goodman y Hodgen, 1983). El reclutamiento corresponde a la respuesta de un grupo de folículos a las gonadotropinas para iniciar su desarrollo; la selección, como su nombre indica, pretende seleccionar algunos de estos folículos reclutados para continuar su crecimiento hasta estadios preovulatorios, y la dominancia es la etapa en la cual un folículo, llamado folículo dominante, adquiere características morfológicas y funcionales que le permiten incrementar su propio crecimiento e inhibir el de los demás que terminarán en atresia, siendo él el destinado a ovular y posteriormente a transformarse en el cuerpo lúteo. Estos fenómenos de crecimiento y desarrollo folicular se conocen como *Dinámica Folicular*, y están determinados por la acción de las gonadotropinas (Figura 3).



**Figura 3.** Dinámica folicular durante el ciclo estral en la oveja. En la fase luteal existen folículos en desarrollo, los cuales sufren atresia. Los folículos en desarrollo durante esta etapa secretan estradiol, sin embargo la P<sub>4</sub> inhibe la secreción pulsátil de LH e impide la maduración de dichos folículos y la ovulación. En la fase folicular, cuando la concentración de P<sub>4</sub> disminuye, el estradiol estimula la secreción pulsátil de LH y se ejerce un feed-back positivo, que favorece la maduración folicular y la ovulación.

## **2.2 Control del ciclo estral**

Para controlar el ciclo estral ovino, el ser humano se vale tanto de métodos farmacológicos como no farmacológicos, que se basan en el uso o no de hormonas para modificar la actividad sexual de las hembras.

### **2.2.1 Métodos no farmacológicos de control sexual**

Estos métodos que no contemplan el uso de hormonas, se basan en modificaciones fisiológicas mediante la manipulación del ambiente y el entorno social de los animales.

#### **2.2.1.1 “Efecto Macho”**

Esta técnica consiste en la inducción de la ovulación en ovejas que se encuentran en anoestro mediante contacto con un macho activo sexualmente.

Alrededor de 60 años atrás se reportó por primera vez la capacidad de los machos para adelantar la ovulación en ovejas en anoestro que hayan estado aisladas de los moruecos (Shelton, 1960), pero en realidad ya en el siglo 19 se conocía tal efecto (Girard, 1813).

El hecho de ser barato, de fácil aplicación y de no tener los problemas de los métodos hormonales en lo que concierne a residuos en el organismo, lo hace ventajoso sobre éstos.

El efecto macho se fundamenta en la interacción social entre machos y hembras. Si bien se sabe que las interacciones entre machos y entre hembras también tienen efectos reproductivos, como ser el “efecto hembra” que logra los celos por simpatía (Hutlet et al., 1964; Price et al., 1988; Muir et al., 1989; Zarco et al., 1995; Sanford et al., 1974), el “efecto macho” es el más estudiado debido a sus mayores beneficios reproductivos y económicos. La exposición de hembras a machos puede inducir un efecto crónico o agudo en la fisiología reproductiva de las mismas (Rosa and Bryant, 2002). En el primer caso, la presencia continua de un macho puede cambiar el momento del inicio y el final de la temporada reproductiva y la duración del estro en hembras adultas, como así también adelantar la pubertad en las corderas. Se vio que la presencia de machos vasectomizados durante la temporada reproductiva, logró retrasar

alrededor de 3 semanas el final de la misma y adelantar el inicio de la siguiente, acortando el período de anoestro alrededor de dos meses (Donovan et al. 1991). Sunderland (1990) estudió el efecto de la presencia de machos durante todo el año y pudo ver que la fecha de finalización de la temporada reproductiva se retrasaba alrededor de seis meses.

Sin embargo, las ventajas de la presencia continua de machos en el rebaño desaparece en la práctica debido a que las hembras tardan más en ser cubiertas que las hembras aisladas, que son estimuladas por la introducción espontánea de los moruecos en el anoestro tardío (Notter, 1989), y esto se debe a que las hembras muestran un período de receptividad sexual más corto a los machos cuando se encuentran en permanente contacto con los mismos que en los casos de contacto espontáneo y ocasional (Parsons and Hunter, 1967; Fletcher and Lindsay, 1971). Esto se evidenció a través del trabajo de Lindsay (1975), donde vio que la presencia continua de machos en el proestro y estro adelanta la ovulación hacia el inicio del estro, debido a un anticipo del pico preovulatorio de LH.

En las corderas la presencia continua de machos retrasa la primera ovulación alrededor de 2 meses, comparadas con corderas aisladas (Al-Maully et al., 1991).

El efecto agudo causado por el contacto de las ovejas con los machos es el que se conoce como el “efecto macho”. Se caracteriza por una rápida respuesta de las ovejas a la exposición espontánea con los moruecos, que inicia eventos endocrinos que llevan a la ovulación dentro de las 50 horas post contacto (Martin et al., 1986). Esta respuesta se ha visto tanto en el anoestro estacional como en el lactacional y el prepuberal (Mauléon and Dautier, 1965; Poindron et al., 1980).

Para que el efecto macho se consiga es necesario que exista un *aislamiento entre sexos previo* y que las *hembras se encuentren en anoestro* (Underwood et al., 1994; Schinckel, 1954)

#### 2.2.1.1.1. *Aislamiento entre sexos*

Esta es una condición absolutamente necesaria (Martin et al., 1986) y su duración es algo discutida ya que se habla de entre 2 y 6 semanas como



mínimo, existiendo factores que afecten dicho plazo, como son la edad, la raza, el período del año, la ubicación geográfica, etc. (Rosa and Bryant, 2002). En líneas generales se acepta que 4 semanas de aislamiento es suficiente.

Es de importancia destacar que durante este período, en las granjas que cuentan con machos cabríos, estos también deben estar separados de las ovejas, ya que tienen la capacidad de generar un estímulo sexual en las mismas (Knight et al., 1983).

El aislamiento debe ser completo, es decir, físico, olfativo y auditivo, por lo tanto es de suma importancia que machos y hembras se encuentren separados por una distancia que no permita la visualización, olfacción y audición de los machos por parte de las hembras (Martin et al., 1986).

Cabe decir que algunos autores sugieren que el aislamiento no es del todo necesario, hablando de horas o incluso de la no necesidad de aislar machos y hembras, cuando los machos son nuevos (Delgadillo et al., 2009, Cohen-Tannoudji, 1987; Hawken and Beard, 2009; Cushwa et al., 1992; Pearce and Oldham, 1988; Cohen-Tannoudji and Signoret, 1987).

#### *2.2.1.1.2. Las hembras deben encontrarse en el período de anoestro.*

Desde que se iniciaron los estudios del “efecto macho” se consideró necesario que las hembras se encuentren sin ciclar, es decir sin el bloqueo de su eje hipotalámico-hipofisario-gonadal regido por la progesterona que se ve durante la fase luteal del ciclo estral.

Sin embargo, Delgadillo et al. (2009), en una revisión exhaustiva del tema, postuló que los machos tienen la capacidad de producir efectos en el eje reproductivo de la hembra, logrando estimular la secreción de LH y alterar la distribución de los estros. Ya se mencionó también que la presencia continua de los machos alarga la temporada reproductiva, anticipando su comienzo y retrasando su finalización, sin embargo el término “efecto macho” no incluye esta variante.

#### *2.2.1.1.3. Los machos*

El macho brinda un estímulo a la hembra que está compuesto por dos componentes, uno químico-físico, y otro social.

La capacidad del macho para estimular es andrógeno-dependiente, y estos andrógenos son los que estimulan la producción de feromonas, que son un componente de las secreciones de las glándulas sebáceas y odoríferas (Abecia y Forcada, 2010). Asimismo, estos andrógenos son los responsables del comportamiento de los moruecos ante una hembra, que es otro componente fundamental para estimular a las mismas.

Debemos saber que entre los machos, podemos encontrar algunos más activos sexualmente que otros, y por tal motivo con mayor o menor capacidad de estimular la ovulación en las hembras.

Hay moruecos que brindan un mayor estímulo tanto por su producción de feromonas como por su comportamiento, asimismo cabe destacar que la inclinación sexual de los machos es determinante, ya que existen animales que son menos atraídos por las hembras (Haynes and Haresign, 1987).

La edad, la raza y la experiencia sexual son factores muy importantes a la hora de elegir los machos. La edad se relaciona con la producción de feromonas, sabiendo que los machos más viejos tienen una mayor producción de las mismas en comparación con los jóvenes.

La estación reproductiva es otro factor que influye en el “efecto macho”, esto pudo verse en trabajos en los que los machos fueron tratados con melatonina fuera de la estación reproductiva y demostraron mayor capacidad para estimular a las ovejas (Rosa et al., 2000).

El hecho de que sean machos conocidos por las ovejas o no, también tiene relación con la respuesta buscada ya que las hembras tienen la capacidad de aprender y recordar la identidad de los moruecos. Por esta razón los machos nuevos en el rebaño muchas veces tienen mayor capacidad de estímulo que los machos con los que las ovejas están familiarizadas. Esto también se ve en el caso de ovejas cíclicas durante la temporada reproductiva cuando los machos son remplazados cada 17 días evidenciando cambios en la distribución de los estros (Hawken et al., 2007).

El contacto físico es fundamental, implicando al sentido de la vista y también el olfato, esto se puede verificar en el trabajo de Pearce y Oldham (1990) en el que se separaron animales de ambos sexos mediante una valla y

por otro lado las hembras eran o no estimuladas por una máscara dispuesta en los ollares conteniendo o no lana de morueco.

En cuanto al número de moruecos, una relación macho-hembra de 1:15-1:20 es necesaria para lograr un éxito en cubriciones (Abecia y Forcada, 2010).

#### *2.2.1.1.4. Las hembras*

Ya se mencionó que las hembras deben estar aisladas de los machos y deben encontrarse en anoestro para que el “efecto macho” brinde una respuesta adecuada.

#### *2.2.1.1.5. Respuesta endocrina a la introducción de machos*

Al introducir los machos en el rebaño, la primera respuesta endocrina de la oveja es un incremento en la secreción basal de LH en 10-20 minutos, que se caracteriza por un aumento en la frecuencia de pulsos con una disminución en la amplitud de los mismos (Martin et al., 1980a, 1986; Poindron et al., 1980). Este patrón de secreción es seguido por un pico preovulatorio de esta hormona que se da entre 6 a 52 horas (media de 27 horas) (Abecia y Forcada, 2010) después de la introducción de los moruecos. Existen dos posibles vías por las que la señal feromonal se convierte en hormonal, ya sea a través de la percepción de las feromonas por el órgano vomeronasal o por la mucosa olfatoria para transmitir dicha señal hasta el hipotálamo.

En contraste con la LH, la secreción de FSH se mantiene sin variación (Martin et al., 1980a, b) o tiende a disminuir y mantenerse baja (Atkinson y Williamson, 1985).

Es de importancia que el estímulo de los machos sea duradero para que la respuesta endocrina se mantenga. Aunque la secreción de LH se incrementa a los pocos minutos de la introducción de los machos, dicha secreción es alta solo durante el período en que los machos están presentes (Pearce and Oldham, 1984), y es necesaria que la concentración de dicha hormona sea sostenida para que los eventos preovulatorios tengan lugar. Por tal motivo, es un requisito que los machos deban estar presentes por un período considerable que permita esto. Lo que se traduce en que los moruecos sean mantenidos con las ovejas hasta la ovulación de las mismas (Oldham and Cognie, 1980; Signoret et al., 1982; Murtagh et al., 1984; Folch, 1990). Asimismo la presencia

de los machos es necesaria aún después de la primera ovulación, para mantener ciclos ovulatorios (Rosa et al., 2002), por eso se recomienda la permanencia de los mismos durante 45 días como mínimo.

#### *2.2.1.1.6. Tipos de Respuesta*

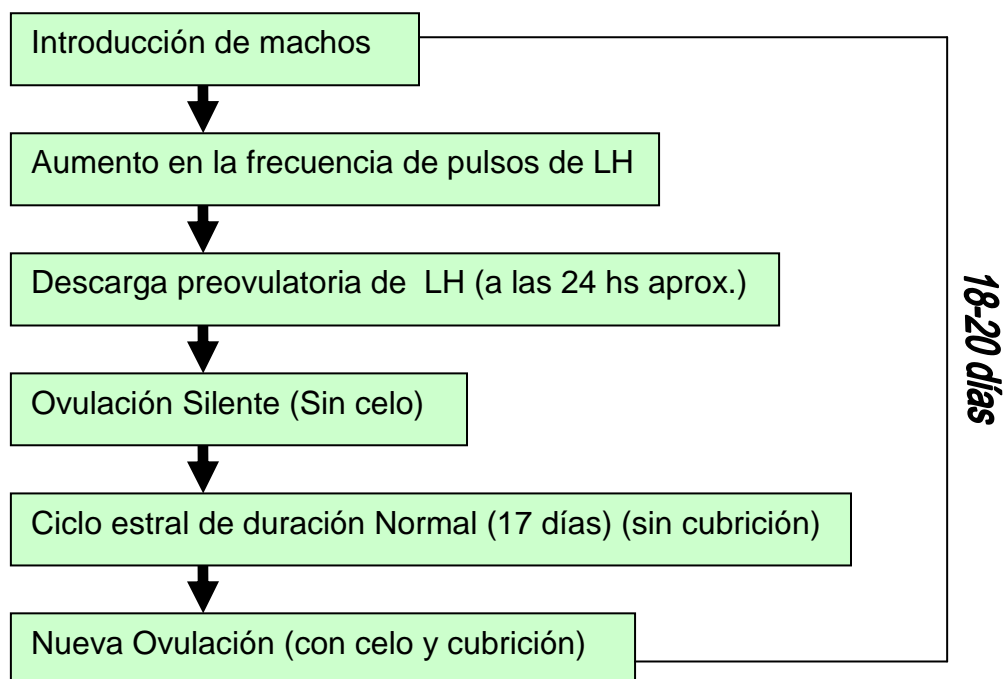
La respuesta de las ovejas a la introducción de los machos es diferente de acuerdo a si estas se encuentran en actividad sexual o no. Si bien, como se dijo, el efecto macho se realiza en la temporada de anestro, siempre en los rebaños encontraremos hembras que se encuentran cíclicas y la cantidad de las mismas depende de varios factores, entre ellos la raza, el mes del año y la condición corporal (Abecia y Forcada, 2010).

La introducción de los machos no afecta el status hormonal de estas hembras. Por tal motivo, durante los primeros 17 días tras el contacto de los machos con las ovejas, se da una serie de ovulaciones en goteo que corresponden a estas hembras.

Las ovejas anoéstricas, que son el objeto del “efecto macho”, son las que van a modificar su campo hormonal como se describió previamente. En estas se encuentran dos tipos de respuestas:

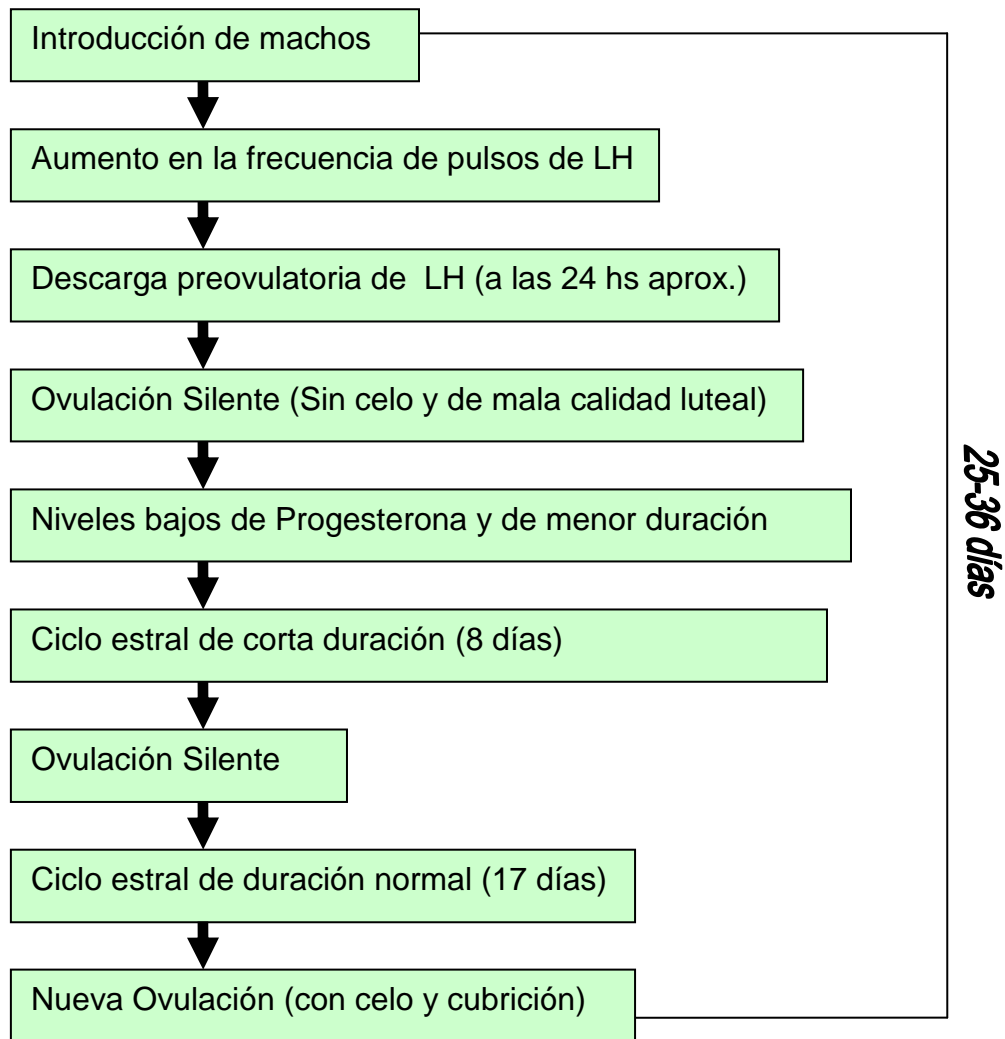
- ✓ Ovejas que responden a la introducción de machos desencadenando un ciclo estral normal (de 17 días) (Figura 4).
- ✓ Ovejas que responden a la introducción de machos desencadenando un ciclo estral corto (Figura 5).

2.2.1.1.6.1. Ovejas con ciclo normal:



**Figura 4.** Respuesta de ovejas a la introducción de machos desencadenando un ciclo estral normal (17 días).

#### 2.2.1.1.6.2 Ovejas con ciclo corto:



**Figura 5.** Respuesta de ovejas a la introducción de machos desencadenando un ciclo estral corto.

#### 2.2.1.1.7. Combinación con otros tratamientos

Se ha demostrado que el efecto macho puede combinarse con los tratamientos hormonales mejorando la estimulación del pico preovulatorio de LH y la ovulación, y con esto la sincronización de los celos.

Si bien el “efecto macho” es utilizado en la etapa de anoestro, ya se mencionó que la presencia de machos tiene efectos sobre la actividad reproductiva de las hembras aún en temporada reproductiva, como así también

en ovejas tratadas con progestágenos (Evans et al., 2004), prostaglandinas (Contreras-Solis et al., 2009) y melatonina (Palacin et al., 2011).

#### **2.2.1.2. Control de la luz**

Como se dijo con anterioridad, la oveja es una hembra que presenta una estación reproductiva durante los días cortos del año. Su actividad reproductiva se dispara cuando la duración de la luz diurna decrece, es decir a finales de verano y comienzos de otoño (Abecia y Forcada, 2010).

El cambio en la duración del día desde días largos a días cortos inicia el estro en las ovejas y teniendo en cuenta esto se puede pensar que modificando la duración del día es posible inducir la ovulación fuera de la temporada reproductiva (Kennedy, 2008, Chemineau, 1992).

Para llevar a cabo dicho propósito es necesario crear una situación para controlar la iluminación que percibe el animal, donde días largos sean seguidos por días cortos previos al inicio de la monta fuera de estación reproductiva, que es el objetivo del método en cuestión (Kennedy, 2008)

Si bien existen diferencias entre razas en respuesta a la luz, si el programa de manipulación lumínica se realiza rigurosamente la mayoría responderá, de hecho es posible alargar la estación reproductiva en las razas que presentan un período natural corto de apareamiento.

##### *2.2.1.2.1. Protocolo de uso*

El programa más recomendado debería ser llevado a cabo exponiendo a las ovejas a días largos durante 8-12 semanas y luego a días cortos durante el mismo período de tiempo antes de la monta. Los machos también deben someterse a tratamiento de luz de igual modo que a las ovejas, de esta manera se logra un mayor crecimiento testicular, actividad de monta y calidad seminal (Kennedy, 2008).

Hay varios factores a tener en cuenta para el buen manejo del sistema:

- ✓ La diferencia de iluminación entre días largos y días cortos debe ser de 6-8 horas. Los flashes de luz o cualquier tipo de contaminación lumínica pueden alterar la percepción de oscuridad por parte de la oveja.

- ✓ Se requiere un mínimo de 100 lux como luz diurna y menos de 10 lux para el período de oscuridad.
- ✓ El comienzo de la monta dependerá de la raza y la época del año, pero como mínimo se debe someter a las hembras a 8 semanas de tratamiento bajo días cortos.
- ✓ Se debe finalizar el período de días cortos tan pronto como los machos son separados de las ovejas.

Las ovejas bajo este sistema de control reproductivo pueden exhibir más de un ciclo estral similar a las hembras en estación reproductiva (Chemineau, 1992) y si el protocolo es rigurosamente llevado a cabo pueden verse tasas de concepción mayores a 80% (Kennedy, 2008).

Si bien este método puede dar muy buenos resultados, hay que tener en cuenta que presenta varias desventajas. En primer lugar los animales deben mantenerse en confinamiento total y se debe contar con un sistema adaptado para el control de la luz no solo en duración de la misma sino también en intensidad. Todo esto incrementa los costos de manejo además de restringir las opciones de alimentación.

Lo más importante a tener en cuenta a la hora de decidir realizar un control de la luz es llevarlo a cabo de la mejor manera posible para asegurar su éxito, ya que las ovejas que no logren cubrirse mediante dicho método entrarán en estro el siguiente otoño de 8-12 semanas más tarde de lo usual (Kennedy, 2008).

### **2.2.2. Métodos Farmacológicos**

La utilización de hormonas para el manejo reproductivo en los animales fue implementada desde hace varias décadas. Conociendo concienzudamente la fisiología y el control endocrino del ciclo, es posible modificar dichos fenómenos en las hembras. Entre las ventajas de estos métodos cabe destacar que facilitan la sincronización de celos y el uso de la inseminación artificial (I.A.) debido a la dificultad que la detección de celos presente en esta especie, y con ello también la implementación de la transferencia de embriones (T.E).



Esto permite controlar los partos y obtener corderos más uniformes. Asimismo, el uso de hormonas permite adelantar el primer celo en corderas, adelantando así la pubertad y la actividad reproductiva. La desventaja radica en las restricciones de algunos países en su uso, debido a los residuos de dichas hormonas que permanecen en los animales.

### **2.2.2.1. Melatonina**

Esta molécula fue descubierta en 1958 en la Universidad de Yale, Estados Unidos (Lerner et al., 1958), se sabe que es producida principalmente por una glándula situada en el encéfalo, llamada glándula pineal, aunque hay cierta evidencia de que también puede ser sintetizada en otros lugares del organismo como la retina, timo, epitelio respiratorio, médula ósea y otros (Carpentieri et al., 2012; Lerner et al., 1959; Pandi-Perumal, 2006). Sin embargo su producción en forma rítmica solo se produce en la glándula pineal y la retina (Cassone et al., 1997).

Interviene en diversos aspectos en la fisiología, y su estudio se concentró sobre todo en medicina humana, donde se sabe que es la encargada de regular el ritmo circadiano y los biorritmos estacionales como sus efectos más importantes. Pero así también se la liga con la inmunomodulación, como antioxidante (Tan et al., 2005; Reiter et al., 2005), adaptación al stress, control del peso corporal y del crecimiento tumoral, entre otros (Dubocovich et al., 2003).

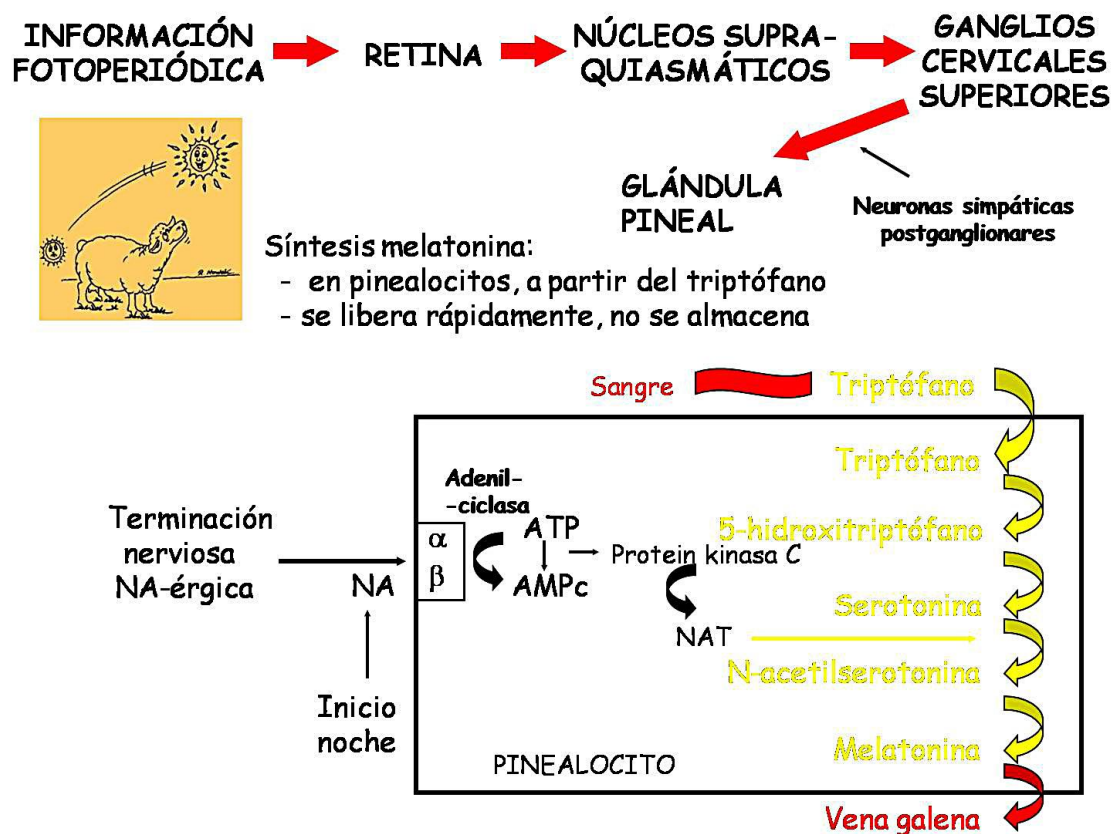
En los animales su estudio se situó fundamentalmente en torno a sus efectos reproductivos, es decir, el control que ejerce sobre la actividad reproductiva de ciertas especies.

#### **2.2.2.1.1. Química, secreción y metabolismo**

Químicamente se trata de una indolamina que contiene dos grupos funcionales, importantes para su unión con el receptor y también por la capacidad que le dan a la molécula para entrar en cualquier célula, compartimento o fluido corporal. Se trata de una molécula muy soluble en lípidos, capaz de pasar fácilmente por difusión desde la circulación hacia cualquier otro fluido o a las células. En sangre, el 70% de la melatonina se

encuentra unido a albúminas y el restante 30% difunde a los tejidos circundantes (Hardeland et al., 2006).

Se sintetiza a partir del aminoácido triptófano, que mediante hidroxilación y descarboxilación es convertido en serotonina. Después, una enzima llamada N-acetiltransferasa (AANAT) convierte la serotonina en N-acetilserotonina (NAS), y la hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT) se encarga de la conversión de NAS en MEL. El ciclo de luz-oscuridad es el encargado de regular dicha síntesis, actuando a través de la activación neural del hipotálamo por medio de axones provenientes de la retina. Asimismo el núcleo supraquiasmático del hipotálamo se encuentra conectado con la glándula pineal por medio de neuronas simpáticas y de este modo transmite la información a dicha glándula (Carpentieri et al., 2012) (Figura 6).



**Figura 6.** Síntesis de melatonina en la glándula Pineal a partir del estímulo luminoso (Abecia y Forcada, 2010)

Los niveles plasmáticos de melatonina en la oveja son basales durante el día, de manera que inmediatamente tras el inicio de la noche, al cabo de 10

minutos aproximadamente, se elevan hasta alcanzar concentraciones entre 100-500 pg/ml (Abecia et al., 2002). A su vez es rápidamente metabolizada en 6-hidroxi-melatonina por el hígado, siendo excretada por orina en forma sulfatada; por tanto, sus niveles vuelven a ser basales al salir el sol. Los niveles nocturnos son variables entre animales, y dicha variabilidad se basa en diferencias en su síntesis, en general en función del tamaño de glándula pineal, pero no en su metabolismo (Zarazaga et al., 1998). Estos fenómenos 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 existente.

Sin embargo los mecanismos por los cuales dicho fotoperiodo regula la actividad reproductiva en el ganado ovino son complejos y van más allá del de pensar en un papel estimulador durante los días cortos o decrecientes y un papel inhibidor durante los días largos o crecientes. De este modo, cuando las ovejas son mantenidas a un régimen constante de días largos o cortos durante varios años, continúan mostrando una alternancia entre periodos de actividad sexual y de anestro (Ducker et al., 1973; Karsch et al., 1989), no estando dichos periodos sincronizados ni entre animales, ni en relación al fotoperiodo natural. 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 (Malpoux et al., 1989), alternando a lo largo del mismo periodos de actividad reproductiva y de anestro.

#### *2.2.2.1.2. Mecanismo de acción y efectos fisiológicos*

La MEL tiene la capacidad de estimular la síntesis de GnRH, y por eso se dice que en esta especie tiene un papel progonadotrópico (Karsch et al., 1984; Yeates, 1949). El lugar y el mecanismo de acción de dicha hormona para el control de la secreción de GnRH han sido objeto de estudios intensivos durante las últimas décadas.

Se sabe que cambios en la duración de la secreción de MEL constituye una señal que permite controlar la secreción de gonadotropinas hipofisarias, y así una larga duración de dicha secreción estimula la secreción de estas

últimas y una corta duración tiene un efecto inhibitorio. En numerosos estudios en los cuales animales en anestro fueron tratados con melatonina, se pudo ver que altos niveles de la misma llevaron a la activación del eje hipotálamo-hipofisario y así a la secreción de GnRH y LH (Misztal et al., 2002; Arendt et al., 1983; Bertrand et al., 1998; Karsch et al., 1984). Asimismo se pudo ver que la activación de este sistema en hembras en anestro llevándolas al inicio de la actividad sexual requiere de varias semanas de exposición a concentraciones elevadas de melatonina (Legan et al., 1977).

Al parecer su actividad principal se ejerce a nivel hipotalámico, modificando la frecuencia de liberación de GnRH, con lo que paralelamente implica a la liberación de LH hipofisaria. No obstante, su mecanismo concreto de acción a nivel del sistema nervioso central no está totalmente determinado, pues la mayor actividad de microimplantes de melatonina colocados en diferentes lugares hipotalámicos parece tener lugar en el hipotálamo medio-basal (Malpaux et al., 1993), una zona de baja densidad de receptores y donde se ubican únicamente el 15% de las neuronas GnRH.

Estas y otras evidencias sugieren que la acción de la melatonina sobre las neuronas productoras de GnRH es indirecta, de manera que se ponen en juego otras neuronas y neuromediadores. Así, algunos estudios indican que un componente importante del efecto estimulador de la melatonina en la liberación de GnRH (y por tanto de LH) parece ser la reducción de la síntesis de dopamina, a través de la reducción de la actividad de la enzima tirosina hidroxilasa en la eminencia media, que es la encargada de catalizar la conversión del aminoácido L-tirosina a dihidroxifenilalanina (DOPA), precursor de la dopamina (Viguié et al., 1997; Malpaux et al., 1997). De este modo, el sistema dopaminérgico parece implicado en la inhibición de la liberación de LH durante el anestro estacionario, acción mediada por el estradiol-17 $\beta$  (Le Corre and Chemineau, 1993; Forcada et al., 1997), especialmente al inicio del mismo incluso en razas de reducida estacionalidad sexual (Forcada et al., 1997).

Numerosos estudios citan efectos de la MEL a nivel ovárico, demostrando que podría reducir la atresia folicular e incrementar el crecimiento de los folículos (Bister et al., 1999); asimismo también actúa sobre el cuerpo lúteo, incrementando la producción de progesterona (Beard et al., 1994; Wallace et

al., 1988), además se piensa que podría tener influencia sobre la viabilidad embrionaria tanto *in vivo* como *in vitro* (Naitana et al., 1995; Abecia et al. 2001).

A nivel de los machos, por la evidencia obtenida en diversos estudios en los cuales se trataron animales con MEL, se concluyó que tiene un efecto estimulante en la secreción de LH y del tamaño testicular (Webster et al., 1991).

#### 2.2.2.1.3. Protocolo de uso

El tratamiento para el control de la actividad sexual tanto en ovino, como en caprinos, se realiza mediante la colocación de implantes subcutáneos, aunque también se dispuso de formas orales e intramusculares pero que por motivos prácticos no se utilizan en la actualidad.

Los implantes están disponibles comercialmente desde la década de los 90s en varios países de Europa y también en otros continentes, sobre todo en Oceanía, pero por el contrario, no están disponibles en los Estados Unidos.

Estos han sido empleados para anticipar la temporada reproductiva en animales en anestro. Estos implantes tienen la capacidad de liberar la hormona durante tiempo prolongado asegurando concentraciones altas de la misma las 24 horas del día (Malpaux et al., 1997).

Dichos implantes tienen un tamaño de 2x4 mm y contienen 18 mg de melatonina y están diseñados para mantener altas concentraciones en sangre durante por lo menos 60 días, aunque continúan liberando la hormona por más de 100 días (Forcada et al., 2002). Tales concentraciones se mantienen durante el día por encima de 100 pg/ml (Forcada et al., 1995).

Como primera medida para comenzar el tratamiento, machos y hembras deben estar separados, de igual forma que en el “efecto macho”. El protocolo contempla la aplicación de un implante a las hembras y tres en el caso de los machos.

Cuarenta días después de la implantación en las hembras, los animales son reunidos, y cabe destacar que es de importancia vital respetar estos tiempos para dar el tiempo a las hembras para responder a la sensación fotoperiódica inducida por el tratamiento (Nowak and Rodway, 1985; Viguié et al., 1995). Tras la introducción de los machos, las hembras comienzan a

mostrar celos, mostrando un pico alrededor del día 20, seguido de otro 5 días más tarde (Martin et al., 1999).

El momento en el que se realiza el tratamiento es muy importante para garantizar la eficacia del mismo. Los implantes insertados alrededor del solsticio de verano han sido ampliamente utilizados para anticipar la estación reproductiva en ovejas que se encuentran en latitudes más al norte de 45°N o más al sur de 45°S (McMillan and Sealey, 1989; Haresign et al., 1990). Los animales ubicados en latitudes más al sur que 40°N o más al norte que 40°S tienen su comienzo de la estación reproductiva más temprano que los anteriormente citados (Martin et al., 1999). En estas áreas, los implantes pueden ser aplicados alrededor del equinoccio de primavera (Chemineau et al., 1996). Lógicamente, la necesidad del uso de melatonina en latitudes entre 20°N y 20°S es limitada, ya que las ovejas situadas entre dichas latitudes tienen un patrón de actividad reproductiva a lo largo de todo el año.

El tratamiento con melatonina es ventajoso en sistemas de producción extensivos ya que requiere de menor mano de obra que los otros protocolos.

Entre los factores que pueden influir en la efectividad del tratamiento tenemos, el momento en el que se realiza el mismo, el sistema de producción y el estado fisiológico del animal. Estos factores fueron evaluados en variedad de estudios. Si bien el protocolo comercial sugiere que los implantes sean colocados alrededor de 45 días post-parto, se vio mejores resultados cuando fueron insertados en el momento del parto (Abecia et al., 2002).

Asimismo algunos estudios demuestran que la eficacia del tratamiento puede ser mayor cuando los animales se encuentran privados de buena alimentación (Arrébola et al., 2009).

Un meta-análisis estadístico que contempló la revisión de más de cincuenta publicaciones y más de cien experimentos, realizado por Palacín et al. en 2011, determinó un incremento en un 29% de la fertilidad (probabilidad de una oveja de quedar preñada), asimismo un aumento de 0,08 corderos por parto y también una mayor fecundidad (número de corderos/100 ovejas) con 0,25 corderos extra por oveja tratada.

### 2.2.2.2. Prostaglandinas

Las prostaglandinas forman parte de un grupo de compuestos lipídicos derivados enzimáticamente de ácidos grasos, los eicosanoides, que tienen importantes funciones en el organismo. Cada prostaglandina contiene 20 átomos de carbono, incluyendo un anillo ciclopentano (Aquirre Solis and Wellington, 2003). Son mediadores, y tienen diversos efectos fisiológicos muy potentes, interviniendo en por ejemplo en la regulación de la actividad del músculo liso, de las secreciones y del flujo sanguíneo. A pesar de que técnicamente son hormonas, rara vez son clasificadas como tales.

El nombre "prostaglandina" deriva de la glándula prostática, ya que en 1935, el fisiólogo sueco Ulf von Euler, e independientemente MW Goldblatt, aislaron por primera vez la prostaglandina a partir del fluido seminal, y se pensó que eran parte de las secreciones de la próstata. En realidad las prostaglandinas son producidas por las vesículas seminales y más tarde asimismo se demostró que muchos otros tejidos segregan prostaglandinas para diversas funciones.

En 1970, Sultán Karim fue el primero en utilizar las prostaglandinas para la inducción satisfactoria del parto y los abortos (Espinoza et al., 2002).

Los estudios acerca de estas moléculas no cesaron desde su descubrimiento y en 1982, los bioquímicos Sune K. Bergström, Bengt Samuelsson y John R. Vane recibieron conjuntamente el Premio Nobel de Fisiología y Medicina por su investigación sobre las prostaglandinas.

#### 2.2.2.2.1. Química, secreción y metabolismo.

Las prostaglandinas se encuentran en prácticamente todos los tejidos y órganos. Son lípidos mediadores autocrinos y paracrinos que actúan sobre las plaquetas, el endotelio, las células uterinas, los mastocitos, etc. Se sintetizan en las células a partir de los ácidos grasos esenciales, y junto con los tromboxanos, leucotrienos, y ciertos hidroxiácidos precursores de los leucotrienos se designan como eicosanoides (Aquirre Solis and Wellington, 2003).

En la Figura 7 se puede ver que en su síntesis participan diversas enzimas como fosfolipasas, lipooxigenasas, y las ciclooxigenasas que son las encargadas de producir las prostaglandinas.

La síntesis de eicosanoides comienza cuando la enzima fosfolipasa-A 2 o la fosfolipasa-C crea un intermediario a partir del diacilglicerol o fosfolípidos de membrana, el ácido araquidónico. Estas fosfolipasas son activadas por diferentes estímulos físicos, químicos y hormonales, como son: trauma, infección, infusión con solución hipertónica, trombos, endotoxinas, estiramiento mecánico, esteroides sexuales y catecolaminas (Espinoza et al., 2002).

Una vez liberado el ácido araquidónico, la vía de síntesis puede tomar dos direcciones: la vía de la lipooxigenasa o la vía de la ciclooxigenasa.

La vía de la 5-lipooxigenasa da lugar a varios productos denominados leucotrienos (LT), son producidos por los leucitos como resultado de una reacción anafiláctica y se consideran los principales agonistas en la producción del broncoespasmo.

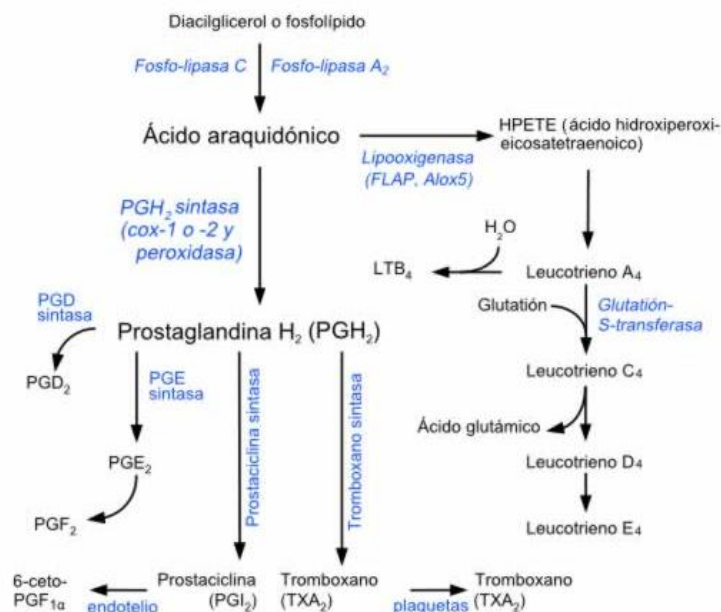
La vía de la ciclooxigenasa produce tromboxano, prostaciclina y prostaglandinas D, E y F.

Las prostaglandinas se producen tras la oxidación secuencial del ácido araquidónico, ácido dihomo-gamma linolénico (DGLA) o ácido eicosapentaenoico (EPA) mediante ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2) y prostaglandinas-sintasas terminales.

La COX-1 es responsable de los niveles base de prostaglandinas y la COX-2 produce prostaglandinas a través de estimulación.

Sin embargo, mientras que la COX-1 y COX-2 se encuentran en los vasos sanguíneos, el estómago y los riñones, los niveles de prostaglandinas aumentan mediante la COX-2 en los escenarios de la inflamación. Una tercera forma de COX, la COX-3, ha sido identificada, pero su función exacta aún no se ha determinado (Espinoza et al., 2002).





**Figura 7.** Síntesis de los Eicosanoides.

El metabolismo de las prostaglandinas tiene lugar principalmente en los pulmones, riñón e hígado. Los pulmones son importantes en el metabolismo de la PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2α</sub>. El 2α como subíndice en todas. Existe un mecanismo de transporte activo que específicamente traslada a las prostaglandinas desde la circulación a los pulmones. Por lo tanto tienen una vida media corta (3-5 minutos), y muchas veces ejercen su acción en el lugar de su síntesis.

#### 2.2.2.2.2. Funciones

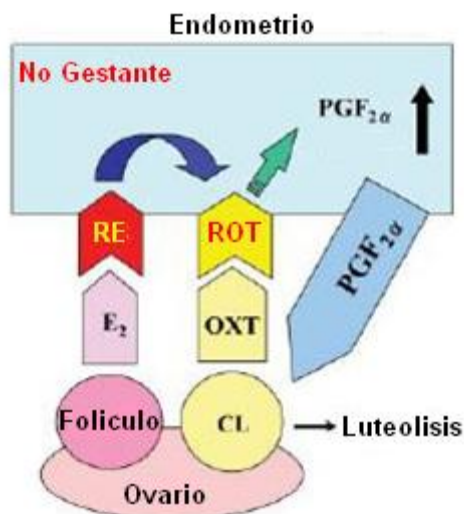
Hasta el momento se han reconocido nueve receptores de prostaglandinas en diferentes tipos de células. Las prostaglandinas se enlazan a una subfamilia de receptores transmembrana de la superficie celular, los receptores acoplados a proteína G.

Esta variedad de receptores significa que las prostaglandinas actúan en diversas células, y tienen una amplia variedad de acciones:

- ✓ Constricción o dilatación en las células musculares lisas del tejido vascular.
- ✓ Control de la permeabilidad vascular.
- ✓ Agregación o desagregación plaquetaria.
- ✓ Sensibilización de las neuronas espinales al dolor.
- ✓ Disminución de la presión intraocular.

- ✓ Regulación de la mediación inflamación.
- ✓ Regulación del movimiento de calcio.
- ✓ Control de la regulación hormonal.
- ✓ Control del crecimiento celular.
- ✓ Lisis del cuerpo lúteo (Figura 8).

Las prostaglandinas son potentes, pero tienen una corta vida media antes de inactivarse y excretarse, por lo tanto, ejercen sólo una función paracrina (activa a nivel local) o autocrina (actuando en la misma célula de la que se sintetiza).



**Figura 8.** Mecanismo de la luteólisis (modificado de Melisho, 2010) (RE: receptores de estrógenos; ROT: receptores de oxitocina; IFN-R: receptores para interferón; OXT: oxitocina; E2: estrógenos; PGF2 $\alpha$ : prostaglandina F2 $\alpha$ ; IFNT: interferón Tau; CL: cuerpo lúteo)

#### 2.2.2.2.3. Protocolo de uso

Las prostaglandinas se utilizan para el control de la reproducción en los animales por su capacidad de lisar el cuerpo Lúteo (CL), induciendo una subsecuente fase folicular y la ovulación (McCracken et al., 1972). La prostaglandina utilizada para tal fin es la PGF2 $\alpha$  o sus análogos (cloprostenol y luprostiol) (Douglas y Ginther, 1973).

La mayor ventaja del uso de estos fármacos es la posibilidad de administrarlos vía intramuscular. De esta forma se mejora el manejo y el bienestar animal si lo comparamos con los dispositivos intravaginales.

Asimismo por su rápido y casi total (99%) metabolismo a nivel pulmonar, permite tener niveles de residuos muy bajos en sangre (Light et al., 1994).

La desventaja radica en el hecho de que para ser efectiva, la PGF2 $\alpha$ , debe ser aplicada en presencia de un CL, por lo tanto, los animales que fuera de estación reproductiva no responden al tratamiento. Así, esta prostaglandina debe usarse durante la estación reproductiva.

Sin embargo, en las áreas tropicales donde las ovejas presentan una casi continua estación ovulatoria, puede aplicarse durante casi todo el año (Godfrey et al., 1997, 1999).

El cuerpo lúteo responde a la PGF2 $\alpha$  a partir del día 3 del ciclo estral (Rubianes et al., 2003) hasta el día de la luteolisis natural, por lo tanto los animales que se encuentren en la fase luteal temprana o en fase folicular o bien en anestro no responden a la aplicación. Teniendo en mente que no es posible conocer la fase del ciclo estral en un grupo de animales, es necesario administrar dos inyecciones de PGF2 $\alpha$ , separadas por 9-10 días. Así, casi todas las hembras tratadas se encontrarán en la mitad de la fase luteal al momento de la segunda dosis y responderán al tratamiento con la lisis de un CL, el estro y la ovulación.

Una posible solución durante el período de transición reproductiva es la administración de la prostaglandina en combinación con el “efecto macho” (Martin et al., 1986).

Mediante el uso de este protocolo de dos inyecciones separadas por 9-11 días logramos sincronizar los estros, pero la fertilidad al primer servicio es de alrededor de 70%, considerablemente menor que la obtenida mediante el uso de progestágenos y el servicio natural (Boland et al., 1978; Godfrey et al., 1999). Esto podría deberse a que el intervalo de 9-11 días asegura la presencia de un CL a la segunda inyección en la mayoría de los animales, pero tal vez induce una alteración en la dinámica folicular ovulatoria, alterando la funcionalidad y la maduración final de los folículos preovulatorios y la luteogénesis normal, y/o una variabilidad en el momento de la ovulación luego de la luteolisis inducida por la PGF2 $\alpha$  (Barrett et al., 2002; Gonzalez-Bulnes et al., 2005).

La función folicular puede estar comprometida durante la fase luteal media, debido a que las altas concentraciones de progesterona de este momento induce bajos niveles de LH, y se sabe que esta última es crucial para el desarrollo final y maduración de los folículos preovulatorios (Campbell et al., 1995; Gonzalez-Bulnes et al., 2004).

Teniendo en cuenta esto, el momento más oportuno para realizar el tratamiento con PGF<sub>2α</sub> debería ser durante la fase luteal temprana o tardía.

Tratar las ovejas en la fase luteal temprana parece ser la mejor opción, debido a la presencia de folículos grandes en crecimiento de la primera onda de desarrollo folicular (Ginther et al., 1995; Bartlewsky et al., 1999). La experiencia indica que un gran número de animales muestran signos de estro y ovulan cuando son tratadas en esta etapa de la fase luteal (Acritopoulou and Haresign, 1980; Deaver et al., 1986; Houghton et al., 1995).

Contrariamente, los folículos durante la fase luteal media pueden tener una pobre sincronía y con grandes variaciones individuales, teniendo animales que pueden tener gran crecimiento, otros con un crecimiento estático y otros con folículos atrésicos (Barrett et al., 2002, Viñoles et al., 1998).

El tratamiento puede ser aplicado a partir del tercer día del ciclo, como se mencionó anteriormente, cuando el CL tiene la capacidad de responder a la PGF<sub>2α</sub> (Rubianes et al., 2003).

Además, tratando en la fase luteal temprana se favorece la maduración de los folículos y la sincronización del pico preovulatorio de LH y la ovulación, debido a que la restauración de la pulsatilidad de LH se logra de forma más temprana en presencia de un CL que secreta menos progesterona (Deaver et al., 1986). Este protocolo es adecuado para IA (Menchaca et al., 2004 y 2007).

La sincronización del pico preovulatorio de LH y la ovulación puede ajustarse mediante la aplicación del “efecto macho” en el momento de la segunda inyección de PGF<sub>2α</sub>.

Como se mencionó anteriormente en la sección correspondiente a “efecto macho”, este método no farmacológico se puede combinar con fármacos, como la PGF<sub>2α</sub> por ejemplo. La sincronización del pico de LH y la ovulación se puede

mejorar mediante la aplicación de dicho efecto coincidiendo con la segunda dosis de PGF2 $\alpha$ .

Se ha demostrado que la combinación de PGF2 $\alpha$  durante la fase luteal temprana con “efecto macho” es una buena alternativa para la sincronización de estros para IA en ausencia de detección de estro previa. Las tasas de fertilidad inseminando a las 48 y 55 horas después de la inyección de PGF2 $\alpha$  varían entre 44% y 62,5% (Contreras-Solis et al., 2009).

### 2.2.2.3. Progesterona

La progesterona, también conocida como P<sub>4</sub> (pregn-4-ene-3,20-dione) (Allen, 1935), es una hormona esteroidea, involucrada en el ciclo estral y la gestación y que favorecen la gestación (Butenandt and Westphal, 1934). Su fuente principal es el ovario, más precisamente el cuerpo lúteo, y la placenta, aunque también puede sintetizarse en las glándulas adrenales en forma de hidroxiprogesterona en algunas especies.

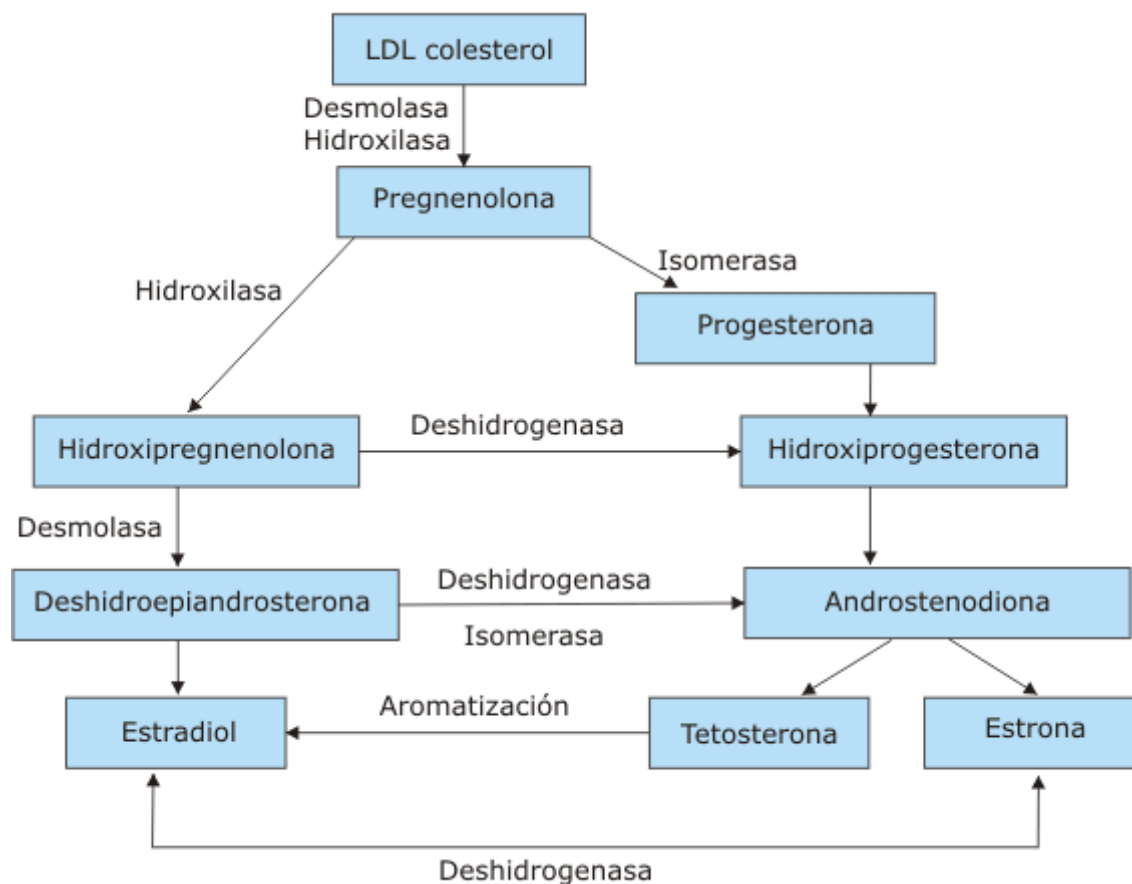
La progesterona fue descubierta independientemente por cuatro grupos de investigación. (Allen, 1935; Butenandt and Westphal, 1934; Hartmann and Wettstein, 1934; Slotta, Ruschig and Fels 1934) y su el nombre de *progesterone* derivado de **progestational steroidal ketone**, fue dado por Allen en 1935.

#### 2.2.2.3.1. Química, secreción y metabolismo

La progesterona, tal como todas las hormonas esteroideas (progestágenos, estrógenos, andrógenos, glucocorticoides y mineralocorticoides), es sintetizada a partir de pregnenolona, que a su vez deriva del colesterol (Applezweig, 1969).

La primera reacción en convertir el colesterol en hormonas esteroides involucra la degradación del mismo, llevada a cabo por una enzima llamada desmolasa ligada a citocromo P450, el cual es el paso principal, que determina la conversión del colesterol en pregnenolona y asimismo la velocidad de la biosíntesis de esteroides y está altamente regulado (Butenandt and Westphal, 1934).

A partir de la pregnenolona se sintetizan las diversas hormonas esteroideas como se muestra en la Figura 9.



**Figura 9.** Biosíntesis de hormonas esteroideas en el ovario (González Merio, 2007)

#### 2.2.2.3.2. Funciones

Como todas las hormonas esteroideas, la progesterona ejerce su acción al atravesar la membrana plasmática y al unirse con su receptor intracelular.

Este complejo hormona-receptor ejerce su acción al unirse a una secuencia específica de nucleótidos en el ADN de genes que producirán una reacción favorable. La interacción entre este complejo con el ADN conlleva a modificaciones en la transcripción de los genes asociados (Peluso, 2004).

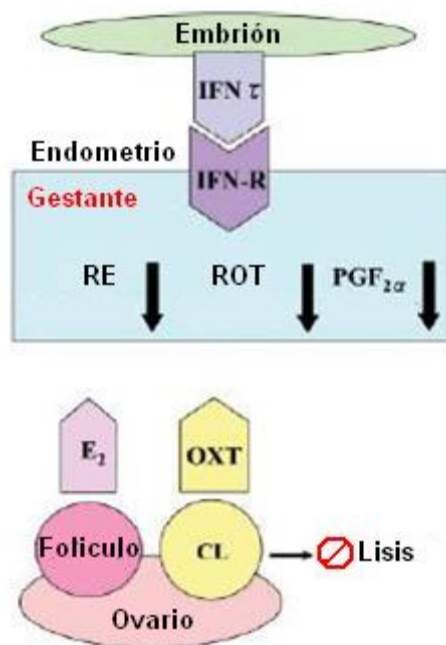
La progesterona ejerce su acción a nivel del tracto reproductor como ya se mencionó anteriormente. Es sintetizada por el CL la fase luteal del ciclo estral, lo que corresponde al diestro, y por la placenta durante la preñez.

Tras la ovulación los niveles de P4 van en aumento, alcanzando valores entre 1 y 5 ng/ml a partir de los días 6-7 del ciclo (Abecia y Forcada, 2010).

*Efectos durante la fase luteal del ciclo estral:*

- ✓ Retroalimentación negativa sobre la liberación de GnRH
- ✓ Aumenta el almacenamiento de fosfolípidos y la actividad enzimática necesaria para la producción de PGF2 $\alpha$  en el endometrio.
- ✓ Bloquea la formación de receptores endometriales para estradiol y oxitocina (dos primeros tercios de la fase luteal)
- ✓ Reducción del número de sus propios receptores endometriales (último tercio de la fase luteal), desbloqueando la formación de receptores de oxitocina, cuya presencia es clave para el inicio de la luteolisis.

En caso de no haber fecundación, el CL sufre una lisis (luteolisis), mediada por la PGF2 $\alpha$  secretada por el endometrio. Esta lisis no se da en caso de resultar preñada la hembra, ya que el CL lúteo es necesario para la secreción de progesterona durante la preñez, y es el propio embrión el que evita dicho acontecimiento mediante la secreción de una proteína llamada interferón tau (INFT) (Abecia y Forcada, 2010) (Figura 10).



**Figura 10.** Retención del cuerpo lúteo y establecimiento de la gestación. (Modificado de Melisho, 2010). (RE: receptores de estrógenos; ROT: receptores de oxitocina; IFN-R: receptores para interferón; OXT: oxitocina; E2: estrógenos; PGF2α: prostaglandina F2α; IFNT: interferón Tau; CL: cuerpo lúteo)

#### *Efectos durante la gestación:*

La progesterona es la encargada del mantenimiento de la gestación en todos los mamíferos. Estimula la secreción de la llamada “leche uterina” y crea un ambiente propicio para el desarrollo fetal. La fuente inicial de progesterona en todas las especies es el CL, pero en el caso de la oveja a partir del día 50 de la gestación es producida por la placenta (Mellisho, 2010).

Además de sus efectos a nivel uterino, la P4 actúa a nivel de otros órganos y tejidos durante la gestación, como se detalla a continuación.

#### *Aparato reproductor.*

- ✓ Crecimiento de las glándulas endometriales,
- ✓ Aumento de la vascularización
- ✓ Infiltración leucocitaria.



- ✓ Incremento de la secreción glandular, el moco vaginal se espesa y se forma el tapón mucoso.
- ✓ Aumento de tamaño del útero por relajación de su musculatura y ligamentos

*Glándula mamaria.*

- ✓ Desarrollo de los conductos y alvéolos mamarios. Actuando junto a los estrógenos a este nivel.

*Equilibrio hídrico y electrolítico.*

- ✓ Aumento de la concentración de aldosterona y favorecimiento de la retención del sodio; esto junto con la retención de otros minerales hace que aumente el agua corporal. Esta acción la realiza en sincronía con los estrógenos.

*Sistema gastrointestinal.*

- ✓ Relajación generalizada del músculo liso. Se hace más lento el vaciamiento gástrico y el tiempo de tránsito intestinal aumenta.

*Metabolismo.*

- ✓ Aumento de la ingesta de alimentos debido a una respuesta del SNC a los esteroides.

*2.2.2.3.3. Protocolo de uso*

El uso de progesterona fue el primer tratamiento publicado para el control reproductivo en ovinos a fines de los años 40 (Dutt and Casida, 1948; O'Mary et al., 1950). El tratamiento consistía de 14 inyecciones subcutáneas diarias de 10 mg de progesterona en una solución de 2 ml de aceite de maíz; el tratamiento redujo el rango en el que las ovejas eran servidas por los machos, a 8 días. Posteriormente se añadió el uso de gonadotropina coriónica equina (ecG) y gonatropina coriónica humana (hcG) (Braden et al., 1960).

Debido a que la progesterona no solo actúa suprimiendo la liberación de gonadotropinas por parte de la hipófisis, sino que también tiene efectos, como se mencionó anteriormente, sobre el tracto genital, la baja fertilidad obtenida

con estos primeros trabajos fue relacionada con el efecto persistente de la progesterona en el ambiente uterino.

Así, Southcott propuso el uso de agentes progestacionales cuya actividad cese en forma abrupta tras finalizado el tratamiento; se optó por el uso de 6-metil-17-acetoxiprogesterona para inducir la sincronización (Southcott et al., 1962).

Con el fin de lograr la abrupta eliminación de la progesterona o sus análogos, se pensó en una vía de administración que facilitara la misma, creándose la ruta intravaginal.

Existen dos métodos a nivel comercial para tal fin:

- ✓ Esponjas de poliuretano impregnadas con progestágeno.
- ✓ Dispositivo de liberación controlada de progesterona (CIDR: Controlled Internal Drug Release).

Así, desde 1960 se utilizaron dispositivos impregnados con progestágenos para sincronizar los estros (Robinson, 1965; Ritar et al., 1984).

Los progestágenos más utilizados a nivel comercial son el acetato de fluorogestona (FGA) (20-40 mg/esponja) y el acetato de medroxiprogesterona (MPA) (60 mg/esponja).

Estos no se encuentran disponibles en todos los países, por ejemplo en Estados Unidos y Canadá, pero si están extensamente distribuidos en otros como Australia y algunos de Europa.

Por otro lado, el acetato de melegestrol (MGA), utilizado en la alimentación en novillas en feedlot, también fue utilizado en ovejas (Gordon, 1996; Daniel et al., 2001).

Las esponjas intravaginales o los CIDRs deben aplicarse entre 2 y 14 días. Las ovejas presentarán estro aproximadamente 48 horas post retirada del dispositivo en cuestión. En ese momento se puede combinar el tratamiento con ecG, como se describirá más adelante.

En el caso del uso en monta natural, se debe mantener un ratio de morueco:ovejas de 1:5.

Cuando se opte por la IA, ésta puede ser realizada desde 47 horas (intrauterina) hasta 55 horas (cervical) tras la retirada del dispositivo.

#### **2.2.2.4. Gonadotropina Coriónica Equina (eCG o PMSG)**

Esta hormona es secretada por el endometrio de la yegua entre los días 40 y 130 de la gestación, más precisamente por el corion, y es utilizada para inducir el estro en las hembras ovina, caprina, bovina y porcina, y también la superovulación en protocolos de transferencia embrionaria.

A pesar de que los extractos de pituitaria de ovino, porcino y caprino son más puros, se prefiere el uso de ecG ya que tiene una vida media más larga (Adams, 2001).

Se trata de una hormona con efectos tanto de FSH como LH (Gordon, 2004).

##### *2.2.2.4.1. Protocolo de uso*

Esta hormona puede ser utilizada para inducir ovulación y sincronizar el celo en la oveja. Su uso se basa en la combinación con el tratamiento con progestágenos o progesterona.

Al momento de retirar el dispositivo intravaginal, los animales deben ser tratados con eCG; esto se fundamenta en el hecho de que para que el tratamiento con progestágenos sea efectivo debe haber concentraciones suficientes de gonadotropinas para iniciar los eventos preovulatorios (Powell et al., 1996).

Este método puede ser aplicado en cualquier época del año, siendo prácticamente obligatoria su aplicación en la temporada de anestro. Sin embargo, su uso en la época reproductiva lleva a mayores tasas de ovulación.

La dosis de ecG varía entre 250 a 500 UI, dependiendo de la edad (250-300 UI en corderas, 350-500 UI en adultas), la temporada (400-500 UI en anestro, 300-350 en la temporada reproductiva), y la raza (menor para razas prolíficas).

### **3. Objetivos**

Estudiar la eficacia de la combinación de implantes subcutáneos de melatonina con una única inyección de una prostaglandina F2 $\alpha$  para la inducción de celos en primavera en ovejas de raza Rasa Aragonesa.

### **4. Hipótesis**

Ya que el tratamiento de prostaglandinas en el ganado ovino sólo es factible en animales cíclicos, durante la época de actividad sexual, es esperable que la melatonina en primavera provoque la actividad ovárica de los animales, hecho que permitiría la actuación de la prostaglandina.

## 5. Material y Métodos

### 5.1. Instalaciones

El experimento se realizó durante los meses de enero a abril de 2012 en la granja experimental del Servicio de Experimentación Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, España (latitud 41° 41'), cumpliendo con los requerimientos del Comité Ético para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza.

### 5.2. Inducción de celo

#### 5.2.1. Animales

El experimento fue llevado a cabo con 51 ovejas adultas (PV= 61,51±8,98 kg; CC=3,06±0,47) pertenecientes a la raza Rasa Aragonesa. Estas fueron alojadas en un solo grupo y alimentadas para cubrir sus necesidades de mantenimiento, a base de paja de cebada *ad libitum* y 550 g de un concentrado (cebada 73%, soja 22% y suplemento mineral 5%).

Se utilizaron cuatro machos enteros pertenecientes a la misma raza que se mantuvieron separados de las hembras, en otra nave, hasta el momento de su introducción a las ovejas.

#### 5.2.2. Grupos experimentales

Las ovejas se dividieron en tres grupos experimentales:

- ✓ *Grupo Melatonina (M, n=17)*: Las ovejas fueron tratadas con implantes de melatonina (18 mg melatonina, Melovine®, CEVA Salud Animal, Barcelona, España) insertados subcutáneamente en la base de la oreja el día 10 de enero (Figura 11).
- ✓ *Grupo Melatonina-Prostaglandinas (MP, n=17)*: El tratamiento se basó en implantes de melatonina de igual forma y fecha que en el grupo anterior, con la adición de una inyección intramuscular de 1 ml de Dinoprost (Dinoprost trometamol 5 mg/ml Enzaprost® T. CEVA Salud Animal, Barcelona, España), desarrollado sintéticamente con acción idéntica a la PGF2 $\alpha$ , el día de introducción de los machos (29 de febrero) (Figura 12).

- ✓ *Grupo Control (C, n=17)*: No se efectuó tratamiento alguno en este grupo, manteniéndose como control (Figura 13).

### **5.3. Control de estros**

Tras introducir los machos (día 0) se realizó un control diario de la ocurrencia de celos en las hembras durante 30 días, tiempo en que los animales de ambos sexos estuvieron juntos. Para tal fin se utilizaron pastillas de colores unidas al pecho de los moruecos mediante arneses diseñados para tal fin. Dichas pastillas contienen un pigmento sintético que se encargó de teñir la grupa de las hembras al ser montadas por los machos y de esta manera se pusieron en evidencia las ovejas en celo.

### **5.4. Diagnóstico de Gestación**

Tras haber mantenido a machos y hembras juntos durante un lapso de 30 días, aquéllos fueron retirados y 11 días después se realizaron ecografías transrectales en las ovejas con el fin de diagnosticar posibles gestaciones. Las hembras que se diagnosticaron como negativas fueron nuevamente ecografiadas 14 días después para descartar falsos negativos.

El ecógrafo utilizado fue del tipo *real-time B-mode scanner* (Aloka SSD 500; Aloka Co., Tokyo, Japón), unido a una sonda transrectal de 7,5 MHz.

### **5.5. Monitoreo hormonal de hembras**

Con el fin de monitorizar la actividad cíclica de las ovejas se tomaron muestras de sangre seriadas (días: 33 y 40 post-inicio de tratamiento y 7 y 14 post introducción de los machos) destinadas al análisis de las concentraciones plasmáticas de progesterona.

Las muestras se tomaron de la vena yugular en tubos heparinizados (BD Vacutainer®, Franklin Lakes, NJ, USA) y se centrifugaron dentro de los 15 minutos de su obtención (600g, 15 min) almacenándose el plasma obtenido a -20°C hasta su posterior procesamiento.

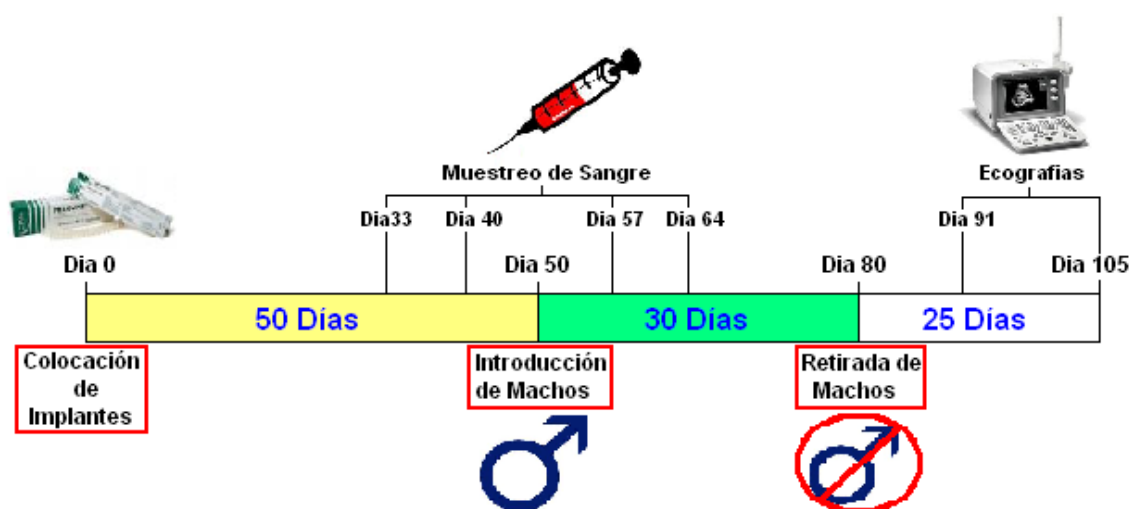
### **5.6. Análisis de progesterona**

La progesterona plasmática se analizó mediante radioinmunoensayo (RIA) utilizando un kit comercial directo de fase sólida (Count-A-Count, DPC, Los

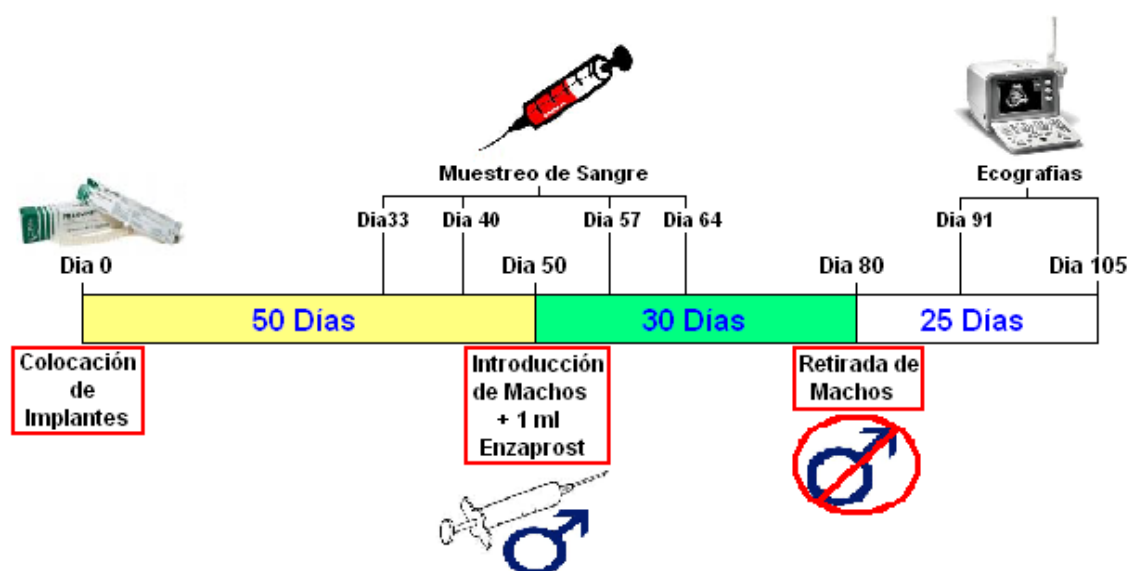
Ángeles, USA), con una sensibilidad de 0,02 ng/ml y un coeficiente de variación intraensayo del 8%. El nivel mínimo para determinar fase luteal fue 1 ng/ml.

## 5.7. Análisis estadístico

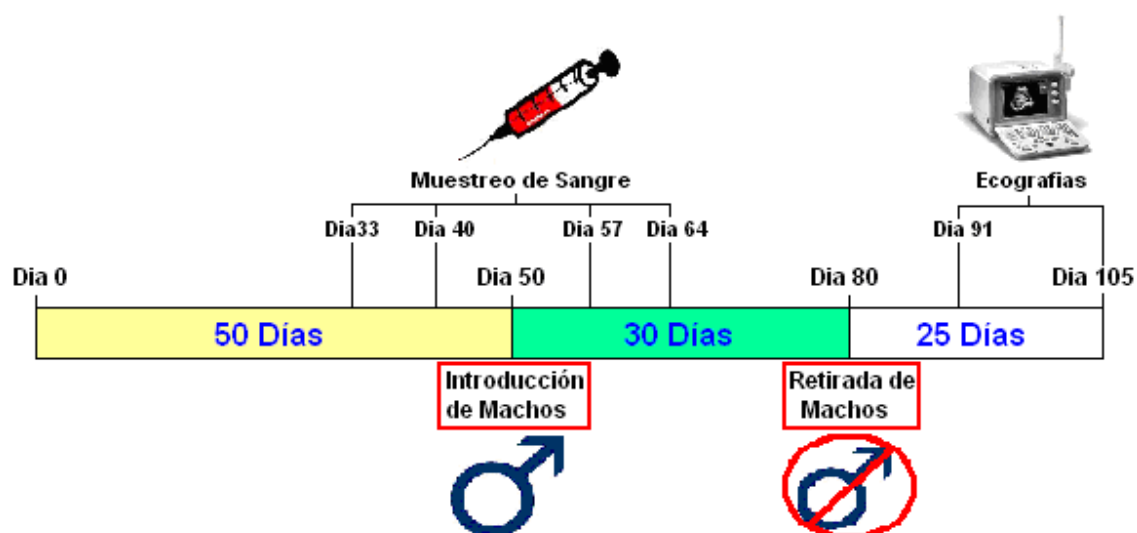
El porcentaje de ovejas mostrando celo cada día y la fertilidad (porcentaje de ovejas gestantes) fueron comparados mediante la prueba de Chi-Cuadrado SPSS 11.1 (SPSS Inc. USA).



**Figura 11.** Cronograma del experimento llevado a cabo en el Grupo Melatonina (M).



**Figura 12.** Cronograma del experimento llevado a cabo en el Grupo Melatonina-prostaglandinas (MP).



**Figura 13.** Cronograma del experimento llevado a cabo en el Grupo Control (C).



## **6. Resultados**

### **6.1. Porcentajes de ciclicidad**

Los resultados obtenidos a partir de la medición de las concentraciones de progesterona demostraron que el 100% de las ovejas presentaban actividad sexual previa a la introducción de machos.

### **6.2. Inducción de celo**

La distribución de las cubriciones diarias mostradas por los grupos experimentales se muestra en el Gráfico 1. El grupo MP mostró un pico de cubriciones de un 41% de sus integrantes a las 72 h de la introducción de los machos, mostrando diferencias significativas ( $p<0,05$ ) frente a los otros dos grupos (M: 12%; C: 0%).

El día 3 posterior a la introducción de machos un 65% del grupo MP ya había mostrado celo, y para el día 6 un 95% de las ovejas del citado grupo había hecho lo mismo, mientras que los grupos M y C contaban con un 54% y 36%, respectivamente a este último día.

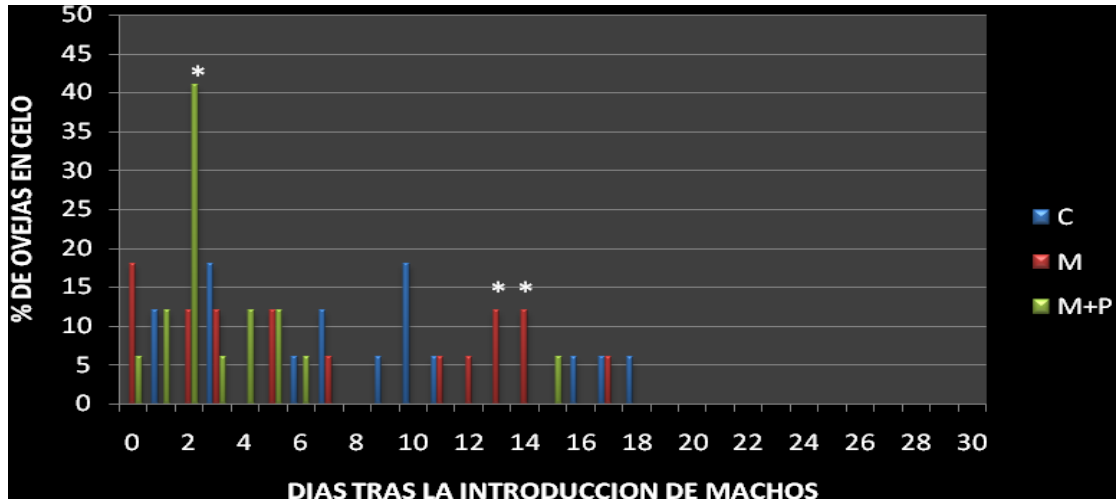
Los días 13 y 14 se observaron diferencias significativas ( $p<0,05$ ), con un 12% de las ovejas del grupo M mostrando celo frente a un 0% de los otros grupos en ambos días (Gráfico 1).

Se llegó al 100% de ovejas cubiertas en el grupo MP el día 15, mientras que el M alcanzó dicho porcentaje el día 17, y el C no pudo hacerlo ya que una hembra nunca mostró actividad sexual (Gráfico 2).

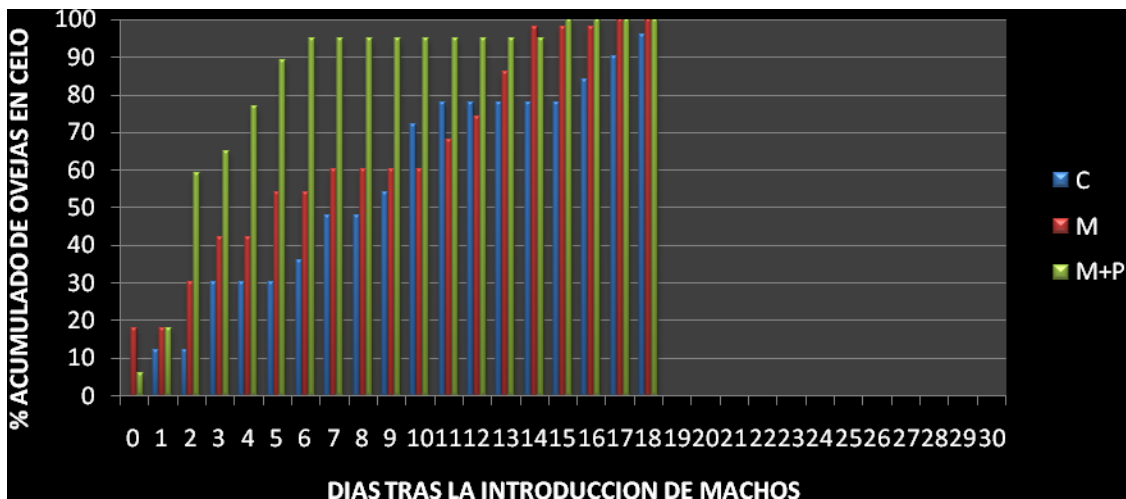
Después de este período las hembras que salieron en celo nuevamente fueron marcadas como “ovejas repetidoras” (celo de retorno).

#### **6.2.1. Celos de retorno (Ovejas Repetidoras)**

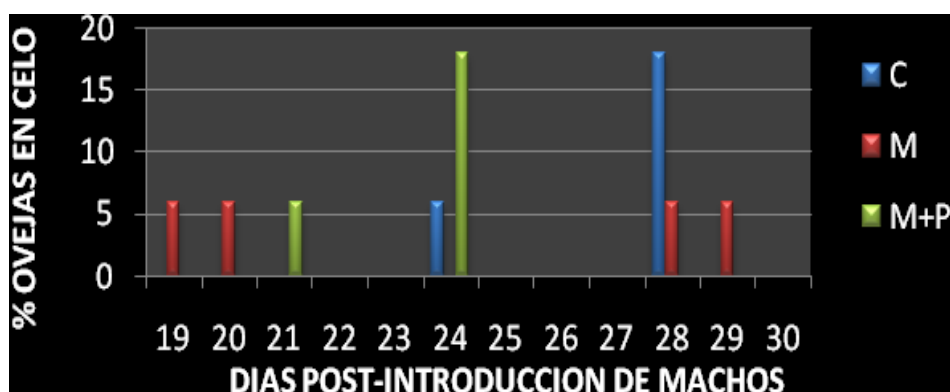
A partir del día 19 hasta el 30 las ovejas que mostraron celo fueron descritas como ovejas repetidoras. En dicho período 13 ovejas repitieron celo, entre las cuales 5 correspondieron al grupo MP (30%), 4 al M (24%) y las 4 restantes al grupo control (24%). (Gráfico 3).



**Gráfico 1.** Porcentaje relativo de celos en los tres grupos. Las barras indican el porcentaje diario de animales vistos en estro para los tres grupos (Control (C), Melatonina (M) y Melatonina+Prostaglandina (M+P)). Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas ( $p<0,05$ ).



**Gráfico 2.** Porcentaje acumulado de celos en los tres grupos. Las barras indican el porcentaje acumulado de animales vistos en estro para los tres grupos (Control (C), Melatonina (M) y Melatonina+Prostaglandina (M+P)).



**Gráfico 3.** Porcentaje de celos de retorno en los tres grupos. Las barras indican el porcentaje de celos de retorno para los tres grupos (Control (C), Melatonina (M) y Melatonina+Prostaglandina (M+P)).

### 6.3. Diagnóstico de Gestación

Del total de los animales, el 55% se diagnosticó como gestante vía ultrasonografía transrectal. No se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos, mostrando el MP el mayor valor con un 59%, evidenciando los dos grupos restantes un 53% (Gráfico 4). Las ovejas diagnosticadas como negativas en el primer diagnóstico ecográfico fueron revisadas nuevamente con el mismo método y solo 3 de las mismas se habían tratado de falsos negativos, siendo dadas como positivas en esta segunda ecografía.



**Gráfico 4.** Tasa de Gestación por grupo (Control (C), Melatonina (M) y Melatonina+Prostaglandina (M+P)). No existe diferencia significativa.

## **7. Discusión**

La combinación de melatonina con PGF2 $\alpha$  consiguió concentrar las cubriciones en comparación con los otros grupos, aunque no se logró una mejora en la fertilidad. Como se mencionó en la introducción, el tratamiento con prostaglandinas no es efectivo durante los primeros 3-4 días del ciclo (inicio de la fase luteal) y los últimos dos días del ciclo estral (final de la fase luteal-inicio de la folicular), debido a que el CL es refractario al tratamiento durante dichos días; esa es la razón por la que se inyectan dos dosis de dicha hormona en los tratamientos convencionales. Teniendo en cuenta que en el presente experimento solo se administró una dosis, el porcentaje de éxito teórico del tratamiento se remonta a un 65-70% de los días que dura el ciclo (12-13 de los 17 totales), hecho que coincide con el porcentaje de aparición de celos del lote MP observado a las 72 horas de la introducción de los machos.

La aparición de celos que se observó tanto en el grupo M como en el C siguió un patrón similar al obtenido en el grupo MP aunque sin un comportamiento tan súbito como en este último grupo en el día 2, y sin una marcada concentración de celos en los primeros días. Estos resultados sorprenden ya que cabía esperar un comportamiento de celo más retardado como se ha visto en experiencias previas de animales tratados con melatonina o con efecto macho, donde los celos se comienzan a ver aproximadamente a los 20 días posteriores a la introducción de machos. Tal aparición temprana de estros se relaciona con la actividad sexual existente en todas las ovejas previa a la introducción de moruecos, como también se podría pensar en un efecto de “simpatía” (Hutlet et al., 1964; Price et al., 1988; Muir et al., 1989; Zarco et al., 1995; Sanford et al., 1974) entre las ovejas por parte de las integrantes de los grupos M y C para con las pertenecientes al grupo MP que salieron en celo previamente, aunque esto no puede asegurarse ya que fueron las ovejas del grupo M las primeras en demostrar celo el día de introducción de machos. Si bien con los tratamientos basados solamente con efecto macho o la combinación de éste y melatonina cabe esperar celos por goteo durante los primeros días, los valores obtenidos en este experimento superaron los esperados normalmente (Abecia y Forcada, 2010).

La actividad sexual previa a la experiencia no concuerda con la esperada para el mes de marzo en esta latitud y en esta raza (Forcada et al., 1992). Dicho fenómeno podría deberse a la elevada condición corporal de los animales en estudio.

La tasa de gestación media (55%) puede considerarse baja, no encontrándose además diferencias significativas entre los grupos. Esto puede relacionarse con diversos factores como ser el ratio machos:hembras o el stress al que fueron sometidos los animales durante la experiencia.

El ratio utilizado fue de 1:12,75, siendo el idóneo para el efecto macho y el tratamiento estándar con melatonina (Abecia y Forcada, 2010).

La rápida y súbita salida en celo de las hembras del grupo MP probablemente llevó a que este ratio se viera superado, siendo los machos incapaces de montar satisfactoriamente a todas las hembras en celo. Asimismo el hecho de que las ovejas de los grupos M y C hayan mostrado celo de manera anticipada fue un agravante para lo anteriormente expuesto, llevando a que el número de moruecos fuera inferior al requerido.

Considerando esto se tomaría al número de machos del experimento como un factor sobre la tasa de gestación y no a la fertilidad (entendida como capacidad de preñar una oveja) de los mismos, ya que se tratan de animales con fertilidad probada, sin embargo hay que destacar que estos animales no se trataron con melatonina como normalmente se acostumbra y recomienda hacer en los protocolos de uso de los tratamientos con esta hormona.

Tal y como se indica en la bibliografía, normalmente en un rebaño ovino un 18% de los machos no muestra deseo sexual y de los machos que lo tienen el 9% tiene inclinación homosexual; esto sumado a los problemas de jerarquía y predilección por determinadas hembras (Abecia y Forcada, 2010; Knight et al., 1983; Rosa, 2002), podrían haber dado lugar a la baja tasa de fertilidad obtenida.

Por otra parte la experiencia impuso un elevado grado de stress diario a las ovejas ya que desde la introducción de machos estas fueron observadas diariamente y marcadas con pinturas en aerosol para facilitar su identificación,

siendo necesario pasarlas por la manga cada día para llevar a cabo dichas actividades.

Cualquier factor de estrés es capaz de suprimir los pulsos de GnRH/LH tanto en su amplitud como en frecuencia, esto se da en parte vía glucocorticoides tipo II y opioides endógenos en la pituitaria como así también mediante conexiones neuronales entre el hipotálamo y la hipófisis que actúan interrumpiendo la liberación de LH mediada por la GnRH y suprimiendo asimismo la liberación de GnRH y la síntesis de sus receptores (Dobson, 1988; Dobson et al., 2012; Phogat et al., 1999; Breen and Karsch, 2006,). Es así que cualquier factor de estrés es capaz de retrasar el pico preovulatorio de LH o bien suprimirlo, como así también puede afectar la concentración plasmática de estradiol durante el estro (Dobson and Smith, 1998; Battaglia et al., 2000; Saifullizam et al., 2010).

Además los pulsos de LH no solo son importantes para la ovulación en si misma, sino que también tienen efectos directos sobre el ovocito vía proyecciones desde las células de la granulosa (Dobson et al., 2012).

Por lo expuesto cabe pensar que las actividades y movimientos mencionados sumados a la presencia de los operarios impusieron un stress sobre los animales que podría haber llevado a fallos desde la manifestación del celo y en la ovulación, hasta pérdidas embrionarias y abortos silenciosos mediados por los mecanismos mencionados anteriormente.

## **8. Conclusión**

En conclusión, la combinación de implantes de melatonina y una única inyección de PGF2 $\alpha$  al introducir los machos en primavera demostró una capacidad de sincronizar los celos del grupo tratado, aunque sin alcanzar los valores habituales del clásico tratamiento de PGF2 $\alpha$  con doble inyección en 7-11 días. El alto grado de ciclicidad presentado por los animales en el mes de marzo (100%) ha impedido expresar totalmente las posibilidades de mejora de esta combinación de fármacos durante el anoestro estacional en esta especie, como método sincronizador de celos.

## 9. Bibliografía:

- Abecia A, Forcada F. Manejo Reproductivo en ganado Ovino. 2010. Servet Editorial.
- Abecia J.A., Valares J.A., Forcada F., Zúñiga O., 2002. Efecto de la colocación de implantes de melatonina tras el parto en ovejas de raza Rasa Aragonesa. Proc XXVII SEOC Congress, Valencia, Spain, Sep 20-22. pp. 961-965.
- Acritopoulou, S., Haresign, W., 1980. Response of ewes to a single injection of an analogue of PGF-2<sub>α</sub> given at different stages of the oestrous cycle. J. Reprod. Fertil. 58, 219–221.
- Adams, H. Richard (2001). Veterinary pharmacology and therapeutics
- Allen WM (1935). «The isolation of crystalline progestin». Science 82 (2118): pp. 89–93.
- Allen WM (1935). «The isolation of crystalline progestin». Science 82 (2118): pp. 89–93.
- Al-Maully, N.Z.N., Bryant, M.J., Cunningham, F.J., 1991. Effect of the introduction of rams on the pulsatile release of luteinizing hormone and the onset of reproductive activity in ewe lambs. Anim. Prod. 53, 209–214.
- Applezweig N (1969). «Steroids». Chem Week 104: pp. 57–72.
- Aquirre Solis, Wellington. 2003. Terapia en endocrinología reproductiva. Quito: Impresión Arate.
- Arendt A Symons AM Laud CA Pryde SJ 1983 Melatonin can induce early onset of the breeding season in ewes. Journal of Endocrinology 97 395-400.
- Aristóteles. Reproducción de los Animales. Gredos. 1994.
- Arrebola F.A., Abecia J.A., Forcada F., García A., Martín R.A., Mesa O., 2009. Effects of annual rainfall and farm on lamb production after treatment with melatonin implants in Merino sheep: a 4-year study. NZ Vet J 57, 141-145.



- 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.
- Atkinson, S., Williamson, P., 1985. Ram-induced growth of ovarian follicles and gonadotrophin inhibition in anoestrous ewes. *J. Reprod. Fertil.* 73, 185–189.
- Barrett DMW, Bartlewski PM, Cook SJ, et al. Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to PGF2a given at different stages of the luteal phase in ewes. *Theriogenology* 2002;58:1409–24.
- Barrett, D.M.W., Bartlewski, P.M., Cook, S.J., Rawlings, S.C., 2002. Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to PGF2\_ given at different stages of the luteal phase in ewes. *Theriogenology* 58, 1409–1424.
- Bartlewski PM, Beard AP, Cook SJ, Chandolia RK, Honaramooz A, Rawlings NC (1999). Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. *J Reprod Fertil.* 115:111-124.
- Bartlewsky, P.M., Beard, A.P., Cook, S.J., Chandolia, R.K., Honaramooz, A., Rawlings, N.C., 1999. Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. *J. Reprod. Fertil.* 115, 111–124.
- Battaglia, D.F., Krasa, H.B., Padmanabhan, V., Vigue, C., Karsch, F.J., 2000. Endocrine alterations that underlie endotoxin-induced disruption of the follicular phase in ewes. *Biol. Reprod.* 62, 45–53.
- Bertrand F Vigue C Picard S Malpau B 1998 Median eminence dopaminergic activation is critical for the early long-day inhibition of lutealizing hormone secretion in the ewe. *Endocrinology* 139 5094-5102.
- Boland, M.P., Gordon, I.R., Kelleher, D.L., 1978. The effect of treatment by prostaglandin analogue (ICI-80996) or progestagen (SC-9880) on ovulation and fertilization in cyclic ewes. *J. Agric. Sci.* 91, 727–730.

- Braden WH, Lamond R, Radford M. Control of the time of ovulation in sheep. *J Agric Res* 1960;11:389–401.
- Breen, K.M., Karsch, F.J., 2006. New insights regarding glucocorticoids, stress and gonadotropin suppression. *Front. Neuroendocrinol.* 27, 233–245.
- Butenandt A, Westphal U (1934). «Zur Isolierung und Charakterisierung des Corpusluteum-Hormons». *Berichte Deutsche chemische Gesellschaft* 67: pp. 1440–1442.
- Butenandt A, Westphal U (1934). «Zur Isolierung und Charakterisierung des Corpusluteum-Hormons». *Berichte Deutsche chemische Gesellschaft* 67: pp. 1440–1442.
- Carles A. B. And Kipngeno W. A. K. The effect of season and the introduction of rams on oestrous activity in Somali, Nandi, Merino, Karakul and New Zealand Romney Marsh ewes in Kenya. *Animal Production* (1986), 43 : pp 447-457
- Carpentieri, Díaz de Barboza, Areco, Peralta López, Tolosa de Talamoni. New perspectives in melatonin uses. *Pharmacological Research* 65. 2012. 437– 444
- Cassone VM, Natesan AK. Time and time again: the phylogeny of melatonin as a transducer of biological time. *J Biol Rhythms* 1997;12:532–4.
- Chemineau P, Malpoux B, Pelletier J, et al. Emploi des implants de mélatonine et des traitements photopériodiques pour maîtriser la reproduction saisonnière chez les ovins et les caprins. *INRA Prod Anim* 1996;9:45–60.
- Chemineau, Malpoux, Delgadillo, Guérin, Ravault, Thimonier . Control of sheep and goat reproduction: Use of light and melatonin. *Animal Reproduction Science*. 30-1. P157-184. 1992
- Cohen-Tannoudji J, Signoret JP. Effect of short exposure to the ram on later reactivity of anoestrous ewes to the male effect. *Anim Reprod Sci* 1987;13:263–8.

- Contreras-Solis I, Vasquez B, Diaz T, et al. Efficiency of estrous synchronization in tropical sheep by combining short-interval cloprostenol-based protocols and “male effect”. *Theriogenology* 2009;71:1018–25.
- Contreras-Solis I, Vasquez B, Diaz T, et al. Efficiency of estrous synchronization in tropical sheep by combining short-interval cloprostenol-based protocols and “male effect”. *Theriogenology* 2009;71:1018–25.
- Cushwa WT, Bradford GE, Stabenfeldt GH, Berger YM, Dally MR. Ram influence on ovarian and sexual activity in anestrus ewes: effects of isolation of ewes from rams before joining and date of ram introduction. *J Anim Sci* 1992;70:1195–200.
- Daniel JA, Sterle SW, McFadin-Buff EL, et al. Breeding ewes out-of-season using melengestrol acetate, one injection of progesterone, or a controlled internal drug releasing device. *Theriogenology* 2001;56:105–10.
- Deaver DR, Stilley NJ, Dailey RA, et al. Concentrations of ovarian and pituitary hormones following prostaglandin F2 $\alpha$ -induced luteal regression in ewes varies with day of the estrous cycle at treatment. *J Anim Sci* 1986;62:422–7.
- Deaver, D.R., Stilley, N.J., Dailey, R.A., Inskeep, E.K., Lewis, P.E., 1986. Concentrations of ovarian and pituitary hormones following prostaglandin F2 $\alpha$ -induced luteal regression in ewes varies with day of the estrous cycle at treatment. *J. Anim. Sci.* 62, 422–427.
- Dobson, H., 1988. Effect of stress during shearing on the LH response to GnRH in anoestrous ewes. *J. Agric. Sci. (Cambridge)* 110, 673–676.
- Dobson, H., Smith, R.F., 1998. Stress and subfertility. *Reprod. Domest. Anim.* 33, 107–111.
- Donovan, A., O’Callaghan, D., Boland, M.P., Karsch, F.J., Roche, J.F., 1991. The relative importance of social signals from ewes and rams in influencing the timing of the breeding season of ewes. *J. Reprod. Fertil. Abstr. Series* 7, 30.

- Douglas, R.H., Ginther, O.J., 1973. Luteolysis following a single injection of PGF<sub>2</sub> in sheep. *J. Anim. Sci.* 37, 990–993.
- Dubocovich ML, Rivera-Bermudez MA, Gerdin MJ, Masana MI. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. *Front Biosci* 2003;8:1093–108.
- Dutt RH, Casida LE. Alteration of the estrual cycle in sheep by use of progesterone and its effects upon subsequent ovulation and fertility. *Endocrinology* 1948;43:208–17.
- Eloy, A.M.X., Simplicio, A.A., Foote, W.C., 1990. Reproduction in sheep. In: Shelton, W., Figueredo, E.A.P. *Hair Sheep Production in Tropical and Subtropical Regions*. United States Agency for International Development, Davis, CA, pp. 97–111.
- Espinoza, Henry, Charlotte Ellertson, Sandy Garcia, Raffaella Schiavon, Ana Langer. 2002. Medicamentos para la interrupcion de la gestacion: una revision de la literatura y sus posibles implicaciones para Mexico America Latina. *Gaceta De* . 138 (4): 347-356.
- Evans ACO, Duffy P, Crosby TF, et al. Effect of ram exposure at the end of progestagen treatment on estrus synchronization and fertility during the breeding season in ewes. *Anim Reprod Sci* 2004;84:349–58.
- Fletcher, I.C., Lindsay, D.R., 1971. Effect of rams on the duration of oestrous behaviour in ewes. *J. Reprod. Fertil.* 25, 252–259.
- Folch, F., 1990. Utilizacion practica del ‘efecto macho’ para la provocacion de celos y ovulaciones en ganado ovino. *Inform. Tecn. Econom. Agric.* 86A (3), 145–163.
- Forcada F, Abecia JA, Zuñiga O, et al. Variation in the ability of melatonin implants inserted at two different times after the winter solstice to restore reproductive activity in reduced seasonality ewes. *Aust J Agric Res* 2002;53:167–73.

- Forcada F, Zarazaga L, Abecia JA. 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* 1995;43:1179–93.
- Ginther OJ, Kot K, Wiltbank MC (1995). Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. *Theriogenology* 43: 689-703.
- Ginther, O.J., Kot, K., Wiltbank, M.C., 1995. Association between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. *Theriogenology* 43, 689–703.
- Girard L. Moyens employés avec succès, par M. Morel de Vindé, Membre de la Société d'Agriculture de Seine et Oise, pour obtenir, dans le temps le plus court possible, la fécondation du plus grand nombre des brebis portières d'un trou peau. In: *Ephémérides de la Société d'Agriculture du Département de l'Indre pour l'An 1813, Séance du 5 septembre, Chateauroux. France: Département de l'Indre, Cahier VII; 1813. p. 66–8.*
- Godfrey, R.W., Collins, J.R., Hensley, E.L., Wheaton, J.E., 1999. Estrus synchronization and artificial insemination of hair sheep in the tropics. *Theriogenology* 51, 985–997.
- Godfrey, R.W., Gray, M.L., Collins, J.R., 1997. A comparison of two methods of oestrous synchronisation of hair sheep in the tropics. *Anim. Reprod. Sci.* 47, 99–106.
- Gonzalez Merio S. Producción hormonal en el ovario. *Ginecología I. La Habana: Editorial de Ciencias Médicas; 2007. P. 58.*
- Gonzalez-Bulnes, A., Veiga-Lopez, A., Garcia, P., Garcia-Garcia, R.M., Ariznavarreta, C., Sanchez, M.A., Tresguerres, J.A.F., Cocero, M.J., Flores, J.M., 2005. Effects of progestagens and prostaglandin analogues on ovarian function and embryo viability in sheep. *Theriogenology* 63, 2523–2534.
- Goodman A, Hodgen GD. 1983. The ovarian triad of the primate menstrual cycle. *Recent Prog Horm Res* 39:1-73.

- Goodman RL & Inskeep EK 2006 Neuroendocrine control of the ovarian cycle of sheep. In Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, 3 edn, pp 2389–2447. Ed. JD Neill. Amsterdam: Elsevier.
- Goodman RL, Gibson M, Skinner DC, Lehman MN (2002) Neuroendocrine control of pulsatile gnRH secretion during the ovarian cycle: evidence from ewe. *Reprod. Suppl.* 59: 41-56.
- Gordon IR. Controlled reproduction in sheep and goats. Oxford (UK): CAB International; 1996. p. 480.
- Gordon, Ian R. (2004). Reproductive technologies in farm animals
- Gore-Langton RE & Armstrong DT 1994 Follicular steroidogenesis and its control. In *The Physiology of Reproduction*, vol 1, pp 571–628. Eds E Knobil & JD Neill. New York: Raven Press.
- Hansel, W. And E. M. Coney. 1983. Physiology of the estrous cycle. *J. Anim. Sci.* 57(Suppl 2):404..
- Hardeland R, Pandi-Perumal SR, Cardinali DP. Melatonin. *Int J Biochem Cell Biol* 2006;38:313–6.
- Haresign W, Peters AR, Staples LD. The effect of melatonin implants on breeding activity and litter size in commercial sheep flocks in the UK. *Anim Prod* 1990;50:111–21.
- Hartmann M, Wettstein A (1934). «Ein krystallisiertes Hormon aus Corpus luteum». *Helvetica Chimica Acta* 17: pp. 878–882.
- Hawken PAR, Beard AP. Ram novelty and the duration of ram exposure effects the distribution of mating in ewes exposed to rams during the transition into the breeding season. *Anim Reprod Sci* 2009;111:249–60.
- Hawken, P.A.; Beard, A.P.; Esmaili, T.; Kadokawa, H. Evans, A.C.; Blache, D. and Martin, G.B. 2007. The introduction of rams induces an increase in pulsatile
- Haynes, N.B., Haresign, W., 1987. Endocrine aspects of reproduction in the ram important to the male effect. *World Rev. Anim. Prod.* 23, 21–28.

- Hiendleder, S. et al. (2002) Molecular analysis of wild and domestic sheep questions current nomenclature and provides evidence for domestication from two different subspecies
- Houghton, J.A.S., Liberati, N., Schrick, F.N., Townsend, E.C., Dailey, R.A., Inskeep, E.K., 1995. Day of estrous cycle affects follicular dynamics after induced luteolysis in ewes. *J. Anim. Sci.* 73, 2094–2101.
- Hulet, C.V., Blackwell, R.L., Ercanbrack, S.K., 1964. Observations on sexually inhibited rams. *J. Anim. Sci.* 23, 1095–1097.
- J. Alberto Delgadillo, Helene Gelez, Rodolfo Ungerfeld, Penelope Hawken, Graeme B. Martin. The 'male effect' in sheep and goats—Revisiting the dogmas. 2009. *Behavioural Brain Research* 200. 304–314
- Karsch FJ Bittman EL Foster DL Goodman RL Legan SJ Robinson JE 1984 Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. *Recent Progress in Hormone Research* 40 185-233.
- Karsch, F.J., Bittman, J.E., Foster, D.L., Goodman, R.L., Legan, S.J. and Robinson, J.E., 1984. Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. *Recent Prog. Horm. Res.*,40: 185-232.
- Kennedy. D. Out-of-Season Breeding Alternatives for Sheep. Factsheet. 2008
- Knight, T.W., 1983. Ram induced stimulation of ovarian and oestrous activity in anoestrous ewes—a review. *Proc. NZ Soc. Anim. Prod.* 43, 7–11.
- Le Corre, S., Chemineau, P., 1993. Control of photoperiodic inhibition of luteinizing hormone secretion by dopaminergic and serotonergic systems in ovariectomized Ile-de-France ewes supplemented with oestradiol. *J. Reprod. Fertil.* 97, 367–373.
- Legan SJ Karsch FJ Foster DL 1977 The endocrine control of seasonal reproductive function in the ewe: a marked change in response to the negative feedback action of estradiol on luteinizing hormone secretion. *Endocrinology* 101 818-821.
- Lerner AB, Case JD, Heinzelman RV. Structure of melatonin. *J Am Chem Soc* ,1959;81:6084–5.

- Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, et al. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc* 1958;80:2587.
- Levy F, Keller M, Poindron P. Olfactory regulation of maternal behavior in mammals. *Horm Behav* 2004;46:284–302.
- Leyva, V.; B.C. Buckrell; J.S. Walton. 1998. Regulation of follicular activity and ovulation in ewes by exogenous proges-tagen. *Theriogenology* 50: 395-416.
- LH secretion in cyclic ewes during the breeding season. *Theriogenology* 68: 56-66.
- Light, J.E., Silvia, W.J., Reid, R.C., 1994. Luteolytic effect of prostaglandin F2a and two metabolites in ewes. *J. Anim. Sci.* 72, 2718–2721.
- Lindsay, D. R. 1996. Environment and reproductive behaviour. *Anim Reprod. Sci.*, 42, 1-12.
- Lindsay, D.R., Cognie, Y., Pelletier, J., Signoret, J.P., 1975. Influence of the presence of rams on the timing of ovulation and discharge of LH in ewes. *Physiol. Behav.* 15, 423–426.
- Malpaux B, Viguie´ C, Skinner DC, et al. Control of the circannual rhythm of reproduction by melatonin in the ewe. *Brain Res Bull* 1997;44:431–8.
- Marshall, F.H.A. (1904) The oestrous cycle in the common ferret. *Quart. J. Microscop. Sci.* 48, 323-345.
- Martin GB, Tjondronegoro S, Boukhliq R, et al. Determinants of the annual pattern of reproduction in mature male Merino and Suffolk sheep: modification of endogenous rhythms by photoperiod. *Reprod Fertil Dev* 1999;11:355–66.
- Martin, G. B.; Oldham, C. M.; Cognie, Y.; Pearce, D. T. 1986. The physiological responses of
- Martin, G.B., Cognie, Y., Gayerie, F., Oldham, C.M., Poindron, P., Scaramuzzi, R.J., Thiéry, J.C., 1980b. The hormonal response to teasing. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.* 13, 77–79.



- Martin, G.B., Oldham, C.M., Cognie, Y., Pearce, D.T., 1986. The physiological responses of anovulatory ewes to the introduction of rams: a review. *Livest. Prod. Sci.* 15, 219–247.
- Martin, G.B., Oldham, C.M., Lindsay, D.R., 1980a. Increased plasma LH levels in seasonally anovular Merino ewes following the introduction of rams. *Anim. Reprod. Sci.* 3, 125–132.
- Martin, G.M., Oldham, C.M., Cognie, Y., Pearce, D.T., 1986. The physiological responses of anovulatory ewes to the introduction of rams—a review. *Live. Prod. Sci.* 15, 219–247.
- Mauléon, P., Dautier, L., 1965. Variations de durée de l'anoestrus de lactation chez les brebis de race Ile-de-France. *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.* 5, 131–141.
- McCracken, J.A., Carlson, J.C., Glew, M.E., Goding, J.R., Baird, D.T., Green, K., Samuelsson, B., 1972. Prostaglandin F<sub>2</sub> identified as a luteolytic hormone in sheep. *Nat. New Biol.* 238, 129–134.
- McMillan WH, Sealey RC. Do melatonin implants influence the breeding season in Coopworth ewes? In: *Proceedings of meetings of the New Zealand Society of Animal Production*; 1989. p. 43–6.
- Mellisho, E. 2010. *Manuel de laboratorio de Reproducción Animal*.
- Menchaca A, Miller V, Gil J, et al. Prostaglandin F<sub>2</sub> treatment associated with timed artificial insemination in ewes. *Reprod Domest Anim* 2004;39:352–5.
- Menchaca A, Miller V, Salveraglio V, et al. Endocrine, luteal and follicular responses after the use of the short-term protocol to synchronize ovulation in goats. *Anim Reprod Sci* 2007;102:76–87.
- Misztal T., Romanowicz K., Barcikowski B. Melatonin - a modulator of the GnRH/LH axis in sheep. *Reproductive Biology*. 2002. Vol 2, Num. 3.:267-275.
- Muir, P.D., Smith, N.B., Wallace, G.J., 1989. Early lambing in Hawkes Bay: use of the ram effect. *Proc. NZ Soc. Anim. Prod.* 49, 271–275.

- Murtagh, J.J., Gray, D.R., Lindsay, D.R., Oldham, C.M., Pearce, D.T., 1984. The effect of the presence of rams on the continuity of ovarian activity of maiden Merino ewes in Spring. In: Lindsay, D.R., Pearce, D.T. (Eds.), *Reproduction in Sheep*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 37–38.
- Navarro L y Torres A. Duración, frecuencia e incidencia natural del estro en ovejas west african en la mesa de guanipa. *Zootecnia tropical* Vol. 2(1y2):39-49.1985
- Notter, D.R., 1989. Effects of continuous ram exposure and early spring lambing on initiation of the breeding season in yearling crossbred ewes. *Anim. Reprod. Sci.* 19, 265–272.
- Nowak, R., Rodway, R.G., 1985. Effect of intravaginal implants of melatonin on the onset of ovarian activity in adult and prepubertal ewes. *J. Reprod. Fertil.* 74, 287–293.
- O'Mary CC, Pope AL, Casida LE. Effect on their subsequent lambing records of the estrual periods in a group of ewes and the use of progesterone in the synchronization. *J Anim Sci* 1950;9:499–503.
- Oldham, C.M., Cognie, Y., 1980. Do ewes continue to cycle after teasing? *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.* 13, 82–85.
- Ortavant, R., Bocquier, F., Pelletier, J., Ravault, J.P., Thimonier, J. & Volland-Nail, P. (1988) Seasonality of reproduction in sheep and its control by photoperiod. *Aust. J. bio! Sci.* 41, 69-85.
- Palacin I, Forcada F and Abecia JA. Meta-analysis of the efficacy of melatonin implants for improving reproductive performance in sheep. *Spanish Journal of Agricultural Research* 2011 9(3), 730-743
- Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJ, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R. Melatonin: nature's most versatile biological signal. *FEBS J* 2006;273:2813–38.
- Parsons, S.D., Hunter, G.L., 1967. Effect of the ram on duration of oestrus in the ewe. *J. Reprod. Fertil.* 14, 61–70.

- Pearce DT, Oldham CM. Importance of non-olfactory stimuli in mediating ram induced ovulation in the ewe. *J Reprod Fertil* 1988;84:333–9
- Pearce, D.T., Oldham, C.M., 1984. The ram effect, its mechanism and application to the management of sheep—a review. In: Lindsay, D.R., Pearce, D.T. (Eds.), *Reproduction in Sheep*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 26–34.
- Peluso, J. Rapid actions of progesterone on granulosa cells. *Steroids* 69 (2004) 579–583
- Phogat, J.B., Smith, R.F., Dobson, H., 1999. Effect of transport on pituitary responsiveness to exogenous pulsatile GnRH and oestradiol-induced LH release in intact ewes. *J. Reprod. Fertil.* 116, 9–18.
- Poindron, P., Cognie, Y., Gayerie, F., Orgeur, P., Oldham, C.M., Ravault, J.P., 1980. Changes in gonadotrophins and prolactin levels in isolated (seasonally or lactationally) anovular ewes associated with ovulation caused by introduction of rams. *Physiol. Behav.* 25, 227–236.
- Powell MR, Kaps M, Lamberson WR, et al. Use of melengestrol acetate-based treatments to induce and synchronize estrus in seasonally anestrous ewes. *J Anim Sci* 1996;74:2292–302.
- Price, E.O., Katz, L.S., Wallach, J.R., Zenchak, J.J., 1988. The relationship of male–male mounting to the sexual preferences of young rams. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 21, 347–355.
- Reiter RJ, Tan DX, Maldonado MD. Melatonin as an antioxidant: physiology versus pharmacology. *J Pineal Res* 2005;39:215–6
- Ritar AJ, Maxwell WMC, Salamon S. Ovulation and LH-secretion in the goat after intravaginal progestagen sponge PMSG treatment. *J Reprod Fertil* 1984;72: 59–63.
- Robinson TJ. Use of progestagen-impregnated sponges inserted intravaginally or subcutaneously for control of oestrous cycle in sheep. *Nature* 1965;206:39–41.

- Rosa HJ, Juniper DT, Bryant MJ. Effects of recent sexual experience and melatonin treatment of rams on plasma testosterone concentration, sexual behaviour and ability to induce ovulation in seasonally anoestrous ewes. *J Reprod Fertil* 2000;120:169–76.
- Rosa HJD and Bryant MJ. 2002. The “ram effect” as a way of modifying the reproductive activity in the ewe. *Small Ruminant Research* 45. 1-16
- Rubianes, E., Menchaca, A., Carbajal, B., 2003. Response of the 1–5 day aged ovine corpus luteum to prostaglandin F2<sub>α</sub>. *Anim. Reprod. Sci.* 78, 47–55.
- Saifullizam, A.K., Routly, J.E., Smith, R.F., Dobson, H., 2010. Effect of insulin on the relationship of estrous behaviors to estradiol and LH surges in intact ewes. *Physiol. Behav.* 99, 555–561.
- Sanford, L.M., Palmer, W.M., Howland, B.E., 1974. Influence of sexual activity on serum levels of LH and testosterone in the ram. *Can. J. Anim. Sci.* 54, 579–585.
- Shelton M. The influence of the presence of the male on initiation of oestrus cycling and ovulation in Angora does. *J Anim Sci* 1960;19:368–75.
- Signoret, J.P., Fulkerson, W.J., Lindsay, D.R., 1982. Effectiveness of testosterone-treated wethers and ewes as teasers. *Appl. Anim. Ethol.* 9, 37–45.
- Slotta KH, Ruschig H, Fels E (1934). «Reindarstellung der Hormone aus dem Corpus luteum». *Berichte Deutsche chemische Gesellschaft* 67: pp. 1270–273.
- Southcott WH, Braden AWH, Moule GR. Synchronization of oestrus in sheep by orally active progesterone derivative. *Aust J Agric Res* 1962;139:901–6.
- Sunderland, S.J., O’Callaghan, D., Boland, M.P., Roche, J.F., 1990. Social cues can alter the timing of reproductive transitions in ewes. *J. Reprod. Fertil. Abstr. Series* 5, 28.
- Tan DX, Manchester LC, Sainz RM, Mayo JC, Leon J, Hardeland R, et al. Interaction between melatonin and nicotinamide nucleotide: NADH preservation in cells and in cell-free systems by melatonin. *J Pineal Res* 2005;39:185–94.

- Viguié C, Thibault J, Thie´ry JC, et al. Characterization of the short day-induced decrease in median eminence tyrosine hydroxylase activity in the ewe: temporal relationship with the changes in LH and prolactin secretion and short day-like effect of melatonin. *Endocrinology* 1997;138:499–506.
- Viguié, C., Caraty, A., Locatelli, A., Malpoux, B., 1995. Regulation of LHRH secretion by melatonin in the ewe. I. Simultaneous delayed increase in LHRH and LH pulsatile secretion. *Biol. Reprod.* 52, 1114–1120.
- Vin˜oles C, Rubianes E. Origin of the preovulatory follicle after induced luteolysis during the early luteal phase in ewes. *Can J Anim Sci* 1998;78:429–31.
- 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. *J. Reprod. Fertil.* 92:21-31.
- Wildeus, S. . Current concepts in synchronization of estrus: Sheep and goats. *Proc. Am. Soc. Anim. Sci.* 1999
- Yeates, N.T.M., 1949. The breeding season of the sheep with particular reference to its modification by artificial means using light. *J. Agric. Sci.* 39, 1–43.
- Zarco, L., Rodr´ıguez, E.F., Angulo, M.R.B., Valencia, J., 1995. Female to female stimulation of ovarian activity in the ewe. *Anim. Reprod. Sci.* 39, 251–258.
- Zohary, D.; Tchernov, E.; Kolska Horwitz, L. (1998), «The role of unconscious selection in the domestication of sheep and goats», *Journal of Zoology* 245 (2): 129-135