



Facultad de Veterinaria  
**Universidad** Zaragoza



# Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria

---

1. RESUMEN	2
2. INTRODUCCIÓN	3
1. El calostro	3
2. Composición del calostro	4
3. Factores que afectan a la composición del calostro	6
4. La absorción del calostro	8
5. Efectos del calostro	9
6. La glándula mamaria	9
7. La melatonina	10
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	14
3. MATERIAL Y MÉTODOS	14
1. Animales y procedimientos experimentales	14
2. Cuantificación de inmunoglobulinas mediante sándwich ELISA	16
3. Cuantificación de proteína bruta y porcentajes de grasa en calostro	16
4. Análisis estadístico	16
5. RESULTADOS	17
6. DISCUSIÓN	19
7. CONCLUSIONES	21
8. VALORACIÓN PERSONAL	22
9. BIBLIOGRAFÍA	24

## 1. RESUMEN

Se utilizaron sesenta ovejas preñadas para evaluar los efectos del tratamiento con melatonina durante la gestación, el tamaño de la camada y el sexo de los corderos sobre la calidad del calostro. Un grupo de animales recibió un implante de melatonina en el tercer mes de gestación (3M, n = 13), otro grupo en el cuarto mes (4M, n = 18) y las ovejas restantes no recibieron implante (Control, C, n = 29).

Inmediatamente después del parto, se recogió una muestra de calostro. La media de peso vivo del cordero, la temperatura rectal al nacer, y la tasa de mortalidad no difirió significativamente entre los grupos. El momento de la implantación de melatonina ( $P < 0,001$ ) y el sexo de la descendencia ( $P < 0,01$ ) tuvo un efecto significativo sobre la concentración de IgG. El calostro de las ovejas que recibieron un implante de melatonina tenía una concentración de IgG media más alta ( $\pm$  SEM) que el de las ovejas control ( $191.31 \pm 14.45$  y  $166.61 \pm 12.22$  mg/ml, respectivamente;  $P < 0.05$ ), principalmente porque la concentración en el grupo 4M fue significativamente mayor ( $P < 0,001$ ) que en los grupos 3M y C. El momento de la implantación tuvo un efecto significativo en el % de FAT, las ovejas 3M tuvieron valores significativamente más altos ( $P < 0.05$ ) que los de los grupos Control y 4M. La relación entre el cordero y la IgG ( $P < 0.01$ ), % PB ( $P < 0.05$ ) y % FAT ( $P = 0.11$ ) fue evidente en corderos únicos (ovejas con un cordero macho:  $225.31 \pm 23.59$  mg IgG/ml,  $59.68 \pm 2.72\%$  PB,  $19.49 \pm 2.90\%$  FAT; ovejas con cordero:  $135.36 \pm 15.92$  mg/ml,  $53.10 \pm 2.17\%$  PB,  $26.00 \pm 2.69\%$  FAT). La presencia de una hembra en la camada se asoció con niveles de IgG de calostro más bajos ( $P < 0.01$ ) (camadas con al menos una hembra:  $161.50 \pm 10.39$  mg/ml; camadas sin hembras:  $207.81 \pm 17.04$  mg/ml). En el grupo de Control, la presencia de un feto hembra se asoció significativamente ( $P < 0.01$ ) con las concentraciones de IgG en aquellas ovejas que solo tenían un cordero. Entre las ovejas 4M, los fetos hembras tuvieron niveles de IgG significativamente más bajos ( $P < 0.01$ ), ya sea que tuvieran un cordero o corderos múltiples. En conclusión, el tratamiento con implantes de melatonina en el cuarto mes de gestación resultó en una mayor calidad de calostro basada en la concentración de IgG.

## SUMMARY

Sixty pregnant sheep were used to assess the effects of melatonin treatment during pregnancy, litter size and sex of lambs on colostrum quality. One group of animals received a melatonin implant in the third month of gestation (3M, n = 13), another group in the fourth month (4M, n = 18) and the remaining sheep did not receive an implant (Control, C, n = 29).

Immediately after delivery, a colostrum sample was collected. The average live weight of the lamb, the rectal temperature at birth, and the mortality rate did not differ significantly between the groups. The timing of melatonin implantation ( $P < 0.001$ ) and the sex of the offspring ( $P < 0.01$ ) had a significant effect on the concentration of IgG. Colostrum of sheep that received a melatonin implant had a higher average IgG concentration ( $\pm$  SEM) than that of control sheep ( $191.31 \pm 14.45$  and  $166.61 \pm 12.22$  mg/ml, respectively;  $P < 0.05$ ), mainly because the concentration in the 4M group was significantly higher ( $P < 0.001$ ) than in the 3M

and C groups. The moment of implantation had a significant effect on the % FAT, and the 3M sheep had significantly higher values ( $P < 0.05$ ) than those of the Control and 4M groups. The relationship between lamb and IgG ( $P < 0.01$ ), % CP ( $P < 0.05$ ) and % FAT ( $P = 0.11$ ) was evident in singletons (sheep with a male lamb:  $225.31 \pm 23.59$  mg IgG/ml,  $59.68 \pm 2.72\%$  CP,  $19.49 \pm 2.90\%$  FAT; sheep with lamb:  $135.36 \pm 15.92$  mg/ml,  $53.10 \pm 2.17\%$  CP,  $26.00 \pm 2.69\%$  FAT). The presence of a female in the litter was associated with lower levels of colostrum IgG ( $P < 0.01$ ) (litters with at least one female:  $161.50 \pm 10.39$  mg/ml; litters without females:  $207.81 \pm 17.04$  mg/ml). In the Control group, the presence of a female fetus was significantly associated ( $P < 0.01$ ) with IgG concentrations in those sheep that only had one lamb. Among 4M sheep, female fetuses had significantly lower IgG levels ( $P < 0.01$ ), whether they had singletons or multiple lambs. In conclusion, treatment with melatonin implants in the fourth month of pregnancy resulted in a higher quality of colostrum based on the concentration of IgG.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 1. *El calostro*

El calostro es el primer producto secretado por la glándula mamaria, que difiere de la leche en su densidad, color, composición y es ligeramente mas ácido (pH de 6.4).

El calostro se produce antes del parto, en un proceso llamado colostrogénesis, que es la transferencia de componentes del torrente sanguíneo materno, principalmente inmunoglobulinas (Ig), a las secreciones mamarias y se produce durante un tiempo finito dentro del período pre-parto. En rumiantes domésticos, la colostrogénesis comienza varias semanas antes del parto y cesa inmediatamente antes del parto. Durante este periodo se transfieren hasta 500 gramos por semana de IgG a las secreciones mamarias. Los corderos recién nacidos dependen de las inmunoglobulinas maternas y otras sustancias del calostro para su protección, debido a la falta de transferencia de estas a través de la placenta sindesmocorial. En caso de fracaso en la transferencia pasiva de inmunoglobulinas maternas, los neonatos tienen mayor riesgo de contraer infecciones. (Barrington y Parish, 2001 ).

La ingestión del calostro también es importante porque participa en la regulación de la temperatura corporal de los recién nacidos y debido a su alto contenido en magnesio que activa la peristalsis y promueve la expulsión del meconio, evitando la colonización bacteriana de la mucosa intestinal (García de Jalón et al. 1990; Barza et al. 1993).

La raza, la edad, la nutrición, el tamaño de la camada, la duración del período seco y el estado de salud pueden afectar la composición del calostro (Lérias et al., 2014); sin embargo, poco se sabe sobre el uso de tratamientos exógenos para mejorar la calidad del calostro.

## 2. Composición del calostro

El calostro contiene 19 aminoácidos exógenos (valina, leucina, prolina, lisina, cistina, cisteína, etc.) (Molik et al., 2012) y una mezcla compleja de diversos componentes, como grasa (10-13%), lactosa (2-3%), vitaminas y minerales con alta importancia nutricional para el recién nacido (Ontsouka et al. 2003; Hernández-Castellano et al. 2014a, b). Además de su función nutricional, el calostro también contiene proteínas (10%) que participan activamente en la protección del neonato contra los patógenos, las inmunoglobulinas. Las inmunoglobulinas más importantes presentes en el calostro son IgG, IgM e IgA, siendo la primera la más abundante, ya que comprende más del 85% de la inmunoglobulina total del calostro. El transporte de IgG al calostro requiere de unos receptores específicos para IgG en la membrana plasmática basal de las células secretoras mamarias y además, estas deben ser capaces de internalizar y transitar la IgG a las secreciones luminales. La transferencia de IgG se produce durante la formación del calostro pero no durante la lactancia, por lo que la actividad del receptor de IgG está temporalmente relacionado con la lactogénesis en estadio I (Barrington y Parish, 2001).

Sin embargo, el calostro no es solo importante por su contenido en inmunoglobulinas, sino también por las proteínas no inmunoglobulínicas que juegan un papel fundamental en la activación y atracción de las células inmunes, entre otras cosas. También se ha observado la relación de diferentes proteínas de las tres fracciones de calostro (caseína, proteínas del suero y membrana de los glóbulos grasos de la leche) con la protección del neonato. La proteómica es el campo de la ciencia que estudia el proteoma, es decir, el conjunto de proteínas que se expresan en un tejido, órgano, organismo o fluido. En cuanto al calostro, la proteómica se ha utilizado para caracterizar los cambios de proteínas en la transición del calostro a la leche en el ganado y también para determinar los procesos proteolíticos en el estómago e intestino del neonato (Lorento et al., 2014). Dos de las proteínas más importantes relacionadas con la inmunidad son la mucina-1 (MUC-1) y la xantina deshidrogenasa/oxidasa (XDH/XO).

La MUC-1 es una glucoproteína que está presente en la superficie apical de las células de diferentes órganos, como los pulmones, el estómago, el intestino, etc. En cuanto a su función biológica, esta proteína puede desempeñar un papel importante en la protección de las superficies expuestas del daño físico y los microorganismos patógenos invasivos. Además, puede participar en la respuesta inmune del recién nacido debido a su capacidad de unión y secuestro de microorganismos patógenos en la luz intestinal.

Con respecto a XDH/XO, se sintetiza en la glándula mamaria y alcanza valores máximos al final de la gestación e inmediatamente después del parto y desempeña funciones estructurales y funcionales en la formación de la membrana de los glóbulos grasos y también tiene propiedades antibacterianas en el calostro y la leche, proporcionando una fuente de  $H_2O_2$  para la lactoperoxidasa (Bjorck y Cleasson, 1979).

Las proteínas del suero, como la lactoalbúmina, se asocia a la regulación de la producción de lactosa (Kleinberg et al., 1984). La función de la lactoferrina es la unión y el transporte de iones de hierro y también funciona como un factor inmune innato sintetizado por el epitelio mamario (Sánchez et al., 1992), que proporciona actividad antimicrobiana (bactericida y fungicida) a la glándula mamaria y también al neonato.

Respecto a la caseína, hay cuatro tipos principales ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ ), que son responsables de importantes funciones biológicas como portadores de iones, precursores de péptidos bioactivos e inmunomoduladores (Korhonen y Pihlanto, 2007). Los fragmentos proteolíticos de la caseína tienen actividad antimicrobiana (Lahov y Regelson, 1996).

La plasmina es una enzima fibrinolítica que se ha aislado en el calostro y la leche, además de en la sangre, y tiene actividad inmune, ya que contribuye a la migración de neutrófilos. El inhibidor de la tripsina, o alfa-1-antitripsina, es una proteína que reduce la tripsina biológicamente activa (Rawlings et al., 2004), disminuyendo la proteólisis, permitiendo que el rumiante recién nacido absorba los componentes inmunes intactos a través de la barrera intestinal.

Los péptidos antimicrobianos se definen como tales por su capacidad para inactivar rápidamente agentes infecciosos (Zasloff, 2002). La mayoría de péptidos antimicrobianos actúan interrumpiendo la integridad de las membrana microbianas. Las dos familias principales en mamíferos son las defensinas (Paredi et al., 2012) y otro grupo de moléculas catiónicas clasificadas como péptidos de catelicidina (Zaiou et al. 2002). Las defensinas son un grupo de péptidos que interactúan con la respuesta inmune adaptativa (Yang et al., 2002). Estos péptidos se producen en respuesta a productos microbianos o citocinas proinflamatorias (Ganz y Lehrer, 1998). La familia de catelicidinas cumple una función crítica en la defensa inmune innata de los mamíferos contra la infección bacteriana invasiva (Nizet et al., 2001). Su mecanismo está mediado por el reconocimiento de patrones moleculares en la superficie microbiana y afectando a su integridad (Gennaro y Zanetti, 2000).

Estos factores no inmunoglobulínicos del calostro varían según la especie, el momento de la lactación y diversas condiciones fisiológicas e individuales. Además de los mencionado anteriormente, se encuentran cuatro tipos de células en las secreciones mamarias, que incluyen linfocitos, neutrófilos, macrófagos y células epiteliales. Los linfocitos representan el 20 - 25% del total de células en la secreción mamaria en ovejas. Estos se originan en los ganglios linfáticos mesentéricos. Los linfocitos T son mayoritarios que los linfocitos B en todas las etapas de la lactación. La principal función de los linfocitos B es sintetizar la inmunoglobulina A dimérica. Las células polimorfonucleares tienen funciones limitadas, que implican la migración y fagocitosis, por lo que se cree que su función principal es la defensa de la glándula mamaria y no la protección del recién nacido.

### *3. Factores que afectan a la composición del calostro*

El tamaño de la camada está relacionado con la cantidad de calostro acumulado en la ubre antes del parto. Las ovejas que paren más de un cordero generalmente producen más calostro que las ovejas que solo paren uno. Aunque las primeras no producen tanto calostro por cordero (Nowak y Poindron, 2006). La concentración de IgG es mayor en ovejas de parto múltiple que en animales con una sola cría (118,4 mg/ml frente a 98,7 mg/ml) (Csapó et al, 1994). El inicio de la lactogénesis en ovejas de parto múltiple puede ser más tardío, lo que implica que en el momento del parto las ovejas con corderos mellizos pueden tener menos calostro disponible para sus crías que las ovejas con corderos únicos.

Además, la viscosidad de ese calostro suele ser mayor que en ovejas con corderos únicos. Esto dificulta el amamantamiento y los corderos tienen que mamar más veces y utilizar más energía para lograr una cantidad adecuada a sus requerimientos. A su vez, los corderos mellizos nacen con menor peso que los corderos únicos y en consecuencia tienen menores reservas en forma de tejido adiposo (Mellor y Murray, 1985), por lo que, deben mamar lo antes posible para reponer la energía que gastan en generar calor para mantenerse, ponerse en pie, caminar e intentar mamar. Si las ovejas no tienen suficiente calostro o el calostro es muy espeso, las probabilidades de supervivencia de esos corderos disminuyen radicalmente.

La duración de la gestación está altamente correlacionada con la composición del calostro. Las ovejas con periodos cortos de gestación (146,9d) producen calostro menos concentrado en IgG (99,9 mg/ml) que las ovejas con periodos de gestación de 150 días (127,7 mg/ml) (Swanson et al, 2008).

La nutrición durante la gestación también afecta a la composición del calostro. Debido al útero grávido, durante la última etapa de la gestación el volumen del rumen es limitado porque está físicamente comprimido, lo que lleva a una reducción en la ingesta de alimentos.

La suplementación con Se (77 µg/kg de peso corporal) y una dieta que proporciona el 100% de los requerimientos dietéticos recomendados durante la gestación (NRC, 1985) aumentan el rendimiento del calostro, así como el contenido de grasa, lactosa y proteínas (Meyer et al, 2011).

La suplementación con maíz durante la última semana de gestación también aumenta la capacidad de producir calostro, particularmente en ovejas de parto múltiple y también aumenta el desarrollo de la ubre, tanto al final de la gestación como durante la lactación (Banchero et al, 2006). Esto se debe a que el maíz aporta glucosa que puede utilizarse en parte para el metabolismo intestinal (Nocek y Tamminga, 1991), ahorrando glucosa sintetizada endógenamente para la absorción mamaria y la síntesis de lactosa. La disponibilidad de glucosa también puede aumentarse mejorando la producción de ácido propiónico, el precursor principal de glucosa en rumiantes, o aumentando el suministro de glucosa post-ruminal (Knowlton et al., 1998). Además, existe una relación positiva entre la ingesta de energía y el flujo sanguíneo

hepático, ya que este último aumenta y eleva la tasa de extracción de progesterona en sangre, lo que acelera el inicio de la lactogénesis (Hartmann et al, 1973). El almidón presente en ambos granos (cebada o maíz) puede ser el responsable de la alta producción de calostro y la baja viscosidad del mismo observada en los animales suplementados. Parte del almidón se digiere en el rumen para producir ácido propiónico y luego en hígado se metaboliza a glucosa. Otra parte del almidón puede pasar a intestino y allí se digiere y convierte inmediatamente en glucosa. Esta glucosa, por la cual hay una altísima demanda en los últimos días de gestación, sería el principal sustrato para la lactosa que es el azúcar de la leche. La lactosa es muy importante en la síntesis de calostro, ya que es hidrocópica y es la responsable del volumen del mismo y por ende de la viscosidad.

En los sistemas de producción lechera es común el uso de dietas con alto contenido en concentrado para aumentar la producción de leche, pero los animales alimentados con este tipo de dietas pueden sufrir acidosis ruminal subaguda (Serment y Giger-Reverdin, 2012). Además, la nutrición puede afectar también a la apoptosis de la glándula mamaria, que afecta a la involución (Colitti et al, 2000).

Las ovejas desnutridas durante la gestación sufren una serie de efectos adversos como corderos de bajo peso al nacimiento y con mortalidad elevada, desarrollo reducido de la ubre y menor producción y calidad del calostro. Además, la mala nutrición se asocia con cantidad elevada de progesterona en el plasma al final de la gestación y una menor proporción de estradiol al nacimiento. La progesterona alta en el plasma se relaciona negativamente con la calidad del calostro y la producción de leche. Además, estas hormonas están implicadas en el inicio de la conducta materna, por lo que la nutrición al final de la gestación también influye en el comportamiento de la madre en relación a sus crías. La progesterona elevada en plasma puede contribuir al mal comportamiento materno y aumenta las probabilidades de abandono de los corderos (Nowak y Poindron, 2006).

Lo normal es que la concentración de progesterona en el plasma periférico durante la gestación sea alta, la mayor parte producida por la placenta, y caiga precipitadamente justo antes o inmediatamente tras el parto. En cambio, la concentración de estradiol y de lactosa en la secreción mamaria aumenta gradualmente al final de la gestación. El cambio en la proporción de progesterona y estradiol (P4/E2) es el principal determinante del parto, porque ambas hormonas tienen efectos opuestos sobre la sensibilidad del útero a las prostaglandinas, catecolaminas y oxitocina (Maltier et al., 1993). La progesterona no necesita desaparecer completamente de la circulación en el momento del parto, ya que el umbral de progesterona en el plasma para el inicio de la lactogénesis es de <1 ng/ml. Sin embargo, existe una gran variación en el tiempo del aumento inicial de la lactosa, lo que puede influir en la supervivencia de las crías. Cuanto más tardío es el aumento, más baja es la tasa de supervivencia (Hartmann et al, 1973). La tasa de disminución de progesterona también puede variar, por ejemplo en ovejas obesas, la retirada de progesterona se puede retrasar antes y durante el parto debido a la progesterona almacenada en el tejido adiposo (McCracken,



1964), las ovejas de parto múltiple producen más progesterona al tener dos placentas que las ovejas que solo paren un cordero (McNeill et al., 1998). La alimentación también influye en el aclaramiento metabólico de la progesterona, como se ha mencionado anteriormente. Alrededor del 96% de la progesterona que ingresa en el hígado y el intestino se elimina y los productos de descomposición se excretan en las heces (Parr et al., 1993b).

#### *4. La absorción del calostro*

Mientras que la transferencia de inmunoglobulinas desde la circulación materna hacia la glándula mamaria implica un proceso activo mediado por un receptor específico, la absorción del calostro por parte del neonato no es selectiva para isotipos de inmunoglobulinas específicos, debido a que no están presentes receptores específicos en el tracto intestinal.

La absorción se inicia por la presencia de macromoléculas y la eficiencia de la misma disminuye aproximadamente a las 24 horas de vida, independientemente de la presencia de macromoléculas (Barrington y Parish, 2001). Por lo tanto, los corderos absorben las inmunoglobulinas intactas del calostro ingerido solo durante el primer día de vida (Klobasa et al., 1986). El nivel de actividad proteolítica en el tracto digestivo de animales jóvenes es bajo y se reduce aún más por los inhibidores de tripsina presentes en el calostro (Tizard, 1992). Por lo tanto, las proteínas del calostro sin degradar alcanzan el intestino delgado donde son captadas por células epiteliales por micro-pinocitosis y pasan a través de los enterocitos hacia los vasos linfáticos y capilares intestinales (Khan y Khan, 1991a).

En un estudio realizado por O'Doherty y Crosby (1997) en el que se suplementaron las ovejas preñadas con ensilaje de pulpa de remolacha azucarera para investigar los factores que afectan al rendimiento y la calidad del calostro y la eficiencia absorción de la IgG. El nivel de IgG en el suero de los corderos aumentó linealmente al aumentar el consumo de IgG de calostro hasta 15g/kg de peso al nacer del cordero. Por lo que se concluyó que la suplementación pre-parto aumentó la eficiencia del cordero para absorber IgG calostro durante las primeras 24h, sobretodo si además se añadía harina de soja.

Las inmunoglobulinas alcanzan el nivel máximo en el primer día de vida del cordero, luego disminuyen durante las próximas 3 semanas (Smith et al., 1976). La disminución de las inmunoglobulinas maternas en el suero del cordero se superpone con el inicio de la síntesis de inmunoglobulinas endógenas. La vida media del anticuerpo derivado del calostro en el sistema del neonato es de entre 11.5 y 16 días. Las células del calostro, que atraviesan fácilmente la barrera intestinal neonatal y se distribuyen sistémicamente, no se ha determinado cuánto tiempo persisten o qué efectos tienen en el recién nacido a largo plazo.

Los requerimientos de calostro para el cordero han sido calculados de acuerdo a la energía que éste requiere por debajo de la cual sus propias reservas de energía deben ser movilizadas. Mellor y Murray

(1986) estimaron que un cordero requiere 180 ml/kg de peso vivo durante sus primeras 18 horas de vida cuando la temperatura es de 10°C y no hay viento y Robinson et al. (2002) sostiene que un 28% de esta cantidad (50 g/kg de peso vivo) ya debe estar disponible para el cordero al parto. Pero si las condiciones ambientales son de viento y frío los requerimientos aumentan 1.5 veces.

### *5. Efectos del calostro*

Además de ser una fuente importante de nutrición e inmunidad pasiva, también tiene potentes propiedades inmunomoduladoras que pueden impedir que los neonatos desarrollen una respuesta inmune activa a ciertos antígenos. Las inmunoglobulinas transferidas pasivamente pueden suprimir la inmunidad neonatal específica e inespecífica.

Una consecuencia práctica importante sobre los efectos inmunomoduladores del calostro es su efecto potencial frente a la vacunación. Como regla general, el mejor momento para inmunizar a un neonato es después de que las inmunoglobulinas maternas hayan disminuido y el sistema inmunitario esté lo suficientemente maduro como para responder adecuadamente. (Barrington y Parish, 2001).

### *6. La glándula mamaria*

La glándula mamaria se compone comúnmente de parénquima y estroma, el cual incluye el sistema ductal. El parénquima glandular es responsable de la producción de leche y está constituido por glándulas túbulo-alveolares (Nickel et al. 1981). Cada uno de estos tejidos sufre pequeños cambios durante los diferentes periodos del ciclo de lactancia. Hay tres etapas de la biología mamaria que caracterizan los diferentes periodos: proliferación, secreción e involución (Knight y Peaker, 1984). Durante la última fase de gestación, así como durante la fase inicial o media de la lactancia, se produce la expansión de la glándula mamaria por un aumento en el número de células epiteliales y el área de la luz, lo que conduce a un aumento del tejido parenquimatoso y a una reducción del estroma. Durante la fase tardía de la lactancia, el volumen de la glándula mamaria disminuye debido a la regresión de la estructura secretora.

El desarrollo de la glándula mamaria depende del sistema endocrino, mientras que el mecanismo de eyección de la leche es competencia del sistema nervioso. Ambos sistemas están conectados mediante el eje hipotalámico-hipofisario y regulan el proceso mediante la producción y liberación de determinadas sustancias (prolactina, oxitocina, hormona del crecimiento, etc.) de forma coordinada con otros órganos liberadores de hormonas (ovarios, placenta) (Klein, 2013). El lactógeno placentario está estructuralmente relacionado con la prolactina y con la hormona de crecimiento (Tucker, 2000), por lo que se demuestra que la glándula mamaria puede desarrollarse sin necesidad de la hipófisis. El hecho de que exista una relación positiva entre el tamaño de camada y la producción de leche proporciona evidencia adicional de la regulación placentaria de la mamogénesis. Sin embargo, la proliferación del tejido mamario durante la lactancia depende de la prolactina, secretada en respuesta al estímulo del ordeño, ya que tras el parto el

lactógeno placentario desaparece. El desarrollo tubuloalveolar en ovejas requiere la acción de estrógeno y progesterona en presencia de prolactina endógena (Schams et al, 1984).

La hormona del crecimiento promueve el desarrollo ductal, además, estudios demuestran que estimula el crecimiento del parénquima mamario (Johnsson et al, 1986) y la producción de leche en rumiantes. Incluso se comercializa con el nombre de somatotropina bovina (Neville et al, 2002).

Aunque la función principal de la oxitocina es la eyección de leche, el tratamiento con oxitocina exógena se asocia con una mayor producción de leche en ovejas (Zamiri et al, 2001).

En cuanto a la regulación nerviosa, la secreción de las glándulas mamarias se desencadena cuando la descendencia comienza a chupar el pezón. La estimulación de los receptores táctiles de la zona genera impulsos sensoriales que se transmiten desde los pezones hasta la médula espinal y luego a las neurona oxitocinérgicas secretoras en el hipotálamo, lo cual implica una vía neuronal ascendente desde los pezones hasta el hipotálamo y un enlace vascular descendente que transporta las hormonas hipofisarias, especialmente la oxitocina, a la glándula mamaria. Las neuronas secretoras de oxitocina se encuentran en el núcleo paraventricular y en los núcleos hipotalámicos supraópticos. Tras la estimulación del pezón, la oxitocina se libera en el torrente sanguíneo y llega la ubre, lo que lleva a la contracción de las células mioepiteliales que rodean los alveolos mamarios y, posteriormente, expulsa la leche almacenada en ellos para que esté disponible para los corderos (Tsingotjidou y Papadopoulos, 2008).

Como regla general en pequeños rumiantes, la lactancia temprana y media se definen por la proliferación celular, un mayor nivel de actividad celular y número de alvéolos y un aumento en el volumen de la ubre. Además, en conjunto están correlacionados con mayores rendimientos de leche que caracterizan este período de lactancia. Durante la lactancia media hacia tardía, se produce una reducción del número de células epiteliales, una mayor detección de cuerpos apoptóticos, una reducción en el tamaño y número alveolar y una disminución del volumen de la ubre, en todos los casos correlacionado con la reducción en el rendimiento de la leche (Lérias et al, 2014).

## *7. La melatonina*

La melatonina ((N-acetil-5-metoxitriptamina) ) es el transductor primario de información fotoperiódica al eje reproductor neuroendocrino (Arendt, 1995). Se sintetiza en la glándula pineal a partir del triptófano y la serotonina (Bittman et al. 1983). La relación recíproca entre la glándula pineal y el núcleo supraquiasmático, el marcapasos circadiano central, es el mecanismo principal de producción de melatonina. En los mamíferos, esta hormona funciona como señal biológica, ya que proporciona información temporal al resto de sistemas sobre la época del año y la hora del día (Carrillo-Vico et al., 2005). La secreción de melatonina es mayor en las noches largas de invierno en comparación con las noches cortas de verano. El cambio en la

duración de la secreción sirve como una señal de tiempo para la organización de funciones estacionales dependientes de la longitud del día como la reproducción, el comportamiento y el crecimiento del pelaje en mamíferos estacionales. Esta transducción de información fotoperiódica es la función fisiológica más importante de la melatonina en mamíferos. Los cambios dependientes del fotoperíodo en las especies estacionales también incluyen cambios en la forma de onda de la temperatura corporal central y en el momento y la distribución del sueño (Arendt, 1995).

Por lo tanto, la glándula pineal es esencial en las respuestas reproductivas de las ovejas a los fotoperíodos estimuladores e inhibidores. Varios estudios sugieren que las respuestas reproductivas a los días cortos están mediadas por el ritmo circadiano de la melatonina, la cual se secreta por la noche (Bittman and Karsch, 1984). La exposición a la luz durante la fase oscura suprime la producción de melatonina (Arendt y Skene, 2005). La información fotoperiódica se transmite a través de varias vías neurales, desde la retina hasta la glándula pineal, donde la señal de luz se traduce en un ciclo diario de secreción de melatonina: alta por la noche, baja durante el día. La duración de la secreción nocturna de melatonina refleja la duración de la noche y regula la secreción pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) del hipotálamo. Las variaciones en la liberación de GnRH inducen los cambios correspondiente en la secreción de la hormona luteinizante que es responsable de la presencia o ausencia de ovulación (Malpaux et al., 1999).

Además, la melatonina muestra una notable versatilidad funcional al exhibir propiedades antioxidantes, oncostáticas, antienviejecimiento e inmunomoduladoras, entre otras (Macchi y Bruce, 2004).

La melatonina tiene varias áreas de unión (Bittman y Weaver, 1990), pero es en la pars tuberalis (PT) donde hay mayor densidad de esta. La pars tuberalis se encuentra en una posición anatómica privilegiada para interactuar tanto con la eminencia media como con la pars distalis de la hipófisis, por lo que puede influir en la función hipotálamo-hipofisaria. Sin embargo, estudios demuestran que la pars tuberalis no interviene en la acción de la melatonina en el eje reproductor neuroendocrino. De hecho, en la oveja, la melatonina introducida directamente en la PT no parece modificar la secreción de LH. En cambio, los microimplantes colocados en el tercer ventrículo sí estimulan la liberación de LH (Malpaux et al., 1994). Existe una clara relación entre la proximidad de los microimplantes de melatonina al área de unión y la efectividad de estos para estimular la secreción de LH. Estos estudios demuestran que el hipotálamo, y no la PT, es el órgano diana de la melatonina. En la oveja, el sitio de unión de la melatonina se encuentra en el área hipotalámica premamilar; esta se encuentra en la base del cerebro y está limitada dorsolateralmente por el fornix, se extiende 3 mm a ambos lados del tercer ventrículo, es posterior al receso infundibular y está delimitado caudalmente por los cuerpos mamilares (Chabot et al., 1998, Malpaux et al., 1998). La PT interviene, en parte, en la acción de la melatonina sobre la secreción de prolactina. De hecho, en la oveja

los implantes de melatonina tienen un efecto inhibitor sobre la liberación de prolactina (Malpaux et al., 1995).

La importancia de la glándula pineal se ha demostrado en numerosos experimentos, como por ejemplo en hámsters sirios en los que se practicó pinealectomía. La extracción de la glándula pineal en estos animales previene la reducción estacional de la secreción de gonadotropina y la regresión gonadal normalmente provocada por el fotoperiodo corto (Reiter, 1980). La pinealectomía suprime concretamente las respuestas tanto cortas como largas. Además, se han realizado estudios sobre la posible función endocrina en el sistema inmune de la glándula pineal sobre la base de dos enfoques experimentales: pinealectomía funcional o quirúrgica y la asociación entre la producción de melatonina y el ajuste circadiano y estacional en el sistema inmune. Tanto la pinealectomía quirúrgica como funcional se correlacionan directamente con la pérdida de peso de los principales órganos inmunes (Vaughan y Reiter, 1971). Además, la extracción de la glándula pineal también causa varios cambios en la respuesta inmune, provocando un deterioro parcial y transitorio en el potencial inmune en ratas adultas y alterando los parámetros hematológicos en neonatos. La pinealectomía funcional con exposición continua a la luz en ratas causa una reducción en la producción de los péptidos típicos timosina-1 y timulina (Molinero et al., 2000) y aumenta la inmunosupresión inducida por catecolaminas adrenérgicas-2 en linfocitos de sangre periférica. Cuando se administra melatonina a animales con pinealectomización los efectos sobre el sistema inmunitario generalmente se revierten.

Varios estudios demuestran que hay una asociación entre la influencia de la melatonina en el sistema inmune y el fotoperiodo. Un patrón nocturno de síntesis de melatonina (días cortos) mejora la función inmune para proteger contra condiciones invernales difíciles, cuando baja la temperatura y la disponibilidad de limitada de alimentos podrían comprometer la salud del animal (Nelson y Drazen, 1999).

Carrillo-Vico et al. (2005) revisaron las numerosas observaciones que han demostrado que la melatonina desempeña un papel importante en el ajuste estacional del sistema inmunológico, y existe evidencia de que la melatonina tiene un efecto directo en la producción de IgG. En ratones, la melatonina administrada por la noche aumentó la respuesta de anticuerpos primarios in vivo, cinco días después de la inyección de glóbulos rojos de oveja; así, el efecto estimulante de la melatonina se ejerció principalmente en las células productoras de IgG (Maestroni et al., 1987). Además, la melatonina puede prevenir la inmunosupresión observada en ratas de edad al aumentar los niveles de IgG e IgM y, en ratones mantenidos en días cortos artificiales, los niveles séricos de IgG se elevaron porque la secreción de melatonina es mayor porque los períodos oscuros del día son más largos (Nelson, 1996).

Los implantes subcutáneos de melatonina se usan ampliamente para avanzar la temporada de reproducción en ovinos, y sus efectos en el ovario, la impregnación y la viabilidad embrionaria en

programas de transferencia de embriones en ovinos han sido revisados por Abecia et al. (2008a, 2019). Normalmente la melatonina se libera por la noche, pero los implantes subcutáneos se usan para aumentar la concentración durante 24h y causar una respuesta corta durante el día sin suprimir la secreción endógena (Malpaux et al., 1997).

Durante los últimos años también se han realizado estudios con el objetivo de determinar el papel de la duración del día y la melatonina exógena en la modulación del rendimiento lechero y de la composición química de la leche en ovejas. El fotoperiodo es de especial importancia para los animales de día corto, ya que en ellos la duración del día está relacionada con cambios en las concentraciones de melatonina (Misztal et al., 1996). En las ovejas, los cambios en la duración del día se perciben como un marcador biológico con respecto a la función reproductiva e influyen en el proceso de lactancia. El inicio de la lactación involucra una serie de hormonas, lo que demuestra que el proceso depende de la actividad del hipotálamo y de la glándula pituitaria (Peaker y Neville, 1991). La luz es un factor que modula la concentración de prolactina y depende del ritmo anual de las concentraciones de melatonina. En condiciones naturales, la concentración máxima de prolactina en sangre se observa en el periodo de días largos, que es cuando el nivel de melatonina disminuye. Mientras que la concentración mínima de prolactina se observa durante el periodo de días cortos, que es cuando el nivel de melatonina aumenta (Misztal et al., 1991). El efecto modulador de la melatonina sobre la secreción de prolactina podría explicarse por dos mecanismos diferentes. Uno está relacionado con el ritmo circadiano, y tiene un efecto de corta duración y es posible que solo sea aplicable a la prolactina almacenada en las células lactotrópicas de la pituitaria. El segundo mecanismo que modula la secreción de melatonina está relacionado con el ritmo anual de secreción; esto significa que la melatonina, debido a sus propiedades lipofílicas, tiene un efecto directo sobre las células lactotróficas de la hipófisis y, por lo tanto, también afecta a la secreción de prolactina (Misztal et al., 1999)

Los experimentos realizados por Molik et al. demostraron que la duración del día probablemente determina la producción de leche de las ovejas (Molik et al., 2006, 2007). Las ovejas que entraron en lactación en el periodo de días cortos tuvieron un rendimiento lechero del 50% en comparación con las ovejas ordeñadas en el periodo de días largos. Los cambios en la secreción de prolactina durante el periodo de lactación de las ovejas, tanto en el inicio como en el mantenimiento, tienen un efecto en la cantidad de leche producida y en la síntesis de proteínas, grasas e inmunoglobulinas, lo que indica que determinan su composición, calidad y utilidad tecnológica.

El contenido de proteínas en la leche de ovejas con implantes de melatonina aumentó a lo largo del periodo de lactación. Estos resultados indican que la administración de melatonina exógena en el periodo de alargamiento de los días provoca un aumento en la producción de leche y en el contenido de proteínas de la misma. De la misma manera, la simulación artificial de días cortos durante el periodo de días largos

también resultó en un aumento de los contenidos de proteínas y caseína en la leche de oveja (Molik et al., 2012).

Reksen et al. (1999) recomendaron, para aumentar la producción de leche del ganado en latitudes altas (Noruega) en invierno, exponer a los animales a una iluminación tenue por la noche y un fotoperiodo mínimo de 12h de luz.

## **2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

Dada la relación entre la melatonina y el sistema inmunológico, y que el calostro es el primer producto proporcionado por la oveja para activar el sistema de inmunidad del cordero, el objetivo de este experimento es determinar si la melatonina exógena administrada durante la gestación tiene un efecto sobre la calidad y composición del calostro ovino, como se refleja en las concentraciones de IgG, proteínas y grasas. Además, para valorar el impacto de los implantes subcutáneos de melatonina en diferentes periodos de tiempo, se colocan en un grupo durante cuatro semanas más que en otro.

Los corderos nacen sin inmunoglobulinas (Brambell, 1970) y con una pequeña reserva de energía para la producción de calor y el metabolismo y dependen del calostro para suministrar inmunoglobulinas y energía. La forma más satisfactoria de proporcionar inmunidad contra la enfermedad al cordero es asegurarse de que este reciba una gran cantidad de calostro y de la mejor calidad (Mellor, 1990).

Además, el tratamiento con melatonina puede aumentar significativamente el número de corderos nacidos, si además la calidad del calostro aumenta, puede proporcionar beneficios económicos a las granjas al disminuir la mortalidad de los recién nacidos.

## **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

El experimento se realizó en la granja experimental de la Universidad de Zaragoza, España (41 ° 41'N). Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética para Experimentos con Animales de la Universidad de Zaragoza. El cuidado y uso de los animales se realizó de acuerdo con la Política Española de Protección Animal RD1201/05, que cumple con la Directiva de la Unión Europea 2010/63 sobre la protección de los animales.

### *1. Animales y procedimientos experimentales*

El experimento utilizó 60 ovejas Rasa Aragonesa gestantes que estaban en su tercera gestación y no tenían indicaciones de mastitis clínica o subclínica. Antes del experimento para sincronizar el estro, las ovejas recibieron esponjas de progestágeno insertadas durante 14 días y 480 UI de eCG en la extracción de la esponja (Sinchropart, CEVA Salud Animal, Barcelona, España). A partir de entonces, el 17 de junio, se aparearon con diez carneros de fertilidad probada. Cuarenta días después, las ovejas fueron ecografiadas en

busca de evidencia de gestación. El 15 de septiembre, 3 meses después del apareamiento, un grupo de ovejas (Grupo 3M, n = 13) recibió un implante de melatonina subcutáneo (Melovine, CEVA Salud Animal, Barcelona, España). El 15 de octubre, 4 meses después del apareamiento, un segundo grupo (Grupo 4M, n = 18) recibió un implante de melatonina. Las ovejas restantes no recibieron un implante de melatonina (Group Control, C, n = 29). Las ovejas se alojaron con su grupo hasta el momento del parto y se alimentaron para cumplir con los requisitos de peso vivo (PV) y de gestación, y tuvieron acceso ilimitado al agua.

En el momento previsto del parto, las ovejas se asignaron a corrales individuales (2 x 2 m) (Figura 1), de modo que se pudiera observar el momento real del parto. Inmediatamente después del parto, se recogió una muestra de calostro (Figura 2), se congeló y se almacenó a -20 ° C hasta que se realizó un análisis de la concentración de IgG, proteína bruta (% PB) y grasa (% FAT). Se pesaron los corderos, se registró su sexo y se midió la temperatura rectal con un termómetro rectal (Figura 3).



**Figura 1.** Antes del parto se separan las madres en corrales individuales.



**Figura 2.** Recogida de muestra de calostro.

OVEJA	FECHA PARTO	CORDERO	PESO NAC	TEMPERATURA	CALOSTRO 1	CALOSTRO 2	
68	20/10/18	1727 ♀	3.72	39.5	29.0	30.8	R.N 9:50
4	20/10/18	1728 ♀	2.33	39.0			
4	20/10/18	1729 ♀	2.90	39.3	35.2	34.7	RN 11:00
25	20/10/18	1730 ♂	3.53	40.1			
113	20/10/18	1731 ♂	4.80	39.6	25.4	25.6	R.N 12:30
12	20/10/18	1732 ♂	4.21	39.5	27.5	26.9	Medio día (14-15)
37	21/10/18	1733 ♀	3.60	39.1	22.7	22.5	Noche
10	21/10/18	1734 ♀	4.16	39.8	36.6	36.1	R.N 9:50
155	21/10/18	1735 ♀	3.66	39.6			
4	21/10/18	1736 ♂	2.85	39.3	23.5	23.5	Medio día (15-16)
4	21/10/18	1737 ♂	2.89	39.6	14.4	14.9	Medio día (15-16)
4	21/10/18	1738 ♂	2.47	39.7			Medio día (15-16)

**Figura 2.** Registro del nacimiento, peso, temperatura y medición del calostro mediante refractometría.



## *2. Cuantificación de inmunoglobulinas mediante sándwich ELISA*

Las concentraciones de IgG en el calostro de oveja se analizaron con base en la prueba Calokit-Sheep (ZEULAB, Zaragoza, España), según lo descrito por Galan-Malo et al. (2014). Las muestras de calostro se diluyeron para adaptar los niveles de IgG al rango de trabajo de la prueba ELISA. La absorbancia se leyó a 450 nm en un lector de microplacas Multiskan (Labsystems, Helsinki, Finlandia). Se obtuvo una curva de calibración cuadrática mediante el trazado de las lecturas de absorbancia frente a las concentraciones de estándares de IgG. La concentración de IgG en muestras de leche se calculó por interpolación.

## *3. Cuantificación de proteína bruta y porcentajes de grasa en calostro*

Las muestras se liofilizaron y analizaron siguiendo los procedimientos de AOAC (2005) para proteína bruta (PB; ref. 976.05) y extracto de éter (EE; ref. 2003.05).

## *4. Análisis estadístico*

La concentración de IgG, % PB y % FAT se recalcularon sobre la base de materia seca y se evaluaron estadísticamente según un modelo multifactorial que incluía tratamiento con melatonina, sexo de descendencia (macho, hembra o macho + hembra) y tamaño de camada (solo parto) como efectos fijos, y se utilizó el Método de Mínimos Cuadrados del procedimiento GLM en SPSS v.22 (IBM Corp. Released, 2013). En segundo lugar, los niveles de IgG de calostro, % PB y % FAT se compararon con efectos fijos mediante un ANOVA. Una representación general del modelo es la siguiente:  $y = xb + e$ , donde  $y$  es el vector de registros  $N \times 1$ ,  $b$  denota el efecto fijo en el modelo dentro de la matriz de asociación  $x$ ,  $y$  y  $e$  es el vector de efectos residuales. Para evaluar el efecto del tratamiento con melatonina de un mes, se realizó una prueba post-hoc de la diferencia menos significativa (LSD) de Fisher. Los parámetros reproductivos se compararon mediante ANOVA y la tasa de mortalidad mediante la prueba  $\chi^2$ .

## 5. RESULTADOS

Los grupos no difirieron significativamente en el número de corderos nacidos por oveja, la media de peso al nacer, la temperatura rectal de los corderos y la tasa de mortalidad, aunque esta última tendió ( $P = 0,12$ ) a ser más baja en el grupo 4M (Tabla 1).

	Control	3M	4M
n	29	13	18
Corderos nacidos	52	25	31
Prolificidad	1.79±0.10	1.92±0.08	1.72±0.06
Peso vivo al nacimiento	3.63±0.14	3.58±0.17	3.49±0.18
Temperatura rectal	38.88 ±0.12	38.91±0.10	39.16± 0.16
% mortinatos	13%	20%	6%
% mortalidad al destete	7%	0%	0%
% mortalidad total	19%	20%	6%

**Tabla 1.** Número de corderos nacidos y prolificidad media ( $\pm$  SEM) (número de corderos nacidos/parto), peso vivo y temperatura rectal ( $^{\circ}$ C) de los corderos al nacer, y porcentaje de mortalidad de corderos de ovejas rasa aragonesa que recibieron un implante subcutáneo de melatonina al tercer (3M) o cuarto (4M) mes de gestación, o no (control).

El momento de la implantación de melatonina ( $P < 0,001$ ) y el sexo de los corderos ( $P < 0,01$ ) tuvo un efecto significativo sobre la concentración de IgG. El tamaño de la camada no tuvo un efecto significativo, aunque su interacción con el momento de la implantación y el sexo de la descendencia fue significativa ( $P < 0,001$ ). El calostro de ovejas que recibieron un implante de melatonina tenía una concentración de IgG media más alta ( $\pm$  SEM) que las ovejas de control ( $191.31 \pm 14.45$  vs.  $166.61 \pm 12.22$  mg/ml, respectivamente;  $P < 0.05$ ), principalmente porque las concentraciones en el grupo 4M fue significativamente mayor ( $P < 0,001$ ) que en los grupos 3M y C (Tabla 2). El momento de la implantación tuvo un efecto significativo en el % de FAT, y las ovejas 3M tuvieron valores significativamente más altos ( $P < 0.05$ ) que los de los grupos Control y 4M. El % de PC en el calostro no difirió significativamente entre los grupos (Tabla 2).

	Control	3M	4M
n	29	13	18
IgG (mg/ml)	166.61±12.22 <sup>a</sup>	132.90±11.34 <sup>a</sup>	223.76±17.46 <sup>b</sup>
% Proteína bruta	56.23±1.47	50.58±2.07	57.08±1.86
% Grasa	25.98±1.87 <sup>a</sup>	34.47±2.14 <sup>b</sup>	24.83±2.23 <sup>a</sup>

**TABLA 2** Concentración media ( $\pm$  SEM) de IgG (mg / ml) y porcentaje de proteína bruta y grasa en el calostro recolectado inmediatamente después del parto en ovejas Rasa Aragonesa que recibieron un implante subcutáneo de melatonina en el tercero (3M) o cuarto (4M) ) mes de gestación, o no (Control). (a, b indican  $P < 0.05$ )

Las asociaciones entre el sexo del cordero y la IgG ( $P < 0.01$ ), % PB ( $P < 0.05$ ) y % FAT ( $P = 0.11$ ) fueron evidentes en partos de cría única (ovejas con un cordero macho:  $225.31 \pm 23.59$  mg IgG/ml,  $59.68 \pm 2.72\%$  PB,  $19.49 \pm 2.90\%$  FAT; ovejas con un cordero:  $135.36 \pm 15.92$  mg/ml,  $53.10 \pm 2.17\%$  PB,  $26.00 \pm 2.69\%$  FAT). Las ovejas que portaban un solo cordero macho produjeron un calostro que tenía mayor IgG y el contenido de proteína, y un menor porcentaje de grasa que las ovejas que habían llevado una sola cría hembra. La presencia de una hembra en la camada se asoció con niveles de IgG de calostro significativamente más bajos ( $P < 0.01$ ) (camadas con al menos una hembra:  $161.50 \pm 10.39$ ; camadas sin hembras:  $207.81 \pm 17.04$  mg / ml;  $P < 0.01$ ), aunque las correlaciones con % PB ( $54.93 \pm 1.29$  y  $56.37 \pm 1.81\%$  PB) y % FAT ( $27.65 \pm 1.31$  y  $26.32 \pm 10.99\%$  FAT) no fueron significativos.

El efecto de interacción entre el momento de la implantación, el sexo de la descendencia y el tamaño de la camada en las concentraciones de IgG se presenta en la Tabla 3. En el grupo de Control, la presencia de un feto hembra se asoció negativamente ( $P < 0.01$ ) con las concentraciones de IgG en aquellas ovejas que tienen un solo cordero. Entre las ovejas implantadas con melatonina en el cuarto mes de gestación, las que portaban fetos hembras tuvieron niveles de IgG significativamente más bajos ( $P < 0.01$ ), ya sea que tuvieran un solo cordero o múltiples corderos.

	Cría única			Multiple		
	Control	3M	4M	Control	3M	4M
Sin hembras en la camada	168.14±17.64 <sup>a</sup> (5)	148.71±39.4 <sup>5</sup> (2)	298.83±17.64 <sup>a</sup> (5)	161.41±22.5 <sup>9</sup> (7)	149.02±39.1 <sup>3</sup> (3)	307.05±39.13 <sup>a</sup> (2)
Hembras en la camada	94.30±19.73 <sup>b</sup> (5)	150.16±39.4 <sup>5</sup> (2)	165.26±17.64 <sup>b</sup> (5)	192.68±15.9 <sup>8</sup> (12)	122.01±22.5 <sup>9</sup> (6)	182.20±22.59 <sup>b</sup> (6)

**TABLA 3** Concentración media ( $\pm$  SEM) de IgG (mg/ml) en calostro recolectado inmediatamente después del parto, de ovejas Rasa Aragonesa que habían recibido un implante subcutáneo de melatonina al tercer (3 M) o cuarto (4 M) mes de gestación, o no (Control), portando o no portando una hembra de cordero. (a, b indican  $P < 0.01$ )

## 6. DISCUSIÓN

Por lo que sabemos, este es el primer estudio que informa un efecto de la melatonina exógena durante los últimos dos meses de gestación sobre la calidad del calostro en ovejas; específicamente, las ovejas que recibieron un implante en el cuarto mes de gestación tuvieron concentraciones significativamente más altas de IgG de calostro; sin embargo, la implantación de melatonina en el tercer mes de gestación no cambió los niveles de IgG, aunque el contenido de grasa del calostro fue más alto que entre los animales de control. Los implantes comerciales de melatonina de liberación lenta utilizados en este estudio inducen niveles elevados de melatonina en plasma durante la fase luminosa del día durante >100d (Zúñiga et al., 2002). Por lo tanto, los implantes administrados a las ovejas en los grupos 3M y 4M no se habrían agotado en el momento del parto y, por lo tanto, una exposición más prolongada a la melatonina exógena (tres meses) no fue efectiva para aumentar la IgG, pero sí fue efectiva para aumentar contenido de grasa en el calostro. La refractariedad a señales de días cortos, como la inducida por los implantes de melatonina, ocurre en las ovejas a través de la regulación estacional del ciclo sexual, de modo que la exposición prolongada causa refractariedad en días cortos y, posteriormente, el cese de la actividad reproductiva (Chemineau et al., 1992). Como tal, posiblemente los mecanismos que causan el aumento de las concentraciones de IgG en el calostro no responden a la exposición prolongada a la melatonina, ya que podría haber ocurrido una refractariedad similar a la hormona exógena.

La administración de melatonina exógena y la simulación de un fotoperiodo de día corto en verano tuvieron efectos significativos en los niveles de sólidos, proteínas, grasas y lactosa de la leche, y en el

contenido de ácidos grasos de la leche de oveja. Molik et al. (2011) observaron que las ovejas expuestas a un fotoperíodo artificialmente corto y las que recibieron implantes de melatonina produjeron leche con los niveles más altos de grasa, similares a los animales 3M en nuestro experimento.

En nuestro estudio, la presencia de fetos hembras redujo los niveles de IgG en el calostro en el grupo 4M, tanto en ovejas que tenían solo un cordero como en las que tenían múltiples corderos, y el fenómeno se produjo en ovejas no tratadas que tenían una cordera. Una posible explicación de esta observación se basa en la concentración-dilución. Dado que la producción de crías hembras tiene un efecto positivo en la producción de leche en cabras de Florida (Abecia et al., 2018b) y en ovejas Churra y Lacaune (Abecia y Palacios, 2018), y aunque en nuestro estudio no se midió la producción de calostro, presumiblemente las ovejas que paren hembras producirán la mayor cantidad de calostro, de modo que, incluso sin diferencias en la producción de IgG, cualquier molécula diluida en calostro tendrá una concentración más baja. En vacas, las que tuvieron un ternero hembra produjeron cantidades más altas ( $P < 0.05$ ) de calostro y leche durante la lactancia que las vacas que tuvieron un ternero macho (Angulo et al., 2015), y la concentración total de Ig fue mayor en el caso del macho que en las hembras, como en las ovejas en nuestro estudio. En el estudio con vacas, la explicación de esas diferencias fue un efecto de dilución porque las vacas que tenían una ternera produjeron más calostro que las vacas que tenían un ternero macho, pero la cantidad total de Ig producida no difirió (relacionando la concentración de IgG con volumen de calostro producido). En cualquier caso, dado que la producción de leche parece estar influenciada por el sexo del descendiente a través de hormonas fetales específicas del sexo que pueden influir en el tejido de la glándula placentaria y mamaria (Anand-Ivell et al., 2011), la secreción de IgG en el calostro podría estar influenciado por cualquier hormona específica del sexo liberada por el feto. Otros no han encontrado una correlación entre el sexo del cordero y los niveles de IgG de calostro (Ciupercescu, 1977; Kaymaz et al., 2000). Un razonamiento similar podría explicar los niveles más altos de IgG producidos por las ovejas 4M; es decir, a través de una reducción en la cantidad de calostro causada por la melatonina a través de la concentración de sólidos. Sin embargo, en las ovejas Assaf y Lacaune en lactancia, el tratamiento con melatonina para mejorar el potencial de reproducción no interfiere con la producción de leche (Abecia et al., 2005); por lo tanto, parece que el tratamiento con melatonina no modifica la producción de leche o de calostro; más bien, su calidad.

En nuestro estudio, el tratamiento con melatonina no afectó la temperatura rectal del cordero ni el peso vivo al nacer. La melatonina materna contribuye a modular varias funciones de importancia clave en la fisiología fetal y en la preparación para la vida extrauterina. El tejido adiposo marrón almacenado durante el desarrollo fetal se usa para la termogénesis en recién nacidos; por lo tanto, quisimos confirmar si los implantes tuvieron un efecto en la acumulación de tejido adiposo marrón, como lo reflejan las diferencias en la temperatura corporal o el peso vivo al momento del parto. El tejido adiposo marrón es importante en el recién nacido ya que este necesita mantener la temperatura central cuando se enfrenta a la transición del ambiente intrauterino (más de 39°C) al ambiente postnatal frío. Los mecanismos básicos se activan al nacer,

la producción de calor por el tejido adiposo marrón representa aproximadamente la mitad del calor que necesitan los recién nacidos para mantener la temperatura central, y el resto lo produce la termogénesis muscular (Alexander y Williams, 1968). Al nacer, cuando se corta la conexión con la placenta y la madre, la exposición al frío estimula la liberación de noradrenalina que conduce a la hidrólisis de los triglicéridos, almacenados en las células del tejido adiposo marrón y ácidos grasos (Cannon y Nedergaard, 2003; Alexander et al., 1968).

Brockhus et al. (1988) implantaron melatonina en las ovejas en el día 56 de gestación y no detectaron un efecto sobre la deposición de tejido adiposo marrón y el contenido de lípidos en el feto. Torres-Farfan et al. (2008), sin embargo, demostraron una respuesta inhibitoria directa a la melatonina exógena de tejidos fetales in vitro, lo que apoya que la melatonina tiene un papel en la fisiología fetal, al restringir la lipólisis durante la vida fetal. Seron-Ferre et al. (2008) demostraron que la melatonina materna durante la gestación influye en la cantidad y la funcionalidad normal del tejido adiposo marrón en el neonato. En su estudio, los corderos recién nacidos privados crónicamente de melatonina materna durante su último tercio de la vida fetal, a los 5 días de vida tenían menor temperatura que los corderos recién nacidos del grupo control. En nuestro estudio, la ausencia de diferencias entre los grupos de tratamiento y control en el peso vivo y la temperatura rectal al momento del parto, y las tasas de mortalidad hasta el destete, sugieren que la duración de la exposición a la melatonina exógena fue insuficiente para inducir cambios significativos en el desarrollo del feto o mejorar el estado inmune del recién nacido.

## **7. CONCLUSIONES**

En conclusión, el tratamiento con implantes de melatonina en el cuarto mes de gestación ha resultado en una mayor calidad de calostro basada en la concentración de IgG. Además, si la oveja tiene uno o más corderos, el efecto es mayor. Por lo tanto, la recolección de calostro de ese tipo de ovejas para ser almacenadas podría tener valor práctico.

Además, la melatonina exógena ha reducido la mortalidad en el grupo 4M y ha tenido un efecto significativo en cuanto al sexo de los corderos y la concentración de IgG. En el grupo 4M hay una mayor concentración de IgG, lo que indica el momento de la colocación del implante de melatonina es importante, ya que cuanto más tiempo actúa, mayores son sus efectos.

Por contraste, el contenido en grasa en el calostro resultó mayor en las ovejas del grupo 3M. Además, la melatonina tiene un efecto significativo en el sexo del cordero, la concentración de IgG, el % PB y el % FAT cuando la oveja solo pare una cría.

En definitiva, es necesario realizar más estudios sobre el efecto de la melatonina en la fisiología fetal y en el rendimiento lechero, para valorar el beneficio que tiene en la productividad y economía ganadera, al

reducir la mortalidad durante la lactancia, obtener corderos con mayor peso vivo al nacimiento y aumentar el rendimiento lechero de las ovejas y la calidad de la leche.

## **CONCLUSIONS**

In conclusion, treatment with melatonin implants in the fourth month of gestation resulted in a higher quality of colostrum based on the concentration of IgG. Also, if the sheep has one or more lambs, the effect is greater. Therefore, colostrum collection of such sheep to be stored could have practical value.

In addition, exogenous melatonin has reduced mortality in the 4M group and has had a significant effect on the sex of the lambs and the concentration of IgG. In the 4M group there is a higher concentration of IgG, which indicates the timing of the placement of the melatonin implant is important, since the longer it acts, the greater its effects.

In contrast, the fat content in colostrum was higher in sheep of the 3M group. In addition, melatonin has a significant effect on the sex of the lamb, the concentration of IgG, % CP and % FAT when the sheep only carries a lamb.

In short, more studies on the effect of melatonin on fetal physiology and milk yield are necessary to assess the benefit it has on productivity and livestock economy, reduce mortality during lactation, obtain lambs with greater live weight at birth and increase the milk yield of sheep and milk quality.

## **8. VALORACIÓN PERSONAL**

Este trabajo me ha permitido mejorar el manejo con el ganado ovino, desde antes del nacimiento de los corderos hasta la colocación del crotal, toma de temperatura, desinfección del cordón umbilical e inyección de Se. También he aprendido sobre la reproducción ovina, ya que ,durante el experimento, debía estar presente durante los partos para tomar las muestras de calostro. Por supuesto he ampliado mis conocimientos sobre la fisiología ovina y cómo se puede modificar mediante la administración de hormonas para obtener un beneficio en cuanto a disminuir la mortalidad de los corderos y aumentar el rendimiento lechero.

Además, también he conocido métodos para valorar la calidad del calostro tanto in situ como laboratoriales, y a manejar las muestras en el laboratorio. La búsqueda de información científica de calidad en páginas online especializadas también me ha resultado beneficioso, ya que es una herramienta que podré utilizar a lo largo de mi carrera profesional. El hecho de leer tal cantidad de artículos científicos, nos ayuda a los estudiantes a entender el campo de la investigación y, en mi caso, me ha permitido entender mejor los resultados obtenidos en este estudio.

No solo he aprendido sobre fisiología ovina y manejo de ganado, si no que también he aprendido la importancia que tienen estos estudios en una zona geográfica en la que la producción de corderos y productos lácteos derivados del ganado ovino es tan importante. Estos experimentos permiten mejorar la producción, el rendimiento y, por tanto, la economía de los ganaderos.

Para finalizar, agradezco la paciencia y disposición de mi tutor Alfonso Abecia, ya que me ha ayudado en todo momento a resolver mis dudas y siempre ha estado disponible. Además, también agradecer la colaboración de los trabajadores del SAEA, que en momentos en los que yo no podía estar presente, ellos se han encargado de recoger las muestras de calostro para garantizar que el experimento no fracasase. Finalmente, quiero agradecer la colaboración de dos estudiantes dispuestos a ayudar en lo que hiciera falta, Silvia Luis y David López.



## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Abecia, J.A., Forcada, F., Casao, A., y Palacín, I. (2008). Effect of exogenous melatonin on the ovary, the embryo and the establishment of pregnancy in sheep. *Animal* **2**, 399-404.
- Abecia, J.A., Forcada, F., Valares, J.A., Palacín, I., Martín, S., Martino, A., Gómez, M.I., y Palacios, C. (2005). Does melatonin treatment during lactation influence milk production in Lacaune and Assaf ewes? *Spanish Journal of Agricultural Research* **3**, 396-401.
- Abecia, J.A., Forcada, F., Vázquez, M.I., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J.A., Pérez-Pe, R., y Casao, A. (2018a). Role of melatonin on embryo viability in sheep. *Reproduction Fertility and Development* **31**, 82-89.
- Abecia, J.A., Arrebola, F., Sanchez, M., Lopez, M.D., y Palacios, C. (2018b). Goats kidding females produce more milk, fat, protein and lactose than goats kidding males. *Large Animal Review* **24**, 143- 147.
- Abecia, J.A., y Palacios, C. (2018). Ewes giving birth to female lambs produce more milk than ewes giving birth to male lambs. *Italian Journal of Animal Science* **17**, 736-739.
- Alexander, G., Mills, S.C. y Scott, T.W. (1968). Changes in plasma glucose, lactate and free fatty acids in lambs during summit metabolism and treatment with catecholamines. *J Physiol* **198**, 277-89.
- Alexander, G. y Williams, D. (1968). Shivering and non-shivering thermogenesis during summit metabolism in young lambs. *J Physiol* **198**, 251-76.
- Anand-Ivell, R., Hiendleder, S., Viñoles, C., Martin, G.B., Fitzsimmons, C., Eurich, A., Hafen, B., y Ivell, R. (2011). INSL3 in the ruminant: a powerful indicator of gender- and genetic-specific feto-maternal dialogue. *PLoS One* **6**, e19821.
- Angulo, J., Gómez, L.M., Mahecha, L., Mejía, E., Henao, J., y Mesa, C. (2015). Calf's sex, parity and the hour of harvest after calving affect colostrum quality of dairy cows grazing under high tropical conditions. *Tropical Animal Health and Production* **47**, 699-705.
- AOAC. (2005). Official methods of Analysis of AOAC International, 18th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.
- Arendt, J. (1995). Melatonin and the mammalian pineal gland. *Champan & Gall, London*, p. 331
- Arendt, J., y Skene, D.J. (2005). Melatonin as a chronobiotic. *Sleep Med. Rev.* **9**, 25-39.
- Banchero, G.E., Perez Clariget, R., Bencini, R., Lindsay, D.R., Milton, J.T., y Martin, G.B. (2006). Endocrine and metabolic factors involved in the effect of nutrition on the production of colostrum in female sheep. *Reproduction nutrition development* **46**(4), 447-460.
- Barrington, G.M., y Parish, S.M. (2001). Bovine neonatal immunology. *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice* **17**, 463-476.
- Barza, H., Marinescu, M., y Blaga, L. (1993). Disorders of foals 0-10 days of age. Part I. *Revista Romana de Medicina Veterinaria* **3** 9-20.
- Bittman, E., y Karsch, F. (1984). Nightly Duration of Pineal Melatonin Secretion Determines the Reproductive Response to Inhibitory Day Length in the Ewe. *Biology of reproduction* **30**, 585-593.

Bittman, E.L., Karsch, F.J., y Hopkins, J.W. (1983). Role of the pineal gland in ovine photoperiodism: Regulation of seasonal breeding and negative feedback effects of estradiol upon luteinizing hormone secretion. *Endocrinology* **113**, 229-336.

Bittman, E.L., y Weaver, D.R. (1990). The distribution of melatonin binding sites in the neuroendocrine tissues of the ewe. *Biol. Reprod.* 986-993.

Bjorck, L., y Claesson, O. (1979). Xanthine-oxidase as a source of hydrogen- peroxide for the lactoperoxidase system in milk. *J. Dairy Sci.* **62**(8), 1211-1215.

Brambell, F.W.R. (1970). The transmission of passive immunity from mother to young. In *Frontiers of biology*, vol. 18, p. 166. North Holland Publishing Co., Amsterdam.

Brockhus, M.A., Obst, J.M., Cummins, L.J., y Staples, L.D. (1988). The effect of melatonin administered to pregnant ewes on brown fat deposition in the foetus. In *'Proceedings of the Australian Society of Animal Production, 18th biennial meeting'*. p. 378. (Sydney, Armidale, NSW)

Bruder, G., Heid, H.W., Jarasch, E.D., y Mather, I.H. (1983) Immunological identification and determination of xanthine-oxidase in cells and tissues. *Differentiation* **23**(3), 218-225.

Cannon, B. y Nedergaard, J. (2003). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* **84**, 277–359

Carrillo-Vico, A., Guerrero, J.M., Lardone, P.J., y Reiter, R.J. (2005). A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine* **27**, 189–200.

Chabot, V., Caldani, M., de Reviers, M.M., y Pelletier, K. (1998). Localisation and quantification of melatonin receptors in the diencephalon and posterior telencephalon of the sheep brain. *J. Pineal Res.* **24**, 50-57

Chemineau, P., Malpoux, B., Delgadillo, J.A., Guérin, Y., Ravault, J.P., Thimonier, J., y Pelletier, J. (1992). Control of sheep and goat reproduction: Use of light and melatonin. *Animal Reproduction Science* **30**, 157–184.

Ciupercescu, D.D. (1977). Dynamics of serum immunoglobulin concentrations in sheep during pregnancy and lactation. *Research in Veterinary Science* **22**, 23-27.

Colitti, M., Stradaoli, G., y Stefanon, B. (2000) Effect of alpha-tocopherol deprivation on the involution of mammary gland in sheep. *Journal of Dairy Science.* **83**, 345–350

Csapó, J., Csapó-Kiss, Z., Martin, T.G., Szentpeteri, J., y Wolf, G. (1994). Composition of colostrum from goats, ewes and cows producing twins. *International Dairy Journal.* **4**, 445–458

Demas, G.E., y Nelson, R.J. (1996). Photoperiod and temperature interact to affect immune parameters in adult male deer mice (*Peromyscus maniculatus*). *Journal of Biological Rhythms* **11**, 94–102.

Galan-Malo, P., Valares, J.A., Langa, V., Razquín, P., y Mata, L. (2014). Determination of IgG levels in bulk ewe's milk. *Small Ruminant Research* **119**, 156–160.

Ganz, T., y Lehrer, R.I. (1998). Antimicrobial peptides of vertebrates. *Curr. Opin. Immunol.* **10** (1), 41-44.

García de Jalón, J.A., De las Heras, M., Ferrer, L.M., Sancho, J.F. (1990). Síndrome de la boca mojada en corderos. Medicina Veterinaria, 7. Barcelona, Spain: Pulso Ediciones.

Gennaro, R. y Zanetti, M. (2000). Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. *Biopolymers* **55**(1), 31-49.

Hartmann, P. E., Trevethan, P., y Shelton, J. N. (1973). Progesterone and oestrogen and the initiation of lactation in ewes. *J. Endocrinol.* **59**, 249–259.

Hernández-Castellano, L.E., Almeida, A.M., Ventosa, M., Coelho, A., Castro, N, y Argüello, A. (2014b). The effect of colostrum intake on blood plasma proteome profile in newborn lambs: low abundance proteins. *BMC Veterinary Research*. **10**, 85.

Hernández-Castellano, L., Almeida, A., Castro, N., y Argüello, A. (2014). The Colostrum Proteome, Ruminant Nutrition and Immunity: A Review. *Current Protein and Peptide Science*, **15**, 64-74.

Johnsson, I.D., Hart, K., y Turvey, A. (1986). Pre-pubertal mammogenesis in sheep. The effects of restricted feeding or daily administration of bovine growth hormone and bromocriptine on mammary growth and morphology. *Animal Production* **42**, 53–63

Kaymaz, A.A., Bakirel, U., Çağtay, P., y Tan, H. (2000). The effects of serum IgG and trace elements-copper and zinc on the development of Kivircik lambs following colostrum intake. *Journal of Veterinary Faculty, University of Tehran*. **26**, 475–481.

Khan, A., y Khan, M.Z. (1991a). Immunoglobulins in relation to neonatal calf mortality. *Pakistan Vet. J.*, **11**: 153-162.

Klein, B. (2013). Cunningham's Text Book of Veterinary Physiology, 5th edition. Missouri, USA: Elsevier

Kleinberg, D.L., Todd, J., y Babitsky, G. (1983). Inhibition by estradiol of the lactogenic effect of prolactin in primate mammary tissue: reversal by antiestrogens LY 156758 and tamoxifen. *P. Natl. Acad. Sci.-Biol.* **80**(13), 4144-4148.

Klobasa, F., Werhahn, E., y Kallweit, E. (1986). Patterns of immunoglobulin concentrations in lamb serum from birth through the post-weaning period. In: Factors affecting the survival of new born lambs. G. Alexander, J. D., Barker, and J. Slee (eds). Commission of the European Communities; Luxembourg. pp: 55-62.

Knight, C.H., y Peaker, M. (1984). Mammary development and regression during lactation in goats in relation to milk secretion. *Quarterly Journal of Experimental Physiology* **69** 331–338

Knowlton, K.F., Glenn, B.P., y Erdman, R.A. (1998). Performance, ruminal fermentation, and site of starch digestion in early lactation cows fed corn grain harvested and processed differently. *Journal of Dairy Science* **81**, 1972–1984.

Korhonen, H., y Pihlanto, A. (2007). Technological options for the production of health-promoting proteins and peptides derived from milk and colostrum. *Curr. Pharm. Design* **13**(8), 829-843.

Lahov, E., y Regelson, W. (1996). Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: Casecidin, isracidin peptides. *Food Chem. Toxicol.* **34**(1), 131-145.

Lérias, J.R., Hernández-Castellano, L.E., Suárez-Trujillo, A., Castro, N., Pourlis, A., y Almeida, A.M. (2014). The mammary gland in small ruminants: major morphological and functional events underlying milk production – a review. *Journal of Dairy Research* **81**, 304–318.

- Macchi, M.M., y Bruce, J.N. (2004). Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front. Neuroendocrinol.* **25**, 177–195.
- Maestroni, G.J.M., Conti, A., y Pierpaoli, W. (1987). Role of the pineal gland in immunity: II. Melatonin enhances the antibody response via an opiate mechanism. *Clinical & Experimental Immunology* **68**, 384-391.
- Maltier, J.P., Legrand, C., y Breuiller, M. (1993). Parturition. In: Reproduction in mammals and man (ed. C Thibault, MC Levasseur and RHF Hunter), pp. 481–501. Ellipses, Paris, France.
- Malpaux, B., Daveau, A., Maurice-Mandon, F., Duarte, G., y Chemineau, P. (1998). Evidence that melatonin acts in the premammillary hypothalamic area to control reproduction in the ewe: presence of binding sites and stimulation of luteinizing hormone secretion by in situ microimplant delivery. *Endocrinology* **139** 1508-1516.
- Malpaux, B., Daveau, A., Maurice, F., Locatelli, A., Thiéry, J.C. (1994). Evidence that melatonin binding sites in the pars tuberalis do not mediate the photoperiodic actions of melatonin on LH and prolactin secretion in ewes. *J. Reprod. Fert.* **101**, 625-632.
- Malpaux, B., Skinner, D.C., y Maurice, F. (1995). The ovine pars tuberalis does not appear to be targeted by melatonin to modulate luteinizing hormone secretion, but may be important for prolactin release. *J. Neuroendocrinol* **7**, 199-206.
- Malpaux, B., Thiéry, J.C., y Chemineau, P. (1999). Melatonin and the seasonal control of reproduction. *Reproduction Nutrition Development, EDP Sciences*, **39** (3), pp.355-366.
- Malpaux, B., Viguie, C., Skinner, D.C., Thiéry, J.C., y Chemineau, P. (1997). Control of the circannual rhythm of reproduction by melatonin in the ewe. *Brain Res Bull* **44**, 431-438.
- McCracken, J.A. (1964). Progesterone in the body fat of the dairy cow. *Journal of Endocrinology* **28**, 339–340.
- McNeill, D.M., Murphy, P.M., y Lindsay, D.R. (1998). Blood lactose vs. milk lactose as a monitor of lactogenesis and colostrum production in Merino ewes. *Australian Journal of Agricultural Research* **49**, 581–587.
- Mellor, D.J., y Murray, L. (1985). Effects of maternal nutrition on udder development during late pregnancy and on colostrum production in Scottish Blackface ewes with twin lambs. *Research in veterinary science* **39**, 235-240
- Mellor, D.J., y Murray, L. (1986). Making the most of colostrum at lambing. *Vet. Rec.* **29;118**(13):351-3.
- Mellor, D.J. (1990). Meeting colostrum needs of new-born lambs. *In Practice*, pp. 239-244
- Meyer, A.M., Reed, J.J., Neville, T.L., Thorson, J.F., Maddock-Carlin, K.R., Taylor, J.B., Reynolds, L.P., Redmet, D.A., Luther, J.S., Hammer, C.J., Vonnahme, K.A., y Caton, J.S. (2011). Nutritional plane and selenium supply during gestation affect yield and nutrient composition of colostrum and milk in primiparous ewes. *Journal of Animal Science* **89**, 1627–1639

- Misztal, T., Romanowicz, K., y Barcikowski, B. (1996). Seasonal changes of melatonin secretion in relation to the reproductive cycle in sheep. *J. Anim Feed Sci.* **56**, 35-48.
- Misztal, T., Romanowicz, K., y Barcikowski, B. (1999). Melatonin modulation of the daily prolactin secretion in intact and ovariectomized ewes, relation to phase of the estrous cycle and to the presence of estradiol. *Neuroendocrinology.* **69**, 105-112.
- Misztal, T., Romanowicz, K., y Barcikowski, B. (1999). Melatonin modulation of the daily prolactin secretion in intact and ovariectomized ewes. *Neuroendocrinology* **69**, 105–112.
- Molik, E., Bonczar, G., Misztal, T., Żebrowska, A., y Zięba, D. (2012). The effect of the photoperiod and exogenous melatonin on the protein content in sheep milk. In 'Milk protein'. (Ed, Hurley WL).
- Molik, E., Bonczar, G., Żebrowska, Misztal, T., Pustkowiak, H., y Zieba, D. (2011). Effect of day length and exogenous melatonin on chemical composition of sheep milk. *Archiv fur Tierzucht* **54**, 177-187.
- Molik, E., Bonczar, G., Misztal, T., Żebrowska, A., Zięba, D. (2012). The Effect of the Photoperiod and Exogenous Melatonin on the Protein Content in Sheep Milk. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.5772/46101>
- Molik, E., Misztal, T., Romanowicz, K., y Wierchoś, E. (2006). The Influence of length day on melatonin secretion during lactation in asesonal sheep. *Arch. Tierz.* **49**, 359-364.
- Molik, E., Misztal, T., Romanowicz, K., y Wierchoś, E. (2007). Dependence of the lactation duration and efficiency on the season of lambing in relation to the prolactin and melatonin secretion in ewes. *Liv. Sci.* **107**, 220-226
- Molinero, P., Soutto, M., Benot, S., Hmadcha, A., y Guerrero, J.M. (2000). Melatonin is responsible for the nocturnal increase observed in serum and thymus of thymosin alpha1 and thymulin concentrations: observations in rats and humans. *Neuroimmunology* **103**, 180–188.
- Nelson, R.J. y Drazen, D.L. (1999). Melatonin mediates seasonal adjustments in immune function. *Reprod. Nutr. Dev.* **39**, 383–398.
- Neville, M.C., McFadden, T.B. y Forsyth, I. (2002). Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* **7**, 49–66
- Nickel, R., Schummer, A. y Seiferle, E. (1981). The Anatomy of the Domestic Animals. Berlin, Germany: Verlag Paul Parey
- Nizet, V., Ohtake, T., Lauth, X., Trowbridge, J., Rudisill, J., Dorschner, R.A., Pestonjamas, V., Piraino, J., Huttner, K. y Gallo, R.L. (2001). Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature* **414**(6862), 454-457.
- Nocek, J. E. y Tamminga, S. (1991). Site of digestion of starch in the gastrointestinal tract of dairy cows and its effect on milk yield and composition. *J. Dairy Sci* **74**, 3598–3629.
- O'Doherty, J.V. y Crosby, T.F. (1997). The effect of diet in late pregnancy on colostrum production and immunoglobulin absorption in sheep. *Animal Science* **64**, 87-96.
- Ontsouka, C.E., Bruckmaier, R.M. y Blum, J.W. (2003). Fractionized milk composition during removal of colostrum and mature milk. *Journal of Dairy Science* **86**, 2005–2011.

Oravcová, M., Peškovícová, D., Dano, J., Milerski, M., Hetényi, L. y Polák, P. (2006). Factors affecting milk yield and ewe's lactation curves estimated with test-day models. *Czech Journal of Animal Science* **50**, 483–490.

Paredi, G., Raboni, S., Bendixen, E., de Almeida, A.M. y Mozzarelli, A. (2012). "Muscle to meat" molecular events and technological transformations: *The proteomics insight*. *J. Proteomics* **75**(14), 4275-4289.

Parr, R.A., Davis, I.F., Miles, M.A. y Squires, T.J. (1993b). Liver blood flow and metabolic clearance rate of progesterone in sheep. *Research in Veterinary Science* **55**, 311–316.

Peaker, M., y Neville, M.C. (1991). Hormones in milk: chemical signals to the offspring's'. *J. Endocrinol.* **131**, 1-3

Pioli, C., Caroleo, M.C., Nistico, G. y Doria, G. (1993). Melatonin increases antigen presentation and amplifies specific and non specific signals for T-cell proliferation. *Int. J. Immunopharmacol.* **15**, 463–468.

Rawlings, N.D., Tolle, D.P. y Barrett, A.J. (2004). Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem. J.* **378**, 705-716.

Nowak, R. y Poindron, P. (2006). From birth to colostrum: early steps leading to lamb survival. *Reproduction Nutrition Development*, EDP Sciences **46**, pp.431-446.

Reiter, R.J. (1980). The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocr. Rev.* 109-131.

Reksen, O., Tverdal, A., Landsverk, K., Kommisrud, E., Boe, K.E. y Ropstad, E. (1999). Effects of photointensity and photoperiod on milk yield and reproductive performance of Norwegian Red cattle. *J Dairy Sci* **82**, 810-816.

Sánchez, L., Luján, L., Oria, R., Castillo, H., Pérez, D., Ena, J.M. y Calvo, M. (1992). Synthesis of lactoferrin and transport of transferrin in the lactating mammary-gland of sheep. *J. Dairy Sci.* **75**(5), 1257-1262.

Schams, D., Rüsse, I., Schallenberger, E., Prokopp, S. y Chan, J.S.D. (1984). The role of steroid hormones, prolactin and placental lactogen on mammary gland development in ewes and heifers. *Journal of Endocrinology* **102**, 121–130

Serment, A., Schmidely, P., Giger-Reverdin, S., Chapoutot, P. y Sauvant, D. (2011). Effects of the percentage of concentrate on rumen fermentation, nutrient digestibility, plasma metabolites, and milk composition in mid-lactation goats. *Journal of Dairy Science* **94**, 3960–3972

Seron-Ferre, M., Reynolds, H., Mendez, N.A., Mondaca, M., Valenzuela, F., Ebensperger, R., Valenzuela, G.J., Herrera, E.A., Llanos, A.J. y Torres-Farfan, C. (2015). Impact of maternal melatonin suppression on amount and functionality of brown adipose tissue (BAT) in the newborn sheep. *Frontiers in Endocrinology* **5**, Article 232.

Smith, W. D., Wells, P.W., Burrells, A. y Dawson, A. (1976). Maternal immunoglobulins and parainfluenza 3 virus inhibitors in nasal and lachrymal secretions and serum of newborn lambs. *Cli. Exp. Immuno* **23**, 544-553.

Swanson, T.J., Hammer, C.J., Luther, J.S., Carlson, D.B., Taylor, J.B., Redmer, D.A., Neville, T.L., Reed, J.J., Reynolds, L.P., Caton, J.S. y Vonnahme, K.A. (2008). Effects of gestational plane of nutrition and selenium

supplementation on mammary development and colostrum quality in pregnant ewe lambs. *Journal of Animal Science* **86** 2415–2423

Tizard, I. (1992). *Veterinary Immunology: An introduction*. 4th Ed., W. B. Saunders Company, London. pp: 248-257.

Torres-Farfan, C., Valenzuela, F.J., Mondaca, M., Valenzuela, G.J., Krause, B., Herrera, E.A., Riquelme, R., Llanos, A.J. y Seron-Ferre, M. (2008). Evidence of a role for melatonin in fetal sheep physiology: direct actions of melatonin on fetal cerebral artery, brown adipose tissue and adrenal gland. *The Journal of Physiology*. **586**, 4017-4027.

Tsingotjidou, A.S. y Papadopoulos, G.C. (2008). The milk-ejection reflex in the sheep: an anatomical study on the afferent pathway. *Anatomia Histologia Embryologia*. **37**, 245–250

Vaughan, M.K. y Reiter, R.J. (1971). *Tex. Rep. Biol. Med.* 29, 579–586.

Yang, D., Biragyn, A., Kwak, L.W. y Oppenheim, J.J. (2002). Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends. Immunol.* **23**(6), 291-296.

Zaiou, M. y Gallo, R. (2002). Cathelicidins, essential gene-encoded mammalian antibiotics. *J. Mol. Med.* **80**(9), 549-561

Zamiri, M.J., Qotbi, A. y Izadifard, J. (2001). Effect of daily oxytocin injection on milk yield and lactation length in sheep. *Small Ruminant Research*. **40**, 179–185

Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**(6870), 389-395.

Zúñiga, O., Forcada, F., Abecia, J.A. (2002). The effect of melatonin implants on the response to the male effect and on the subsequent cyclicity of Rasa Aragonesa ewes implanted in April. *Animal Reproduction Science* **72**, 165-174.