



Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza



# Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Factores sociales y lumínicos que afectan al desencadenamiento de la pubertad  
del morueco

Social and light factors affecting the ram puberty outbreak

Autor/es

Ana Isabel García Malo y Marianne Gave

Director/es

José Alfonso Abecia Martínez

Facultad de Veterinaria

2018-2019

# ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b>	<b>2</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	<b>7</b>
<b>4. METODOLOGÍA</b>	<b>9</b>
4.1. Animales y procedimientos experimentales	9
4.2. Análisis hormonal	11
4.3. Test de comportamiento sexual	11
4.4. Análisis estadístico	14
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>15</b>
5.1. Peso vivo	15
5.2. Concentraciones de T plasmática	15
5.3. Perímetro escrotal	17
5.4. Test de comportamiento sexual individual	18
5.5. Test de comportamiento sexual grupal y fertilidad	19
<b>6. DISCUSIÓN</b>	<b>21</b>
6.1. Discusión de los métodos utilizados	21
6.2. Discusión de los resultados	22
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>25</b>
<b>8. VALORACIÓN PERSONAL</b>	<b>26</b>
8.1. Valoración de Ana Isabel García Malo	26
8.2. Valoración de Marianne Gave	26
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>27</b>

## **1. RESUMEN**

Se ha estudiado el efecto los factores sociales y lumínicos que afectan al desencadenamiento de la pubertad en cuarenta corderos nacidos en otoño, así como en su actividad sexual y en su fertilidad cuando alcanzan los 8 meses de edad. Los animales fueron asignados a cuatro grupos ( $n=10$ ): FA, expuestos a 2 meses de días largos (15 de enero a 15 de marzo); SAR, alojados con tres machos adultos sexualmente activados desde el 15 de marzo al 20 de junio; NAR, alojados con tres machos adultos no activados; y Control (C), aislados de los de los moruecos adultos durante todo el experimento. A mediado de junio se realizan pruebas de comportamiento sexual tanto individuales como grupales. Los niveles medios de testosterona plasmática (ng/ml) a lo largo del experimento fueron mayores ( $P < 0,001$ ) en los grupos C ( $4,4 \pm 0,2$ ) y SAR ( $4,3 \pm 0,2$ ) que en los grupos FA ( $3,4 \pm 0,2$ ) y NAR ( $3,4 \pm 0,2$ ). En los test comportamentales, los corderos del grupo C mostraron un mayor número de manifestaciones sexuales ( $P < 0,05$ ). Las tasas de fertilidad de las ovejas cubiertas con corderos de los grupos SAR (90%) o C (100%) son más altas ( $P < 0,01$ ) que las de las ovejas cubiertas con FA (50%) y NAR (40%). En conclusión, los corderos nacidos en otoño y criados en aislamiento de sus congéneres adultos tuvieron una mayor actividad sexual y fertilidad a los 8 meses de edad, lo que sugiere que no es necesaria una estrategia de cría especial para inducir la pubertad en estos corderos.

## **SUMMARY**

Study of the social and light factors that affect the ram puberty outbreak in forty autumn-born ram-lambs, as well as in their sexual activity and in their fertility when they reach 8 months of age. The animals were assigned to one of the following four groups ( $n=10$ ): FA, which were exposed to 2 months of long days (15 January-15 March); SAR, which were housed with three Sexually Activated adult Rams from 15 March to 20 June; NAR, housed with three Non-activated adult Rams; and Control (C), kept isolated from adult rams throughout the experiment. In mid-June, individual and group ram serving-capacity tests were performed. Mean plasma testosterone levels (ng/ml) throughout the experiment were higher ( $P < 0.001$ ) in the C ( $4.4 \pm 0.2$ ) and SAR ( $4.3 \pm 0.2$ ) groups than in the FA ( $3.4 \pm 0.2$ ) and NAR ( $3.4 \pm 0.2$ ) groups. In the serving tests, control ram-lambs executed a higher total mean number of sexual events than the other groups ( $P < 0.05$ ). Fertility rates of SAR (90%) or C-mated ewes (100%) were higher ( $P < 0.01$ ) than ewes mated by the FA (50%) and NAR (40%) ram-lambs. In conclusion, autumn-born lambs reared in isolation from adult congeners had the highest sexual activity and fertility at 8 months of age, which suggests that no special strategy is necessary to induce puberty in these rams.

## **2. INTRODUCCIÓN**

Este experimento se centra en el estudio de los factores sociales y lumínicos que afectan al desencadenamiento de la pubertad del morueco.

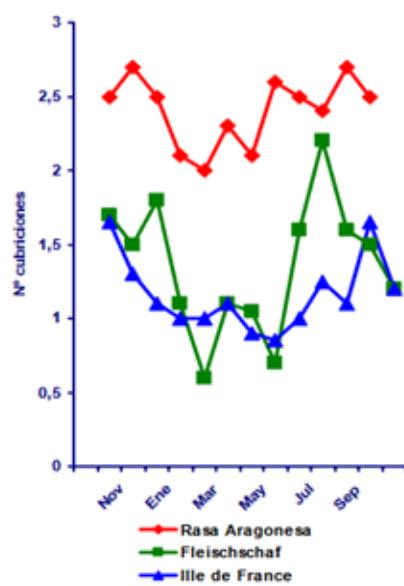
La pubertad se define como el momento en el que los animales liberan por primera vez células germinales maduras. Un requisito esencial para que se inicie es que el cordero alcance un determinado peso: en la especie ovina (*Ovis aries*) este se sitúa en torno a los 40 kg, que corresponde a una edad de 7-8 meses (Foster et al., 1986). El morueco de Rasa Aragonesa produce espermatozoides desde los 5 meses de edad, pero éstos todavía son infériles. A medida que crece aumenta la producción cuantitativa y cualitativa de semen. A los 9 meses produce ya el 50% de espermatozoides de un adulto, pero hasta los 2 años no puede considerarse que el macho sea maduro sexualmente. Por lo tanto, aunque el morueco joven está capacitado para la cubrición, a efectos prácticos, su capacidad reproductiva debe ser considerada como la mitad de la de un adulto (Folch et al., 2007).

Uno de los acontecimientos fundamentales para el inicio de la pubertad implica un incremento de la síntesis y liberación de la GnRH (*Gonadotropin-Releasing Hormone*) desde el hipotálamo, con un ritmo pulsátil. Antes de la pubertad, la secreción de GnRH y de gonadotropinas es menor porque el hipotálamo es muy sensible a la inhibición por los esteroides gonadales. La pérdida de sensibilidad a dicha inhibición por los estrógenos se produce hacia las 15 semanas de edad en los corderos machos. Para muchos de ellos, esto ocurre durante el fotoperiodo largo (primavera-verano). La espermatogénesis suele desencadenarse en esta época, sin embargo, debido a la duración de este proceso, generalmente los corderos no son capaces de aparearse antes de las 30 semanas de edad o más, coincidiendo con la pubertad de las hembras. Los principales factores que afectan a la edad de la pubertad en los animales domésticos son la raza, el aporte de energía y la época de nacimiento (Klein, 2013).

En los rumiantes, el tamaño testicular también es un indicador fiable de la edad de inicio de la pubertad y del porcentaje de túbulos seminíferos donde se producen las células sexuales maduras (Yarney et al., 1990). Dentro de la misma especie, tanto la raza como el individuo determinan el tamaño de los testículos, pudiendo también influir sobre la producción espermática diaria. Este tamaño no se puede medir directamente, por lo que a los rumiantes se les aplica una medición especial que es la circunferencia escrotal. Así pues, el tamaño escrotal tiene que ver con la especie, la raza, la edad y el índice del estado corporal. Cada gramo de parénquima testicular normal produce la misma cantidad de espermatozoides de acuerdo con la especie, con lo cual los machos con los testículos más grandes producirán más espermatozoides que los de la misma especie y edad que los tienen más pequeños (Klein, 2013).

Uno de los factores ambientales más importantes que regula la estacionalidad sexual en la especie ovina es el fotoperíodo. El resultado de este efecto del fotoperíodo es que podemos diferenciar períodos de actividad sexual continua (época de actividad sexual) y períodos de inactividad sexual (anestro estacional). En ovino, el fotoperíodo decreciente actúa de forma positiva, desencadenando el inicio de la temporada reproductiva. La respuesta positiva al cambio del fotoperíodo suele producirse relativamente rápido después del solsticio de verano (1-2 meses) mientras que una respuesta negativa requiere mayor tiempo antes de que se observen los cambios (2-4 meses después del solsticio de invierno). En función de la raza, la temporada reproductiva puede alargarse en mayor o menor medida, pero suele expandirse desde finales de julio hasta febrero o marzo (Klein, 2013).

Las razas mediterráneas, como la Rasa Aragonesa, tienen un período de anestro más corto que las razas del norte de Europa. Por ejemplo, el morueco de la raza Rasa Aragonesa es capaz de realizar un 40% más de cubriciones en primavera que el Ile de France o el Fleischschaf (Folch et al., 2007) (Figura 1).



**Figura 1.** Nº de cubriciones/10 minutos del morueco Rasa Aragonés, Fleischschaf e Ile de France. El Rasa Aragonés mantiene una actividad sexual más alta y menos estacional que las otras dos razas (Folch et al., 2007).

De esta manera, los días cortos (otoño-invierno) estimulan su actividad reproductiva mientras que los días largos (primavera-verano) la inhiben (Karsch et al., 1984; Lincoln y Short, 1980). Así pues, la especie ovina se ha adaptado para tener el período de reproducción en otoño, con el fin de que los

partos coincidan con la primavera, que es la época más adecuada para la supervivencia de las crías (Folch et al., 2007).

El principal intérprete del fotoperiodo es la glándula pineal (epífisis), que produce melatonina en respuesta a la oscuridad. La melatonina actúa en diferentes lugares hipotalámicos donde existen receptores a la misma, de manera que hay redes neuronales que conectan dichos lugares con las células neurosecretoras de GnRH. Estas células, a pesar de estar diseminadas en el hipotálamo, son capaces de actuar de forma sincronizada produciendo pulsos de GnRH, lo cual nos permite elaborar el concepto de “generador de pulsos de GnRH”. La actividad de este generador de pulsos puede medirse gracias a la frecuencia de pulsos de LH en la sangre (Klein, 2013).

Sin embargo, no solo el fotoperiodo es responsable del inicio o cese de la época de la actividad sexual, sino que los factores sociales también ejercen un papel significativo. En cabras y ovejas, la introducción de machos en un rebaño de hembras en anestro estacional resulta en la activación de la secreción de LH y en una posterior ovulación (Chemineau, 1983; Martin et al., 1986).

En ovino, el factor social más importante es el llamado efecto macho (Underwood et al., 1944) que se produce tras la reintroducción de los machos, previamente separados y aislados durante un periodo mínimo de 4 semanas, al rebaño de ovejas en anestro estacional. Este efecto se emplea para adelantar la temporada reproductiva en los rebaños (Gordon, 1997) y como forma alternativa al uso de tratamiento hormonales.

Aunque las feromonas del morueco son el principal estímulo del efecto macho, la intensidad del comportamiento sexual mostrado por éste influye en la calidad de la respuesta (Perkins et al., 1994). La exposición durante 2 meses a días largos (16 horas/día) activa eficazmente el comportamiento del morueco, adelanta la pubertad de corderos macho, incrementa de forma sustancial la producción de esperma en adultos y causa un aumento significativo del peso testicular (Chemineau et al., 1992). Esto se explica debido a que, tras ser devueltos a fotoperiodo natural después del tratamiento lumínico de 45 días, los machos lo interpretan como una disminución de la duración del día, estimulando así su actividad reproductiva.

El uso de estos machos activados sexualmente por el manejo del fotoperiodo artificial puede mejorar la respuesta de las ovejas a la reintroducción del macho, siendo capaces de estimular un mayor porcentaje de ovejas en ovulación. Se ha demostrado que el contacto permanente con estos machos sexualmente activos impide la aparición del anestro estacional en las hembras, permitiendo que se mantengan cíclicas todo el año (Abecia et al., 2015).

Por otro lado, la presencia continua de machos activados sexualmente en primavera es capaz de adelantar la pubertad de corderas nacidas en septiembre, salvando por tanto el freno que el fotoperiodo impone normalmente a las corderas nacidas en otoño, que tienen un desarrollo corporal y una edad adecuada para la aparición de la pubertad, pero que es obstaculizado por dicha situación fotoperiódica (Abecia et al., 2016).

Estos machos también son capaces de adelantar de manera significativa la actividad ovárica y estral de ovejas paridas en invierno y destetadas al inicio de la primavera, salvando una vez más el anestro estacional impuesto por el fotoperiodo y el anestro post-parto (Abecia et al., 2017a).

Así pues, la inducción de la actividad sexual en las hembras mediante la presencia de machos activados viene medida por un aumento de sus niveles de testosterona en primavera, alcanzando niveles similares a los de la época reproductiva, y de una mayor actividad sexual de los machos tratados. Estos resultados se consiguen tanto si se usan implantes de melatonina como si no (Abecia et al., 2017b).

Los corderos que participan en este estudio han nacido a lo largo de la segunda semana de octubre, con lo cual han alcanzado una edad de 15 semanas a lo largo de la tercera semana de enero, y las 30 semanas de edad durante la segunda semana de mayo. Por lo tanto, han alcanzado la edad de la pubertad durante el periodo de anestro correspondiente a su raza, cuando las tasas de melatonina inhiben la generación de pulsos de GnRh y LH (éstos no permiten eliminar el feedback negativo producido por los estrógenos), retrasando así la pubertad de estos animales. En un sistema de producción esta situación representa un problema: estos machos empezarán su vida reproductiva con una edad más avanzada que otros nacidos en primavera, por lo que suponen un gasto adicional para el ganadero. Un estudio (Courot et al., 1975) ilustra este fenómeno y confirma que los niveles de LH plasmática y el tamaño testicular de los corderos nacidos en otoño son menores que los de corderos de la misma edad, nacidos en primavera.

Una forma de esquivar este efecto sería usar el efecto macho con estos corderos, cuando llegan a la edad de la pubertad, en el periodo de anestro de su raza. La presencia de machos activados sexualmente (según el protocolo ya establecido en estudios anteriores) podría activar el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal de los corderos, de la misma forma que lo hacen con hembras en anestro o en corderas de la misma especie.

### **3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

Este estudio se realiza en un contexto de cuestionamiento por parte de la sociedad de las prácticas de ganadería, de su sostenibilidad y de su impacto sobre la salud pública y el medio ambiente.

El cambio en el hábito de los consumidores a nivel mundial está teniendo un impacto importante en el mercado y en la ganadería: cada día hay una mayor demanda de productos que son limpios, verdes y éticos (“*clean, green and ethical*”). Esto podría acarrear una mayor complejidad en el manejo, pero la comunidad científica trabaja para conseguir una mejor comprensión de la fisiología y del comportamiento de los animales de producción, desarrollando nuevos protocolos reproductivos y de alimentación que faciliten el trabajo de los ganaderos. Por lo tanto, el objetivo consiste en mejorar la productividad y rentabilidad a la vez que se favorece una producción más limpia, verde y ética.

Con “limpia” se refiere a que se tendrían que buscar maneras de reducir el uso de fármacos, productos químicos y hormonas hasta, quizás, poder eliminarlo por completo. Esta demanda viene generada por los consumidores, aunque no siempre está justificada en hechos científicos objetivos. De hecho, los tratamientos hormonales no suelen dejar residuos, especialmente si se respetan los tiempos de espera. Además, es relativamente fácil demostrar qué productos, proviniendo de animales que no han recibido este tipo tratamiento, pueden contener tasas altas de alguna hormona como, por ejemplo, los esteroides en la leche de vaca. Por otro lado, el hecho de que los consumidores busquen productos modernos y de alta calidad permite a los ganaderos obtener un mayor beneficio económico.

En el concepto “verde” hay que considerar el impacto de la industria en el medio ambiente con el objetivo de minimizarlo y de incrementar su sostenibilidad a largo plazo. En ganadería, los problemas más importantes son la producción de gases de efecto invernadero por parte de los rumiantes y de gran cantidad de estiércol en ganadería intensiva, así como el uso excesivo de fertilizantes en agricultura a partir de la que se obtienen materias primas dirigidas a la alimentación animal. La necesidad de reducir este impacto ambiental debe implicar a toda la industria alimentaria, por ejemplo: transporte, mataderos, fábricas de leche, etc. De hecho, una industria “verde” favorece la buena imagen de los productos de origen animal en regiones desarrolladas económicamente, al mismo tiempo que garantiza el futuro de la ganadería a largo plazo.

“Ética”, pues el bienestar animal es una preocupación importante para todas las industrias que trabajan en un mercado cada vez más sofisticado, en el que los consumidores exigen que los productos provengan de animales que hayan sido cuidados de manera adecuada. Esto puede suponer

un problema muy complejo, ya que al buscar una imagen más “limpia”, por ejemplo, evitando o reduciendo el uso de antibióticos, podría comprometerse el bienestar animal. Además, la aplicación de medidas éticas debe ir más allá del bienestar animal, también debe incluir los aspectos “limpios y verdes” del transporte, procesado, envasado y marketing de los productos (Martin y Kadokawa, 2006).

Este estudio, basado en la activación sexual de machos de raza Rasa Aragonesa gracias a la manipulación del fotoperiodo y el posterior uso de estos machos “activados” para provocar el efecto macho, va dirigido a este tipo de demanda. Por lo tanto, funcionaría como una alternativa sostenible de manejo frente al uso de hormonas (Abecia et al., 2017b) y permitiría una reducción de los costes de producción resultando útil tanto en ganadería ecológica como en sistemas de producción más convencionales.

## **4. METODOLOGÍA**

El experimento se realiza en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza (41°40'N). La Comisión Ética para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza da su aprobación para todo el protocolo que se sigue en el presente estudio. Los animales se cuidan y se usan según la normativa española para la protección animal (RD 1201/05), que cumple con la Directiva de la Unión Europea 2010/63 sobre la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

### **4.1. Animales y procedimientos experimentales**

A mitades de enero, cuarenta corderos de raza Rasa Aragonesa con un peso vivo (PV± Desviación Estándar o DE) medio de  $29 \pm 6$  kg, nacidos durante la segunda quincena de octubre (fecha media de nacimiento: 19 de octubre  $\pm 10$ ) se dividieron en cuatro grupos de 10 animales cada uno: grupo FA, expuestos a un fotoperíodo artificial de días largos, es decir, 16 horas de luz al día durante dos meses (del 15 de enero al 15 de marzo); grupo SAR, alojados con 3 machos adultos activados sexualmente desde el 15 de marzo hasta el final del experimento; grupo NAR, alojados con 3 moruecos no activados sexualmente a partir del 15 de marzo hasta finalizar el estudio; y grupo C o “control”, aislados de los moruecos machos adultos durante todo el experimento.

La actividad sexual de los tres moruecos alojados con los corderos SAR se induce mediante su exposición a un fotoperíodo de días largos (16 horas de luz/ día) a partir del 15 de enero hasta el 15 de marzo. La iluminación se controla gracias a un programador electrónico y la intensidad luminosa es de 300 lux (mínimo) a nivel de los ojos de los animales (Figura 2). Tras finalizar este procedimiento, tanto los corderos FA como los machos adultos vuelven a un fotoperíodo natural, simulando así que se encuentran en una época óptima para la reproducción con fotoperíodo decreciente (días más cortos).



**Figura 2.** Activación sexual de los machos adultos, mediante fotoperíodo artificial de días largos (16h de luz/ día), con una intensidad de 300 lux al nivel de los ojos.

A partir del 12 de enero, Marianne Gave se responsabilizó de tomar muestras individuales de sangre cada semana con el fin de determinar la concentración plasmática de testosterona (T) de los animales. Las muestras de sangre de los machos adultos se recogen de forma mensual. Además, Ana Isabel García Malo se responsabilizó de las mediciones del perímetro escrotal y Marianne Gave del PV de los animales cada quince días, hasta el 13 de junio (Figura 3).



**Figura 3.** Pesaje quincenal de los corderos.

Para la extracción de las muestras de sangre se emplearon tubos heparinizados, lo que permite que tras su centrifugación se pueda extraer el plasma (Figura 4), congelarlo y enviarlo a la Unidad de Fisiología de la Reproducción y de los Comportamientos del INRA (Institut National pour la Recherche Agronomique) en Francia (Nouzilly) para su análisis.



**Figura 4.** Muestras de plasma, registradas y preparadas para la congelación.

En el caso de la medida de los perímetros testiculares, existen dos técnicas para su valoración: la cinta métrica o por volumen de agua desalojado. En este estudio se ha decidido emplear el primero, ya que proporciona una medida más fiable (Figura 5). Para el pesaje de los corderos se emplea una

báscula cuya precisión ha sido comprobada con pesas homologadas de AENOR (Asociación Española de Normalización y Certificación).



**Figura 5.** Medida de perímetro testicular mediante el método de la cinta métrica.

Todos estos datos son recogidos y trasladados a un documento Excel. A partir de estos, se elaboran tablas y gráficas que permiten el estudio y la comprensión de los resultados.

#### **4.2. Análisis hormonal**

La concentración plasmática de T ha sido medida por radioinmunoensayo (RIA) (Hochereau-de Reviers et al., 1990). El RIA es un tipo de método que se basa en la competencia existente entre un anticuerpo no marcado y una cantidad conocida del antígeno marcado para formar los complejos AgAc o Ag\*Ac. Con estos tres componentes (Ag, Ag\* y Ac) puede realizarse el ensayo en el que, manteniendo constantemente la cantidad de Ag\* y Ac, se observará que a mayor cantidad de Ag menos Ag\* queda unido a la cantidad fija de Ac (y, por tanto, se medirá menos radioactividad), lo que permitirá relacionar la radioactividad con la concentración de Ag (Berson et al., 1952).

La sensibilidad de la técnica es de 0,3 ng/ml. Las muestras se han procesado por análisis único (Coeficiente de variación intra-ensayo= 6%).

#### **4.3. Test de comportamiento sexual**

A mitad de junio, cuando los corderos alcanzaron la edad de ocho meses, cuarenta ovejas adultas de raza Rasa Aragonesa recibieron un tratamiento con progestágenos intravaginales (Syncro-Part®, CEVA Salud Animal) inhibiendo la secreción preovulatoria de gonadotropinas con el fin de producir un estro sincronizado. Después de 12 días se quitaron las esponjas y cada oveja recibió una

inyección de 300 UI de eCG vía intramuscular (Syncro-Part® PMSG, CEVA Salud Animal, España). Cuarenta y ocho horas después (día 20 de junio), estas ovejas se usaron para realizar un test de capacidad de monta con los corderos (Kilgour y Whale, 1980; Damián et al., 2015), bajo la responsabilidad de Ana Isabel García Malo.

Estos test consisten en que, durante 20 minutos, cada cordero está expuesto a 5 ovejas en celo en un box de 15 m<sup>2</sup>. En el transcurso de este tiempo, se registra el número de *flehmen* (elevación de la cabeza y del labio superior en respuesta al contacto y al olor de la orina de la oveja o al olor del ambiente), olfateo ano-genital (olisqueo en la zona genital de la oveja) (Figura 6), aproximaciones (roce, lamido y/o mordisqueo superficial del flanco de la oveja con intensidad y pasión) (Figura 7), pataleo (el macho se encuentra detrás de la oveja y le patea los flancos con una de las extremidades anteriores) (Figura 8), intento de monta (se encuentra detrás de la oveja haciendo movimientos con la intención de copular y, posteriormente, coloca las dos extremidades anteriores sobre la oveja, pero no se encuentra en una posición estable) (Figura 9) y monta (introducción del pene en la vagina de la oveja, con uno o más empujones, y con eyaculación posterior caracterizada por la elevación de la cabeza del macho hacia atrás). Estos acontecimientos sexuales han sido descritos por Calderón-Leyva et al. (2018). Cada cordero está expuesto a un número total de 5 ovejas y, además, se testan dos corderos del mismo grupo a la vez (cuadras adyacentes) para reducir el efecto negativo que pudiese tener la presencia de corderos de otros grupos.



**Figura 6.** Olfateo ano-genital, mostrado durante un test de comportamiento.



**Figura 7.** Aproximación del morueco a la oveja, mostrado durante el test de comportamiento.



**Figura 8.** Pataleo por parte del macho a la oveja, mostrado durante el test de comportamiento.



**Figura 9.** Intento de monta, mostrado durante el test de comportamiento.

Los resultados obtenidos durante los test de comportamiento se registran (Figura 10) y, posteriormente, son trasladados en una hoja de cálculo en el programa informático Microsoft® Excel, para su organización y elaboración de gráficas. Para el análisis estadístico de los datos obtenidos se recurre al software SPSS®.

MACHO NUMERO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
FLEHMEN																				
OLFATEO VULVA	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
APROXIMACIONES	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
PATADAS																				
MOSTRAR PENE																				
ORINA																				
INTENTO MONTA	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
GOLPE DE RIÑON																				

MACHO NUMERO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
FLEHMEN																				
OLFATEO VULVA																				
APROXIMACIONES																				
PATADAS																				

**Figura 10.** Hoja de registro utilizada durante los test de comportamiento individual.

Después del test de capacidad individual para la monta, los corderos permanecieron en grupos con diez ovejas asignadas y sólo se registraron las montas o intentos de monta para cada grupo observado. Tras esta etapa, los corderos tuvieron la posibilidad de montar las ovejas durante 48 h y 5 meses después se recogió la tasa de fertilidad para cada grupo de corderos.

Finalmente, y una vez obtenidos todos los datos junto con sus respectivas gráficas, se utilizarán buscadores web como Alcorze, Pubmed o Google Académico, además de libros y artículos de carácter científico, para comprender y discutir lo estudiado.

#### **4.4. Análisis estadístico**

Los efectos del tiempo y del método de crianza en el PV, perímetro escrotal y concentración plasmática de T han sido evaluados estadísticamente con el procedimiento GLM (*Generalized linear model*) para medidas repetidas (SPSS v. 21). Para comparar los valores medios de T antes y después del 15 de marzo, cuando los moruecos SAR y NAR han sido introducidos y cuando los corderos FA han vuelto al fotoperiodo natural, se han empleado t-tests pareados.

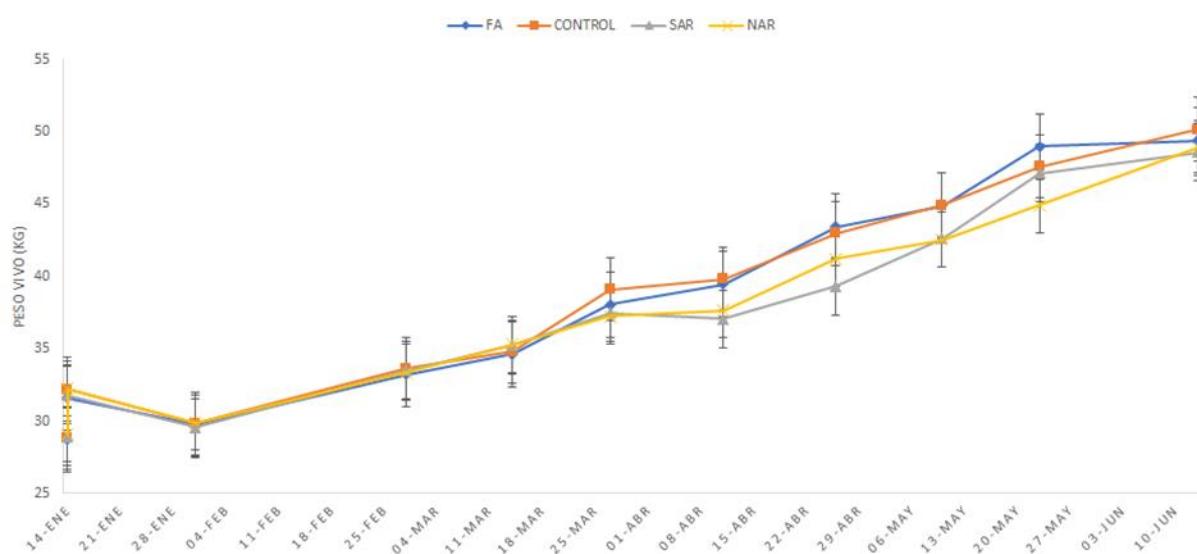
Para establecer el nivel de significación estadístico de las diferencias entre las tasas de fertilidad se ha recurrido a la prueba de Chi-cuadrado.

Los resultados se expresan como la media ± SEM (Error Estándar de la Media) y se considera que los resultados son estadísticamente significativos a partir de P <0,05.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Peso vivo

Las diferencias de peso vivo entre los grupos FA, C, SAR y NAR son prácticamente nulas desde enero hasta mitad de marzo, a partir del cual se empieza a observar un ligero distanciamiento (Figura 11). El peso vivo medio y final al comienzo del experimento fue de  $28,89 \pm 0,44$  kg, mientras que al finalizar los animales había alcanzado una media de  $49,75 \pm 0,88$  kg. No hubo efecto de los factores estudiados.

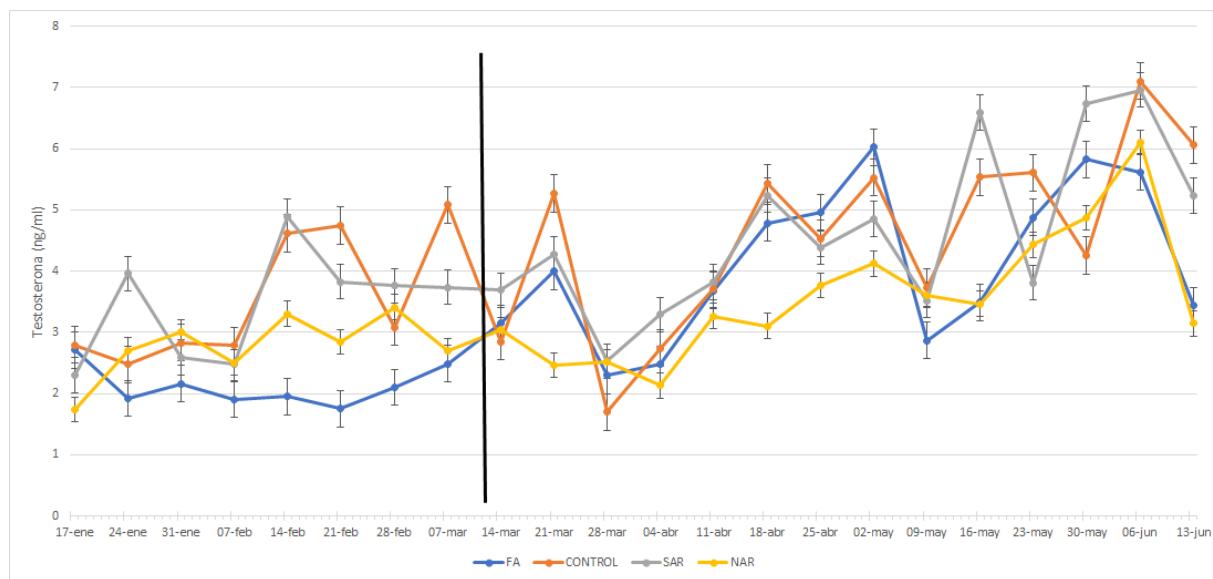


**Figura 11.** Evolución del peso vivo (PV) medio (kg) en corderos de raza Rasa Aragonesa, nacidos en octubre, que han sido expuestos a dos meses de días largos con 16 horas de luz al día entre el 15 de enero y el 15 de marzo (FA); o que han sido alojados con tres machos adultos activados sexualmente (SAR) o bien con tres moruecos no activados sexualmente (NAR) desde el 15 de marzo hasta el final del experimento; y aislados de adultos durante todo el experimento (Control). La activación de los tres machos adultos se ha llevado a cabo mediante su exposición a días largos (16 horas/día) desde el 15 de enero hasta el 15 de marzo.

### 5.2. Concentraciones de T plasmática

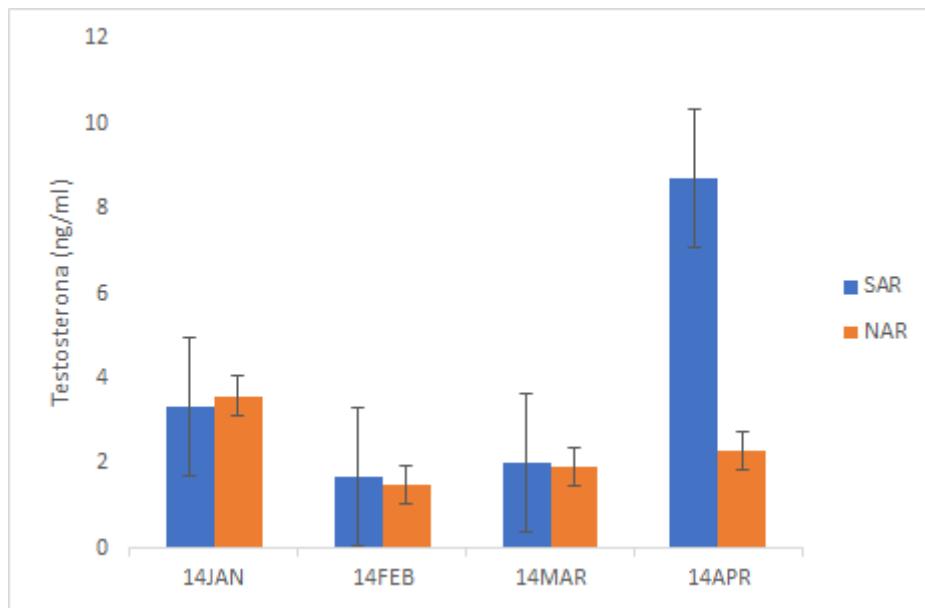
El manejo prepuberal afectó significativamente a los niveles de T plasmáticos de los corderos ( $P<0,001$ ). Así pues, se observa que los niveles medios de T en plasma a lo largo del estudio son más elevados en los grupos C ( $4,4 \text{ ng/ml} \pm 0,2$ ) y SAR ( $4,3 \text{ ng/ml} \pm 0,2$ ) en comparación con los grupos FA ( $3,4 \text{ ng/ml} \pm 0,2$ ) y NAR ( $3,4 \text{ ng/ml} \pm 0,2$ ).

También se observan fluctuaciones en la concentración de T durante el experimento. Los corderos del grupo FA presentan niveles más bajos que los del grupo SAR y C, con cuatro meses de edad, a pesar de que los cuatro grupos muestran un aumento gradual en los niveles de T. Sin embargo, al final del experimento (junio) en todos los grupos, salvo en el grupo C, se ha producido un descenso en los niveles de T plasmática (FA:  $3,1 \pm 0,2$ ; SAR:  $3,9 \pm 0,2$ ; NAR:  $4,7 \pm 0,2$ ; C:  $6,03 \pm 0,2$ ;  $P < 0,001$ ) (Figura 12).



**Figura 12.** Evolución de la concentración plasmática media ( $\pm$ SEM) de testosterona (ng/ml) en corderos de raza Rasa Aragonesa, nacidos en octubre, que han sido expuestos a dos meses de días largos con 16 horas de luz al día entre el 15 de enero y el 15 de marzo (FA); o que han sido alojados con tres machos adultos activados sexualmente (SAR) o bien con tres moruecos no activados sexualmente (NAR) desde el 15 de marzo hasta el final del experimento; y aislados de adultos durante todo el experimento (Control). La activación de los tres machos adultos se ha llevado a cabo mediante su exposición a días largos (16 horas/día) desde el 15 de enero hasta el 15 de marzo.

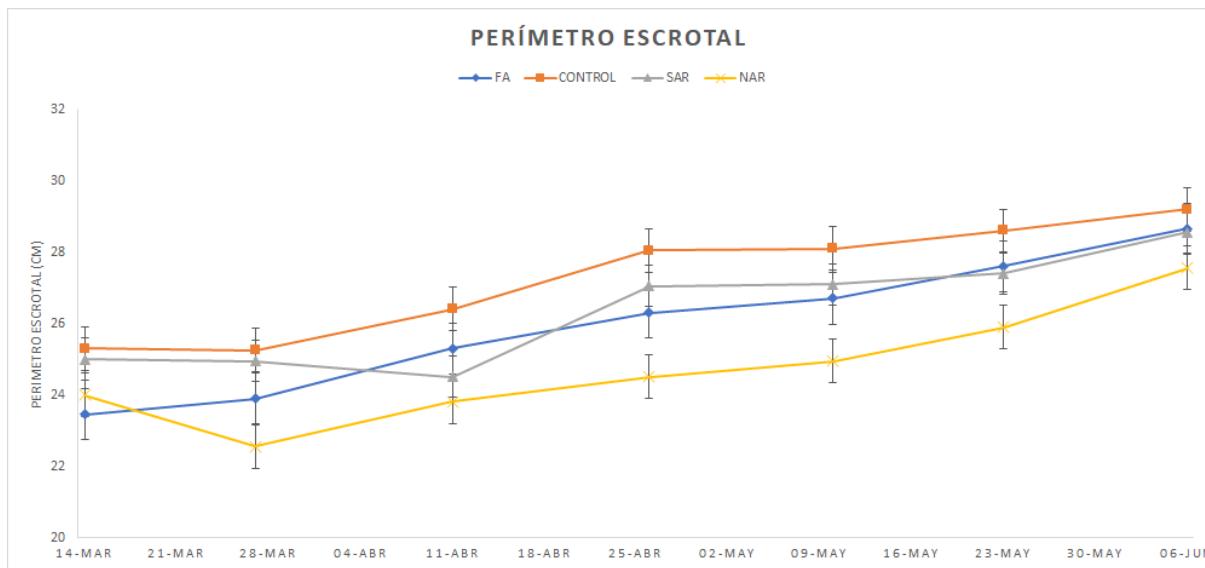
Se observan concentraciones similares de T plasmática entre los moruecos durante los dos meses de tratamiento lumínico del grupo SAR (15 enero-15 marzo). Sin embargo, un mes después (15 de abril) los machos SAR presentan niveles significativamente más altos que los del grupo NAR ( $P < 0,01$ ) (Figura 13).



**Figura 13.** Concentración plasmática de testosterona (ng/ml) media ( $\pm$ SEM) en moruecos de raza Rasa Aragonesa en los que su actividad sexual ha sido inducida mediante su exposición a días largos (16 horas/día) desde el 15 de enero hasta el 15 de marzo.

### 5.3. Perímetro escrotal

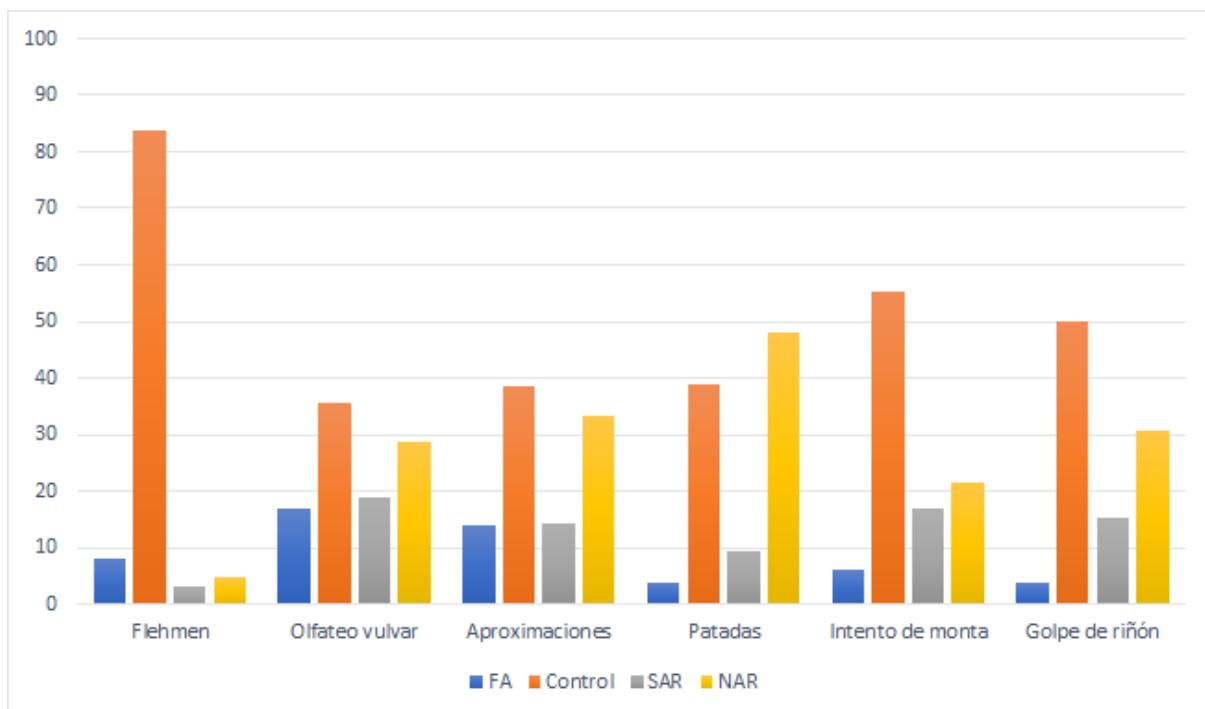
Se observó una diferencia significativa de perímetro escrotal entre los distintos grupos ( $P<0,01$ ). A lo largo del estudio, los corderos NAR presentaron un crecimiento testicular menor que el resto de grupos. Sin embargo, en los cuatro grupos se produjo un aumento gradual de sus perímetros para alcanzar unos tamaños similares en el último mes (FA:  $28,6 \pm 0,6$ ; SAR:  $28,6 \pm 0,5$ ; NAR:  $27,6 \pm 1,2$ ; C:  $29,2 \pm 0,6$  cm) (Figura 14).



**Figura 14.** Evolución del perímetro escrotal (cm) medio ( $\pm$ SEM) en corderos de raza Rasa Aragonesa, nacidos en octubre, que han sido expuestos a dos meses de días largos con 16 horas de luz al día entre el 15 de enero y el 15 de marzo (FA); o que han sido alojados con tres machos adultos activados sexualmente (SAR) o bien con tres moruecos no activados sexualmente (NAR) desde el 15 de marzo hasta el final del experimento; y aislados de adultos durante todo el experimento (Control). La activación de los tres machos adultos se ha llevado a cabo mediante su exposición a días largos (16 horas/día) desde el 15 de enero hasta el 15 de marzo.

#### 5.4. Test de comportamiento sexual individual

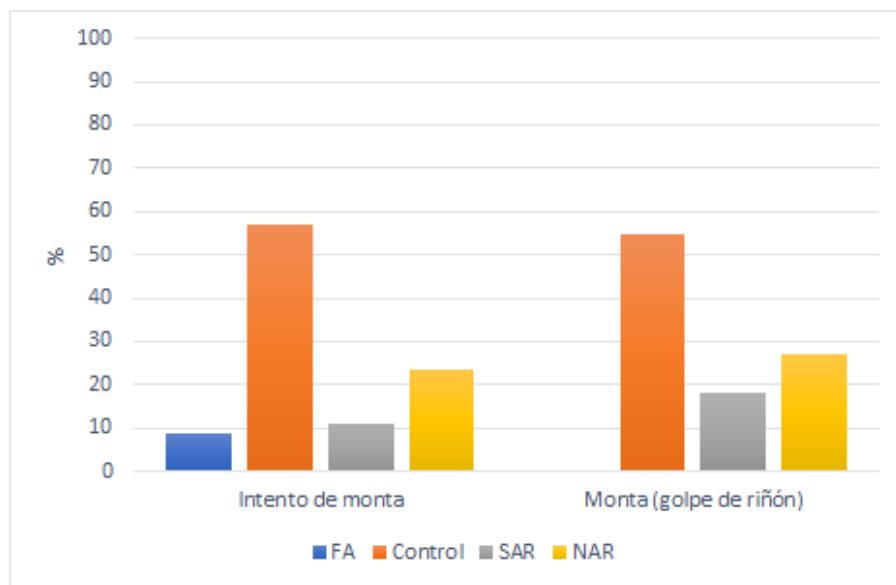
Resulta evidente que los corderos pertenecientes al grupo C presentaron un mayor número de manifestaciones sexuales ( $P<0,05$ ). Llama especialmente la atención el signo de *flehmen* ( $P<0,001$ ), pero también se observa una superioridad en el resto de manifestaciones sexuales: olfateo vulvar ( $P<0,05$  vs. grupo FA), aproximaciones ( $P<0,05$  vs. grupos FA y SAR), intentos de monta ( $P<0,05$  vs. resto de los grupos) y monta con golpe de riñón ( $P<0,05$  vs. grupos FA y SAR). La mitad de los intentos de monta y montas han sido realizados por este grupo (Figura 15).



**Figura 15.** Número medio de flehmen, olfateo vulvar, aproximaciones, patadas, intentos de monta y montas durante los test individuales de comportamiento sexual (20 minutos) en corderos de raza Rasa Aragonesa, nacidos en octubre, que han sido expuestos a dos meses de días largos con 16 horas de luz al día entre el 15 de enero y el 15 de marzo (FA); o que han sido alojados con tres machos adultos activados sexualmente (SAR) o bien con tres moruecos no activados sexualmente (NAR) desde el 15 de marzo hasta el final del experimento; y aislados de adultos durante todo el experimento (Control). La activación de los tres machos adultos se ha llevado a cabo mediante su exposición a días largos (16 horas/día) desde el 15 de enero hasta el 15 de marzo.

### 5.5. Test de comportamiento sexual grupal y fertilidad

La distribución de los intentos de monta y montas después del test grupal se presenta en la figura 16. Los corderos del grupo C realizaron más del 50% de ambas manifestaciones sexuales ( $P<0,05$ ) en comparación con el resto de grupos. Los corderos del grupo FA no montaron ninguna de las ovejas durante los 20 minutos de duración del test. Las tasas de fertilidad obtenidas en las ovejas cubiertas con el grupo SAR (90%) y C (100%) eran superiores ( $P<0,01$ ) que en el grupo FA (50%) y NAR (40%) (Figura 16).



**Figura 16.** Número medio de intentos de monta y montas durante el test de comportamiento sexual grupal (20 minutos) en corderos de raza Rasa Aragonesa, nacidos en octubre, que han sido expuestos a dos meses de días largos con 16 horas de luz al día entre el 15 de enero y el 15 de marzo (FA); o que han sido alojados con tres machos adultos activados sexualmente (SAR) o bien con tres moruecos no activados sexualmente (NAR) desde el 15 de marzo hasta el final del experimento; y aislados de adultos durante todo el experimento (Control). La activación de los tres machos adultos se ha llevado a cabo mediante su exposición a días largos (16 horas/día) desde el 15 de enero hasta el 15 de marzo.

## **6. DISCUSIÓN**

Este experimento se diseñó con el fin de determinar si diferentes estrategias de manejo durante el periodo prepuberal de corderos nacidos en otoño podrían modificar su actividad sexual y su fertilidad cuando alcanzan la edad de 8 meses. Para ello se midió la evolución de la concentración de T plasmática y se registró la actuación de los corderos durante los test de comportamiento sexual, tanto individuales como grupales. Es importante destacar que el periodo prepuberal de corderos nacidos en otoño coincide con el anestro estacional de esta especie (Forcada et al., 1992).

### **6.1. Discusión de los métodos utilizados**

La valoración de los niveles de T como un indicador de la pubertad ha sido utilizado en otros estudios: Souza et al. (2010) describen un aumento lento de los niveles plasmáticos en corderos entre 9 y 32 semanas de edad, seguido de un aumento más importante hasta la semana 42 y una posterior caída. En el caso de este trabajo, se llega a la conclusión de que los animales llegan a ser púberes antes de llegar a los niveles más altos de T. Un estudio (Lee et al., 1976) también ilustra que, tras alcanzar un pico a la semana 5, hasta la semana 20 de edad los niveles de T de los corderos son estables, empiezan entonces a aumentar hasta llegar a su máximo a una edad de 41 semanas. Otros estudios han utilizado este parámetro, demostrando que existe una cierta variabilidad debido a la raza en el patrón de excreción de la T (Langford et al., 1998; Lafourture et al., 1984). Por otra parte, muchos autores han escogido la calidad espermática además de la periferia testicular, los niveles de T y el comportamiento como indicador de la pubertad. En el presente caso no ha sido así debido a razones prácticas, éticas y de fiabilidad de los resultados: para poder valorar la calidad del semen de los corderos hubiese sido mejor recurrir a la electroeyaculación, pero el protocolo especificaba que los machos no podían estar en presencia de hembras antes del test de monta. Además, este método implica una sedación, es cuestionable desde el punto de vista del bienestar animal y no permite obtener resultados fiables (Mattner y Voglmayr, 1962; Marco-Jiménez et al., 2008).

El perímetro testicular del macho de Rasa Aragonesa debe estar entre 33 y 35 cm. Por debajo de esta medida se suele desaconsejar su uso como reproductores puesto que, como se ha

mencionado, a menor tamaño testicular, menor producción espermática (Abecia y Forcada, 2010) (Tabla 1).

Clase	Circunferencia escrotal	Motilidad	Morfología
<b>Excelente</b>	>35 cm	>50 %	>90 %
<b>Satisfactorio</b>	>30 cm	>30 %	>70 %
<b>Cuestionable</b>	<33 cm	<30 %	<70 %

**Tabla 1.** Perímetro testicular del macho de Rasa Aragonesa debe estar entre 33 y 35 cm. Por debajo de esta medida se suele recomendar su descarte como reproductor, como se ha mencionado, a menor tamaño testicular, menor producción espermática (Abecia y Forcada, 2010).

## 6.2. Discusión de los resultados

Los resultados del grupo SAR presentan una contradicción llamativa, ya que a pesar de una actividad sexual baja en los tests de comportamiento han demostrado tener una buena tasa de fertilidad. De hecho, la proporción de ovejas fecundadas por estos corderos ha sido similar a la presentada por los corderos control, que son los que han alcanzado el mayor grado de vigor sexual durante las pruebas comportamentales. Es probable que estos corderos que han estado en contacto con moruecos activados sexualmente por la exposición a un fotoperiodo de días largos, a pesar de haber alcanzado una buena capacidad fecundante, no han sido capaces de demostrar una actividad sexual evidente en los test individuales.

Según Ungerfeld y Lacuesta (2010), la capacidad reproductiva podría estar relacionada con el rango social o jerárquico del moruero durante la etapa prepuberal sin que se vean diferencias en las concentraciones séricas de T o de producción seminal.

Podemos suponer que los dos grupos de corderos que han estado acompañados por moruecos (SAR y NAR) han podido verse inhibidos por la presencia de las hembras. Se ha visto que, criar machos de las especies ovina y caprina en grupos separados de las hembras, en efecto, puede facilitar la formación de relaciones sociales únicamente entre machos que, al menos de forma temporal, impide el desarrollo de interés sexual por las hembras (Price et al., 1988).

Illius et al. (1976) han criado grupos de corderos en distintos entornos sociales (en aislamiento, grupos de tan solo machos y grupos mixtos) y han medido la evolución de las concentraciones plasmáticas de T entre el nacimiento y los 21 meses de edad. El patrón de secreción

de la T no ha sido modificado por estos entornos sociales y, de la misma forma que en el presente experimento, demuestra un aumento marcado a las 26 semanas de edad coincidiendo con la época de pubertad. Por otro lado, la baja tasa de fertilidad expresada por los animales de los grupos NAR y FA, con una menor capacidad reproductiva que en el grupo SAR, puede indicar que la calidad seminal de los corderos del grupo SAR ha sido mejorada gracias a la presencia de los machos adultos activados. Sin embargo, no se han detectado diferencias en las concentraciones de T o en el perímetro testicular en este momento. Como dato interesante, se sabe que los corderos en España están habitualmente criados bajo condiciones parecidas a las que han experimentado los corderos del grupo NAR. Esto significa que estos corderos están, de normal, inhibidos sexualmente por su entorno.

Si consideramos que el tamaño testicular y la función espermatogénica están correlacionadas tanto en la temporada reproductiva como en anestro (Yarney et al., 1990) y asumimos que si no hay diferencias en el PV y el perímetro escrotal ni tampoco hay diferencias en la calidad espermática, la diferencia en la tasa de fertilidad podría estar relacionada con una falta de actividad de monta más que con un problema de calidad espermática.

Hemos descrito previamente como la actividad sexual parece estar disminuida cuando se realizan los test de comportamiento individuales en comparación con los test grupales (Abecia et al., 2015). Así que los corderos SAR no han exhibido muchas manifestaciones sexuales en el test individual, pero han conseguido expresar su potencial reproductivo durante las 24 horas de apareamiento.

Hay varios artículos que reseñan el efecto de diferentes factores sociales capaces de modificar el desencadenamiento de la pubertad en ovino. En corderas se ha descrito cómo la presencia de moruecos activos sexualmente adelanta la primera ovulación y el primer estro de corderas también nacidas en otoño (Abecia et al., 2016) en comparación con corderas alojadas con moruecos sin estimular. En corderas los signos de la pubertad pueden medirse con la concentración plasmática de progesterona o señales de estro, pero en el caso de los corderos los niveles plasmáticos de T por sí solos no son un indicador claro de la aparición de la pubertad. Como ya se ha mencionado, la pubertad se define como el momento en el que los animales liberan por primera vez células germinales maduras (Foster et al., 1986). Ya que en este experimento se quería evitar cualquier contacto previo con hembras o el uso de electroeyaculación, la fecha de aparición real de la pubertad de los corderos no puede asegurarse.

Yarney y Sanford (1993) describen que hay una correlación entre los niveles plasmáticos de T y el diámetro testicular con el número de espermatozoides por eyaculado y la frecuencia de eyaculación a distintas edades juveniles, concluyendo que la combinación de ambos parámetros cerca

de la edad de aparición de la pubertad aporta la mejor predicción a largo plazo de la función reproductiva en la edad adulta.

A pesar de los valores similares de niveles de T y perímetro escrotal medidos en los tres grupos durante las últimas semanas del experimento, el efecto significativo de los métodos de manejo detectados por el análisis GLM puede indicar que los grupos SAR y C han presentado signos de una maduración sexual más precoz que los otros grupos. De hecho, estas posibles diferencias han sido reflejadas con la mayor tasa de fertilidad alcanzada por estos grupos. Como observación podemos destacar que, en España, los corderos se suelen criar como los del grupo NAR de este experimento, que han sido los que han presentado mayor inhibición de las actividades sexuales y menor fertilidad. A efectos prácticos, podríamos pues recomendar una modificación del manejo de estos animales, aislándolos de los adultos hasta llegar a la madurez sexual.

Los corderos FA han fallado en presentar un desarrollo testicular o una secreción de testosterona más favorables. Sin embargo, trabajos anteriores sobre el avance de la aparición de la pubertad en corderos han conseguido buenos resultados. Así pues, corderos de tres meses, nacidos en otoño, expuestos a 8-11 semanas de días largos y posteriormente a días cortos han presentado una aceleración en su desarrollo sexual medido a través de cambios en el crecimiento testicular (Colas et al., 1987).

En el experimento realizado, los corderos han sido tratados con un fotoperiodo de días largos durante 2 meses entre los 3 y 4 meses de edad, seguido de un fotoperiodo natural, así que es probable que la vuelta a condiciones naturales no haya permitido cambios en el desarrollo sexual. De hecho, en el experimento de Colas et al. (1987), después de finalizar los tratamientos lumínicos, cuando los animales fueron devueltos a un fotoperiodo natural, el volumen testicular de los corderos previamente tratados bajó rápidamente mientras que el volumen de los corderos del grupo control aumentó como suele ocurrir de forma fisiológica en primavera-verano.

## **7. CONCLUSIONES**

En conclusión, los corderos nacidos en otoño criados o aislados de moruecos adultos o en contacto permanente con moruecos activados sexualmente, presentan niveles superiores de T durante su periodo prepuberal en primavera que animales en contacto permanente con adultos no activados o expuestos a dos meses de días largos a partir de la edad de 3 meses. Sin embargo, solo los corderos que han sido aislados no parecen haber entrado en parada reproductiva como los otros grupos al final del experimento. Criar corderos nacidos en otoño aislados de adultos de la misma especie resulta en un grado alto de actividad sexual a los 8 meses de edad, aunque su fertilidad es similar a la de los corderos criados en presencia de machos adultos activados sexualmente.

## **CONCLUSIONS**

In conclusion, ram-lambs born in autumn, reared either isolated from adult rams, or in permanent contact with sexual-activated adult rams, present higher levels of testosterone during their prepuberal period in spring than animals in permanent contact with non-activated adult rams or exposed to two months of long days from the age of 3 months. However, only isolated ram-lambs did not seem to enter into sexual rest as the other groups did at the end of the experiment. Rearing autumn-born ram-lambs in isolation of adult congeners of the same species results in a high degree of sexual activity at 8-months of age, although their fertility is similar to ram-lambs reared in the presence of sexually-active adult rams.

## **8. VALORACIÓN PERSONAL**

### **8.1. Valoración de Ana Isabel García Malo**

La realización de este trabajo me ha dado la oportunidad de participar activamente en un estudio de campo en el ámbito del ovino, una de las especies con las que me gustaría tratar en mi futura vida profesional.

Sin duda, he implementado mi paciencia después de llevar a cabo los test comportamentales, dado que había machos no demasiado colaboradores capaces de hacer que veinte minutos parecieran más largos de lo que en realidad eran. Por otra parte, me he dado cuenta de lo metódico y preciso que hay que ser durante la medida de la circunferencia testicular, ya que es demasiado fácil acumular errores. También he aprendido que, a veces, las ideas fracasan y a pesar de que nuestra hipótesis inicial tenía sentido, no hemos acabado consiguiendo los resultados que esperábamos.

Todo esto ha supuesto para mí un pequeño salto al mundo de la experimentación, el cual me agradaría explorar más profundamente en el futuro.

### **8.2. Valoración de Marianne Gave**

La realización de este Trabajo de Fin de Grado me ha permitido aprender muchas cosas, a varios niveles.

Primero, en un aspecto práctico: este estudio implicaba a 40 corderos, a los cuales tenía que sacar sangre y pesar regularmente, lo cual implicaba un manejo semanal durante varios meses. También hubo unos aspectos prácticos a nivel de laboratorio, ya que he trabajado de forma autónoma para preparar las muestras de plasma para su congelación y posterior análisis.

En segundo lugar, he aprendido a trabajar en equipo: tanto en el manejo de los animales y en la realización propiamente dicha del estudio como en la redacción de la memoria.

Por último, con esta asignatura he aprendido lo que es redactar una memoria científica sobre un estudio experimental, cómo utilizar las fuentes de bibliografía y cómo podemos utilizar el trabajo de otros grupos de estudio para entender mejor los resultados que se consiguen.

Para finalizar, ambas agradecemos la paciencia y la disposición en todo momento de nuestro tutor Alfonso Abecia, así como la ayuda recibida por parte de los trabajadores del SAEA José Antonio Ruiz y Antonio Barrio y la colaboración de Melissa Carvajal-Serna.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Abecia, A. y Forcada, F. (2010). *Manejo reproductivo en ganado ovino*. Zaragoza: Grupo Asís Biomedia S.L. España
- Abecia, J. A., Chemineau, P., Flores, J. A., Keller, M., Duarte, G., Forcada, F., y Delgadillo, J. A. (2015). Continuous exposure to sexually active rams extends estrous activity in ewes in spring. *Theriogenology*, 84, 1549–1555.
- Abecia, J. A., Chemineau, P., Gómez, A., Keller, M., Forcada, F., y Delgadillo, J. A. (2016). Presence of photoperiod-melatonin-induced, sexually-activated rams in spring advances puberty in autumn-born ewe lambs. *Animal Reproduction Science*, 170, 114-120.
- Abecia, J. A., Chemineau, P., Gómez, A., Palacios, C., Keller, M., Delgadillo J. A. (2017). Exposure to Photoperiod-Melatonin-Induced, Sexually-Activated Rams after Weaning Advances the Resumption of Sexual Activity in Post-Partum Mediterranean Ewes Lambing in January. *Veterinary Sciences*, 4 (1), 4.
- Abecia, J. A., Chemineau, P., Keller, M., Delgadillo, J. A. (2017). Extended day length in late winter/early spring, with a return to natural day length of shorter duration, increased plasma testosterone and sexual performance in rams with or without melatonin implants. *Reproduction in Domestic Animals*, 52 (5), 851- 856.
- Berson, S. A., Yalow, R. S., Azulay, A., Schreiber, S., Bernard, R., y Roswit, B. (1952). The biological decay curve of P32 tagged erythrocytes; application to the study of acute changes in blood volume. *Journal of Clinical Investigation*, 6, 581-591.
- Calderón-Leyva, M. G., Meza-Herrera, C. A., Martínez-Rodríguez, R. y Ángel-García, O. (2018). Influence of sexual behavior of Dorper rams treated with glutamate and/or testosterone on reproductive performance of anovulatory ewes. *Theriogenology*, 106.
- Chemineau, P., Malpaux, B., Delgadillo, J. A., Guérin, Y., Ravault, J. P., Thimonier, J., & Pelletier, J. (1992). Control of sheep and goat reproduction: Use of light and melatonin. *Animal Reproduction Science*, 30, 157–184.
- Chemineau, P., Pelletier, J., Guérin, Y., Colas, G., Ravault, J. P., Touré, G., Almeida, G., Thimonier, J., Ortavant, R., Daveau, A. et al. (1987). Photoperiodic and melatonin treatments for the control of seasonal reproduction in sheep and goats. *Reproduction Nutrition Développement*, 28(2B), 409-422.

Chemineau. (1983). Effect of oestrus and evolutions of exposing creole goats to the male at tree times of the year. *Journal Reproduction and Fertility*, 67(1), 120-127.

Courot, M., Reviers, M. M., Pelletier, J., Pisselet, C., Caraty, A., y Cornu, C. (1975). Variations in pituitary and blood Lh during puberty in the male lamb. Relation to time of birth. *Annales de biologie animale, biochimie, biophysique*, 15(3), 509-516.

Damián, J. P., Beracochea, F., Hötzl, M. J., Banchero, G., y Ungerfeld, R. (2015). Reproductive and sexual behaviour development of dam or artificially reared male lambs. *Physiol Behav*, 147, 47-53.

Folch, J., Alabart, J.L., Echegoyen, E., Martí, J.I., Sánchez, P., Fantova, E. y Roche, A. (2007). Manejo reproductivo de la oveja Rasa Aragonesa: preparación de las ovejas destinadas a la inseminación artificial. *Grupo Consolidado de Investigación Aplicada sobre Producción de Ovino de Carne (Gobierno de Aragón)*, 71-101.

Forcada, F., Abecia, J. A., y Sierra, I. (1992). Seasonal changes in estrous activity and ovulation rate in Rasa Aragonesa ewes maintained at two different body condition levels. *Small Ruminant Research: The Journal of the International Goat Association*, 8, 313–324.

Foster, D. L., Karsch, F. J., Olster, D. H., Ryan, K. D., y Yellon, S. M. (1986). Determinants of puberty in a seasonal breeder. *Recent Progress in Hormone Research*, 42, 331-384.

Gordon, I. (1997). Controlled reproduction in sheep and goats. *CAB International, Wallingford, UK*, 148-154.

Hochereau-de Reviers, M. T., Copin, M., Seck, M., Monet-Kuntz, M., Cornu, C., Fontaine, C., Boomarov, O., et al. (1990). Stimulation of testosterone production by PMSG injection in the ovine male: Effect of breed and age and application to males carrying or not carrying the F Booroola gene. *Animal Reproduction Science*, 23, 21–32.

Illius, A. W., Haynes, N. B., Purvis, K., y Lamming, G. E. (1976). Plasma concentrations of testosterone in the developing ram in different social environments. *Journal of reproduction and fertility*, 48(1), 17-24

Karsch, F. J., Bittman, E. L., Foster, D. L., Goodman, R. L., Legan, S. J., y Robinson, J. E. (1984). Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. *Recent Progress in Hormone Research*, 40, 185–232.

Kilgour, R. J., y Whale, R. G. (1980). The relation between mating activity of rams in pens and subsequent flock mating performance. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 20, 5-8.

Klein, B. G. (2013). *Cunningham: fisiología veterinaria*. (5<sup>a</sup> ed.) Madrid: S.A. Elsevier España.

Lafortune, E., Blanc, M. R., Pelletier, J., Perreau, C., Terqui, M., y Hochereau-de Reviers, M. T. (1984). Variations in the plasma levels of gonadotrophin and testosterone and in Leydig and Sertoli cell populations between birth and adulthood in Romanov lambs born in spring or autumn. *Reproduction Nutrition Développement*, , 24 (6), pp.937-946.

Langford, G. A., Sanford, L. M., Marcus, G. J. y Shrestha, J. N. B. (1999). Seasonal cyclic pituitary and testicular activities in rams. *Small Ruminant Research*, 33, 43-53.

Langford, G. A., Shrestha J.N.B, Sanford L.M, Marcus G. J. (1998). Reproductive hormone levels of early postpubertal ram lambs in relation to breed, adult testis size and semen quality. *Small Ruminant Research*, 29, (225-231).

Lee, V. W. K., Cumming, I. A., de Krester, D. M., Findlay, J. K., Hudson, B., y Keogh E. J. (1976). Regulation of gonadotrophin secretion in rams from birth to sexual maturity. *Reproduction*, 46(1), 1-6.

Lincoln, G. A., y Short, R. V. (1980). Seasonal breeding: Nature's contraceptive. *Recent Progress in Hormone Research*, 36, 1-52.

Marco-Jiménez, F., Vicente, J. S., y Viudes-de-Castro, M. P. (2008). Seminal Plasma Composition from Ejaculates Collected by Artificial Vagina and Electroejaculation in Guirra Ram. *Reproduction in domestic animals*, 43(4), 403-408.

Martin, G. B., Oldham C. M., Cognié, Y., Pearce, D. T. (1986). The physiological responses of anovulatory ewes to the introduction of rams — A review. *Livestock Production Science*, 15 (3), 219-247.

Martin, G. B., y Kadokawa, H. (2006). "Clean, green and ethical" animal production. Case study: reproductive efficiency in small ruminants. *Journal of reproduction and development*, 52(1), 145.

Mattner, P. E., y Voglmayr, J. K. (1962). A comparison of ram semen collected by the artificial vagina and by electro-ejaculation. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry*, 2(4), 78-81.

Perkins, A., y Fitzgerald, J. A. (1994). The behavioral component of the ram effect: the influence of ram sexual behavior on the induction of estrus in anovulatory ewes. *Journal of Animal Science*, 72(1), 51-55.

Price, E. O., Katz, L. S., Wallach, S. J. R., y Zenchak, J. J. (1988). The relationship of male-male mounting to the sexual preferences of young rams. *Applied Animal Behaviour Science*, 21(4), 347-355.

Souza C. E. A., Araújo A. A., Oliveira J. T. A., Lima Souza A. C., Neiva J. N. M., Moura A. A. (2010). Reproductive Development of Santa Inês Rams During the First Year of Life: Body and Testis Growth, Testosterone Concentrations, Sperm Parameters, Age at Puberty and Seminal Plasma Proteins. *Reproduction in domestic animals*, 45, 644-653.

Underwood, E. J., Shier, F. L., y Davenport, N. (1944). Studies in sheep husbandry in WAV The breeding season in Merino crossbred and British breed ewes in the agricultural districts. *Journal of Agriculture (Western Australia)*, 2(11), 135-143.

Ungerfeld, R. y Lacuesta, L. (2010). Social rank during pre-pubertal development and reproductive performance of adult rams. *Animal Reproduction Science*, 121(1-2), 101-105.

Wasserman L., (2004). *All of Statistics: A Concise Course in Statistical Inference*. New York: Springer-Verlag.

Yarney, T. A. y Sanford, L. M. (1993). Pubertal development of ram lambs: physical and endocrinological traits in combination as indices of postpubertal reproductive function. *Theriogenology*, 40(4), 735-744.

Yarney, T. A., Sanford, L. M., y Palmer, W. M. (1990). Pubertal development of ram lambs: body weight and testicular size measurements as indices of postpubertal reproductive function. *Canadian Journal of Animal Science*, 70(1), 139-147.