



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**EFFECTO MACHO, SINCRONIZACIÓN DE CELO Y LUTEÓLISIS  
EN OVEJAS**

**JAVIER MEILÁN MORÓN**

**TESIS DE MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

**URUGUAY**

**2014**



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**EFFECTO MACHO, SINCRONIZACIÓN DE CELO Y LUTEÓLISIS  
EN OVEJAS**

**JAVIER MEILÁN MORÓN**

**Rodolfo Ungerfeld**

**Director de Tesis**

**2014**

**INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE**

**DEFENSA DE TESIS**

**Jorge Gil; DMTV, MSc, PhD**

**Departamento de Sanidad en los Sistemas Pecuarios**

**EEMAC - Paysandú**

**Facultad de Veterinaria**

**Universidad de la República - Uruguay**

**Alejo Menchaca; DMTV, MSc, PhD**

**Instituto de Reproducción Animal del Uruguay y Programa de  
Posgrados de Facultad de Veterinaria (UdelaR)**

**Jeferson Ferreira da Fonseca; MV, MSc, PhD**

**Centro Nacional de Pesquisa de caprinos, EMBRAPA – Brasil**

**2014**

**EN ESTA HOJA VA LA COPIA DEL  
ACTA DE DEFENSA DE TESIS**

**En esta hoja va el Informe del Tribunal**

## AGRADECIMIENTOS

- A Rodolfo. Tengo la suerte de conocerlo desde hace mucho, pero esta Maestría me permitió conocerlo aún mejor. Tuve el privilegio de contar con él como Tutor y eso cuenta doble. Por un lado su paciencia, su perseverancia, su estímulo, y sus consejos sobre el camino a seguir fueron determinantes; se compenetra con los temas, lo que contagia y entusiasma. Por otro lado, su profundo conocimiento académico del tema fue de un valor enorme para esta Tesis; pocos saben de este tema como él. También hay otras cosas que no son tan “académicas”, pero en algunas ocasiones cuentan mucho más. Las palabras pueden no ser suficientes para explicarlo, espero que el pueda comprenderlo.
- A Matías, Julia, Florencia, Lorena, Fernando, Rosalía, Brenda, Jorgelina y todos los compañeros del Departamento de Fisiología que de alguna manera colaboraron en enriquecer esta Tesis; en este grupo de compañeros quiero incluir a también a Juan Pablo y Aline, de Bioquímica. Durante este proceso me brindaron apoyo y opiniones de calidad y objetivas (pero interesadas en mi desarrollo). Les deseo lo mejor.
- Al Programa de Posgrados de Facultad de Veterinaria. Me alegra mucho saber que quienes ya nos fuimos hace un tiempo de nuestra Facultad podemos volver a ella a seguir formándonos. Quiero destacar el esfuerzo de todos sus integrantes y docentes en hacer que el Programa continúe y crezca en opciones y calidad.
- A la Comisión Asesora del Proyecto de Tesis: Celia Tasende, Daniel Cavestany y Georget Banhero. Sus aportes me fueron muy útiles para continuar con la Tesis.
- A César Niell y Alfredo Irazábal. Siempre es bueno tener colegas que estén dispuestos a apoyar. Me dieron compañerismo, conocimiento, ayuda, techo y la posibilidad de llevar a cabo los trabajos experimentales.
- Al Técnico Inseminador Walter Rodríguez Núñez, a los propietarios y al personal de los establecimientos en los que se realizaron los trabajos experimentales. Su colaboración fue fundamental para los mismos.
- A todos los compañeros y amigos que de alguna manera siempre estuvieron apoyándome en este largo camino.
- A mis padres que me inculcaron el gusto por el razonamiento y el conocimiento.
- A mi familia grande, que siempre está acompañando.
- Dejé este agradecimiento para el final. Últimas en esta sección, pero primeras en mi corazón, a Inés y a Clari (¡y a los que vayan a venir!). Gran parte de lo que hago es por ellas, mi familia. Lamentablemente eso hace que a veces no les dedique todo el tiempo que quiero y que merecen. Las amo.

Este trabajo de Tesis ya generó un artículo, el cual fue aprobado para publicación por la revista *Small Ruminant Research*. El mismo se encuentra en el Anexo I.

## Contenido

<b>Resumen .....</b>	<b>x</b>
<b>Summary .....</b>	<b>xi</b>
<b>1 Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1 Fisiología reproductiva de la oveja.....	1
1.1.1 Estacionalidad .....	1
1.1.2 Ciclo estral .....	1
1.1.3 Luteólisis.....	3
1.2 Control del ciclo estral y uso de hormonas en la producción animal .....	4
1.2.1 Hormonas y producción animal: regulación, mercado y medio ambiente...4	
1.2.2 Protocolos de sincronización de celo.....	6
1.3 Efecto macho .....	7
1.3.1 Efecto macho en ovejas en anestro estacional .....	11
1.3.2 Efecto macho en ovejas cíclicas .....	12
<b>2 Hipótesis.....</b>	<b>15</b>
<b>3 Objetivos .....</b>	<b>16</b>
3.1 Objetivos Específicos.....	16
<b>4 Estrategia de investigación .....</b>	<b>17</b>
4.1 Marco .....	17
4.2 Inserción en el manejo productivo de los establecimientos .....	17
4.3 Procedimientos experimentales .....	17
<b>5 Materiales y Métodos.....</b>	<b>18</b>
5.1 Experimento 1 .....	18
5.1.1 Animales y localización.....	18
5.1.2 Grupos experimentales y manejo .....	18
5.2 Experimento 2 .....	19
5.2.1 Animales y localización.....	19
5.2.2 Grupos experimentales y manejo .....	19
5.3 Análisis estadístico .....	20
<b>6 Resultados .....</b>	<b>21</b>
6.1 Experimento 1 .....	21



6.2	Experimento 2 .....	23
<b>7</b>	<b>Discusión .....</b>	<b>26</b>
<b>8</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>28</b>
<b>9</b>	<b>Bibliografía .....</b>	<b>29</b>
<b>Anexo I</b>	<b>.....</b>	<b>42</b>

## Resumen

La introducción de carneros a ovejas prepúberes, en anestro estacional, anovulatorias en lactación, o en temporada reproductiva, que permanecieron aisladas de todo contacto con carneros estimula (en al menos una proporción de ellas) su ovulación (efecto macho). Por tanto, el efecto macho por sí solo, o en combinación con tratamientos hormonales es una opción que puede ser incluida en sistemas de producción. Sin embargo, a pesar de que el efecto macho ha sido ampliamente estudiado en ovejas en anestro, las ventajas de la utilización del efecto macho en ovejas cíclicas ha sido poco estudiada. En un ciclo estral normal, el aumento en la secreción de LH estimula el desarrollo folicular y la síntesis de estradiol. A su vez, el aumento de estradiol induce un aumento en el número de receptores uterinos de oxitocina, por lo que en la fase luteal tardía el útero responde a la oxitocina secretando  $\text{PGF2}\alpha$ . Esto desencadena un proceso de retroalimentación positiva que finaliza con la luteólisis. Se ha observado que las ovejas cíclicas responden a la introducción de carneros con un incremento de la frecuencia de pulsos de LH sin importar el momento del ciclo. Este incremento se produce incluso en animales tratados con dispositivos con progestágenos. Por tanto, el efecto macho podría desencadenar respuestas similares a las que se dan durante una fase luteal normal. Como hipótesis general de esta tesis se planteó que el efecto macho es efectivo en sustituir parcialmente a la  $\text{PGF2}\alpha$  durante la fase luteal tardía para inducir la presentación de celo. El objetivo general fue determinar si el efecto macho puede sustituir parcialmente el uso de  $\text{PGF2}\alpha$  en un tratamiento de sincronización de celo en ovejas cíclicas. Para ello se realizaron dos experimentos. Para el primero se testeó la hipótesis de que en un protocolo de dos dosis de  $\text{PGF2}\alpha$  separadas 13 días, el efecto macho sustituye la mitad de la segunda dosis. Dados los resultados de este experimento, en el que se observó que el efecto macho puede desencadenar y adelantar la manifestación de celo en al menos una proporción de ovejas, se planteó la hipótesis de que el día de la fase luteal tardía en que se estimula a las ovejas afecta la respuesta al tratamiento. Por ello se diseñó un segundo experimento donde se testeó el uso de media dosis de  $\text{PGF2}\alpha$  administrada al momento de la introducción de los machos en diferentes momentos de la fase luteal, pero no se observó diferencia en la respuesta estral de las ovejas según el día en que fueron estimuladas. En conclusión, el efecto macho fue efectivo al sustituir media dosis de  $\text{PGF2}\alpha$  en una parte menor de la majada, aunque la respuesta no estuvo relacionada con el día de la fase luteal tardía en la cual las ovejas son estimuladas.

## Summary

The introduction of rams to prepuberal, seasonal anestrous, lactating anovular, or seasonal ewes that remained isolated from the rams, induces (in at least a proportion of the ewes) the ovulation (ram effect). Thus the ram effect alone, or combined with hormonal treatments may be included in productive systems. However, although the use of the ram effect has been widely studied in anestrous ewes, its' possible applications in cyclic ewes have been scarcely studied. In a normal estrous cycle the increase in LH stimulates estradiol secretion by the larger follicles present in the ovaries. This raise in estradiol concentrations induce an increase of uterine oxytocin receptors, so in the late luteal phase the uterus responds to oxytocin secreting PGF2 $\alpha$ . This triggers a positive feedback which ends with the regression of the corpus luteum. The introduction of rams induce an increase in LH pulsatility in cyclic ewes, independent of the stage of the estrous cycle. This increase is even observed in ewes treated with progestagens. Therefore, the ram effect may trigger similar responses as observed during a normal luteal phase. The general hypothesis was that the ram effect can partially substitute PGF2 $\alpha$  during late luteal phase to induce estrus. The general aim was to determine if the ram effect could partially substitute the use of PGF2 $\alpha$  in an estrous synchronization protocol in cyclic ewes. In the first experiment our hypothesis was that the ram effect may substitute the administration of a second half-PGF2 $\alpha$  dose during the late luteal phase in a treatment of two doses administrated 13 days apart. As with this alternative we observed that the ram effect could trigger and advance estrus in, at least, a part of the flock, we designed a second experiment. The hypothesis was that the day of the late luteal phase in which ewes are stimulated influences the response to the treatment. Hence we designed a second experiment testing the use of half dose of PGF2 $\alpha$  administered at ram introduction in different moments of the luteal phase. However, we did not observe any differences in the estrous response of the ewes according to the day in which they were stimulated. In conclusion, the ram effect was effective substituting half PGF2 $\alpha$  in part of the flock, but the response was unrelated to the day of the late luteal phase in which the ewes are stimulated.

## 1 Introducción

### 1.1 Fisiología reproductiva de la oveja

#### 1.1.1 *Estacionalidad*

La estacionalidad reproductiva es la restricción natural de la capacidad reproductiva del animal a un momento del año (Malpaux, 2006). Por ello, la misma es una limitante para obtener corderos en cualquier momento del año, y debe ser tenida en cuenta al momento de establecer un programa productivo en un establecimiento. La oveja es una especie de reproducción poliéstrica estacional, con una estacionalidad regida principalmente por el fotoperíodo, presentando su estación reproductiva cuando las horas de luz van disminuyendo (reproductor de día corto). La duración de la estación reproductiva y del período de anestro varía según la raza y la ubicación geográfica del animal. En nuestro país, las razas más importantes son Corriedale (65%) y Merino (14%) (Rodríguez-Sabarrós, 2013). La estación reproductiva de las ovejas de raza Corriedale en Uruguay se extiende desde enero (Fernández-Abella, 1993) o mediados de febrero (Perdigón et al., 1997) hasta junio-julio (Fernández-Abella, 1993; Perdigón et al., 1997), mientras que la raza Merino comienza su estación reproductiva en diciembre (Fernández-Abella et al., 1999).

#### 1.1.2 *Ciclo estral*

El ciclo estral de la oveja tiene una duración de 17 días (con variaciones según la raza y la etapa de la estación reproductiva), con un estro que dura de 24 a 36 h (Goodman e Inskeep, 2006). Esta duración también se ve influida por aspectos tales como raza, edad, estación del año y presencia de los machos (Goodman e Inskeep, 2006). El comportamiento de celo durante el mismo no se observa en ausencia de los machos (en su presencia a menudo muestran una conducta de intensa búsqueda de los machos y permanecen cerca de ellos). Durante el estro la vulva está edematosa, y se observa una secreción de moco por la vagina (Jainudeen et al., 2002). La oveja ovula espontáneamente finalizado el celo, con tasas ovulatorias que varían según la raza. Sin embargo, la mayoría de las razas ovinas tienen una tasa ovulatoria (cantidad de ovulaciones por animal que ovula) de entre 1 y 2 (Scaramuzzi y Radford, 1983), siendo un ejemplo de ello la raza Merino con 1,2 (Turner, 1978). La tasa ovulatoria aumenta con la edad hasta alcanzar el máximo a los 6-7 años, y luego declina gradualmente (Hafez y Hafez, 2002); además de la edad, la tasa de ovulación varía según factores como la nutrición, época del año y factores sociales (Scaramuzzi y Radford, 1983). Es así que el peso y la evolución (positiva) del mismo, la época de finalización del verano y el comienzo del otoño, y la introducción de machos a hembras en anestro (ver punto 1.3: Efecto macho) pueden inducir un aumento en la tasa ovulatoria (Scaramuzzi y Radford, 1983).

El ciclo estral se puede subdividir en dos fases. La fase luteal se considera como el período caracterizado por el desarrollo y la actividad del cuerpo lúteo, durante el que hay altas concentraciones de progesterona (P4) (Noel et al., 1993). Se extiende desde aproximadamente el día 2-3 del ciclo (siendo el día 0 el comienzo del estro) hasta la luteólisis (día 13-14) (Noel et al., 1993; Abecia-Martínez y Forcada-Miranda, 2010). Según Duggavathi et al. (2005), la fase luteal media y tardía es del día 7 en adelante, cuando las concentraciones séricas de P4 se encuentran en una fase de meseta. La fase folicular se considera como el período que va desde la regresión luteal, y por tanto bajas concentraciones de P4 en plasma, hasta el día 2 a 3 del ciclo (Noel, 1993; Abecia-Martínez y Forcada-Miranda, 2010).

Durante el ciclo estral la secreción tónica de la hormona luteinizante (LH) tiene un patrón pulsátil (Hafez et al., 2002). La frecuencia de pulsos disminuye del día 1 al 9 a medida que se incrementa la secreción de P4 luteal, y se mantiene baja hasta la luteólisis, alrededor del día 14, para luego incrementarse durante la fase folicular (Goodman e Inskeep, 2006). Como consecuencia del aumento de los niveles de estrógenos (E2) durante el estro se produce un pico de LH que induce la ovulación y por tanto la formación de un nuevo cuerpo lúteo (Espey y Richards, 2006). Durante la fase folicular, la concentración de la hormona folículo estimulante (FSH) disminuye en las 24 h previas al pico preovulatorio de LH (Thomas et al., 1988). Luego se produce un pico de FSH coincidente con el de LH, y a continuación del pico preovulatorio de LH las concentraciones de FSH disminuyen (en paralelo a las de LH) a un nadir a las 8 a 12 h del pico preovulatorio, para continuar luego con un segundo aumento y luego un segundo nadir alrededor de las 20 a 28, y 36 a 48 h respectivamente (Goodman e Inskeep, 2006). A los 4 a 6 días de iniciada la fase luteal generalmente se observa un incremento gradual de FSH que se relaciona con el desarrollo de la segunda onda folicular, mientras que existen otros incrementos menores vinculados al crecimiento de las ondas (Goodman e Inskeep, 2006) (Ver Figura 1).

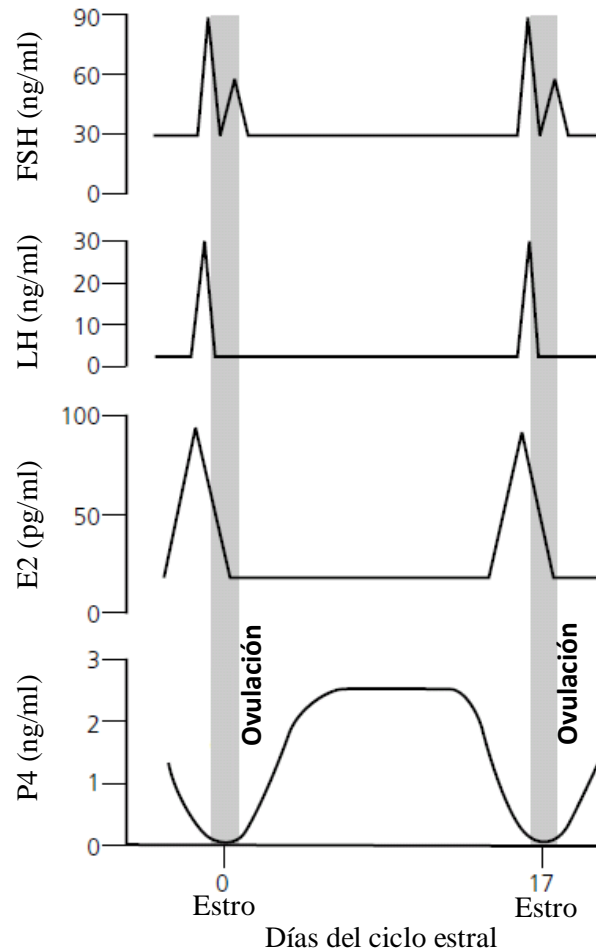


Figura 1. Esquema de los principales cambios en los patrones de FSH (ng/ml), LH (ng/ml), Estrógenos totales (pg/ml) y P4 (ng/ml) en la circulación periférica de la oveja durante el ciclo estral (Modificado de Noakes et al., 2001).

### 1.1.3 Luteólisis

La luteólisis, que determina la finalización de la fase lútea, se produce luego de una serie de interacciones hormonales, produciéndose una involución del cuerpo lúteo junto al cese de su función (Stouffer, 2006).

La P4 reduce la expresión uterina de los receptores para estrógenos (McCracken et al., 1984) y oxitocina (Vallet et al., 1990), pero además, la de sus propios receptores hormonales (Milgrom et al., 1973). Como consecuencia de esto último, la P4 disminuye paulatinamente, a medida que avanza la fase lútea, y por tanto el tiempo en que la P4 está inhibiendo la síntesis de sus receptores, reduce sus propios efectos, incrementándose así la expresión de los receptores de estrógenos y oxitocina (Spencer et al., 1995). El aumento de estradiol que se produce asociado con el desarrollo folicular induce un aumento en el número de receptores uterinos de oxitocina (Hixon y Flint, 1987). A su vez, la oxitocina hipofisaria provoca un aumento en la producción de  $PGF2\alpha$  por parte

del útero (Flint et al., 1986). Es importante destacar que la presencia previa de concentraciones altas de P4 favorece la síntesis de PGF2 $\alpha$  de dos maneras: 1) incrementando la acumulación de lípidos en el endometrio, que por medio de la fosfolipasa 2, producen ácido araquidónico, el que es convertido a PGF2 $\alpha$  por acción de la ciclooxigenasa; y 2) incrementando la acción de esta última (McCracken et al., 1999). A su vez, la PGF2 $\alpha$ , estimula la síntesis (Burns et al., 2001) y secreción (Moore et al., 1986) de oxitocina por parte del cuerpo lúteo. Es así que estas dos hormonas, la PGF2 $\alpha$  uterina y la oxitocina luteal, desarrollan un ciclo de retroalimentación positiva, donde pulsos de una son seguidos de pulsos de la otra (Silvia et al., 1991). Estos pulsos son cada vez más importantes, llevando a un aumento de la concentración de PGF2 $\alpha$  (Bazer et al., 1991; Flint y Sheldrick, 1982). Dado el efecto luteolítico de la prostaglandina (McCracken et al., 1972), este aumento de PGF2 $\alpha$  conduce a la consiguiente luteólisis (Hixon y Flint, 1987) y, consecuentemente, el comienzo de una nueva fase folicular.

## 1.2 Control del ciclo estral y uso de hormonas en la producción animal

El control del ciclo estral, y por tanto del celo y la ovulación, se puede utilizar asociado a otras biotecnologías reproductivas. La técnica puede ser importante para ahorrar tiempo y trabajo, asegurándose de que los partos se produzcan en un período corto de tiempo. Para la aplicación de la inseminación artificial, el control del estro puede resultar esencial para permitir que las ovejas sean inseminadas con machos genéticamente superiores de acuerdo con una agenda planeada y predecible en un corto período de tiempo (Gordon, 1999). Por otra parte, la inseminación artificial permite optimizar el uso de los machos, una mejor prevención y control de enfermedades, usar machos incapacitados físicamente, mantener registros seguros, y evitar la consanguinidad (Gordon, 1999). Además de ello, el conocimiento y control de los ciclos reproductivos permite la reproducción fuera de época o el uso de otras tecnologías, tales como la superovulación para producir embriones para transferencia, y la propia transferencia de embriones (Evans y Maxwell, 1990).

### 1.2.1 *Hormonas y producción animal: regulación, mercado y medio ambiente*

Cuando se administra una hormona, al igual que sucede con otros fármacos, debe transcurrir cierto tiempo para que se lleve a cabo la metabolización de la misma. Las principales hormonas utilizadas en reproducción son metabolizadas en poco tiempo. La GnRH tiene una vida media de 3 a 6 min en el hombre (Arimura, 1974) y de 7 min en la rata (Redding, 1973) mientras que en el caso de la eCG en la oveja la vida media es de 63 h (Liu et al., 2007). En el caso de la P4 su vida media en la oveja es de 2-9 h (Stupnicki et al., 1969) y la del 17 $\beta$ -estradiol va de unos pocos minutos (Challis et al., 1973) a 2 h (Adams et al., 1994), aunque la de sus ésteres es bastante mayor (Thundathil, 1999). El 74% del 17 $\beta$ -estradiol total administrado es eliminado en unos 10 días (Adams et al., 1994). La PGF2 $\alpha$  sufre una rápida metabolización a nivel pulmonar y/o hepática (Davis, 1980; Dimov et al., 1990), sucediendo lo mismo con sus metabolitos (Light et al., 1994). Sin embargo, dados los tiempos de espera requeridos para comercializar o consumir la carne, y que el objetivo del tratamiento hormonal es

mejorar el manejo reproductivo, es muy poco probable que el ser humano consuma productos o subproductos alimenticios de origen animal con contenido de esas hormonas.

Las preocupaciones con respecto a las hormonas también involucran sus posibles efectos sobre el medio ambiente. La excreción de metabolitos hormonales por orina y heces luego de un tratamiento puede implicar que, por ejemplo, estrógenos potentes tengan el potencial de alcanzar ambientes acuáticos en concentraciones suficientes como para producir respuestas estrogénicas en la vida acuática (en peces inducir la producción vitelógena, inhibir el crecimiento testicular y disminuir los niveles de testosterona) (Arcand-Hoy et al., 1998). Estos inconvenientes pueden presentarse también como consecuencia del desecho de frascos con restos de productos en el medio ambiente, liberaciones accidentales, residuos provenientes de procesos de producción (Panter et al., 2000), así como los remanentes que quedan en los dispositivos de administración. Los dispositivos de liberación de P4 contienen una mayor cantidad de hormona que la efectivamente absorbida (McMillan y Peterson, 1993), por lo que en muchos casos se los utiliza más de una vez (Colazo et al., 2004; Vilariño et al., 2011). Por esta misma razón, muchos dispositivos son desechados conteniendo aún P4, pudiendo así contaminar el medio ambiente.

Teniendo en cuenta este tipo de antecedentes, en la Unión Europea (UE) se ha prohibido el uso de estrógenos para su uso en protocolos reproductivos (UE, 1996), aunque se encuentran permitidos para su uso terapéutico (UE, 2003). Asimismo, se ha regulado el uso de progestágenos y otras hormonas. Hasta 2012 la UE no permitía la importación de carne de los Estados Unidos de América (EUA) y Canadá debido al uso de hormona de crecimiento (GH) en estos países, y aunque luego permitió importar su carne, la misma debe provenir de animales no tratados con GH (UE, 2012). En nuestro país, tanto por razones de salud pública como de acceso a mercados, las regulaciones son similares a la de EUA y la UE, datando algunas de ellas de mucho tiempo atrás (MGAP, 1962). Las cadenas de producción de alimentos de origen animal están fuertemente influenciadas por este nuevo conjunto de limitaciones o restricciones que inevitablemente conducen a cambios en el mercado.

Además, las preferencias de los consumidores en cuanto a la calidad del alimento son una realidad y una tendencia creciente que cada vez influirá más sobre la comercialización de alimentos (Caswell, 2007) y por tanto, la producción animal. Los consumidores alrededor del mundo están comenzando a demandar productos que sean “limpios, verdes y éticos” (Martin et al., 2004). Para los productores ovinos, esto implica utilizar prácticas que minimicen o eviten totalmente los tratamientos hormonales o químicos, lo que además colabora en disminuir los residuos de hormonas en el medio ambiente, y que no comprometan el bienestar animal (Martin et al., 2004). Sin embargo, la intensificación de la producción animal, los factores económicos, y la facilidad para el manejo conducen a un mayor uso de protocolos hormonales en la reproducción.



### 1.2.2 *Protocolos de sincronización de celo*

El conocimiento del conjunto de procesos fisiológicos que conduce al estro y la ovulación hacen posible el control de la actividad ovárica en la oveja. En hembras cíclicas el control del momento de la descarga de LH y la ovulación puede lograrse ya sea induciendo la luteólisis con PGF $2\alpha$  o mediante la extensión artificial de la fase luteal con progestágenos.

La PGF $2\alpha$  tiene acción luteolítica en la oveja (McCracken, 1972) y en hembras cíclicas sus análogos son usados para inducir el final de la fase luteal a través de la regresión del cuerpo lúteo (Wildeus, 1999). A nivel comercial existen diferentes tipos de análogos de la misma para su uso en rumiantes (ver revisión: Fierro et al., 2013). Los análogos más utilizados y difundidos son dinoprost y cloprostenol (González-Bulnes et al., 2005; Fierro et al., 2011; Ali, 2007; Peel et al., 2012; El-Sherry et al., 2013) en dosis de 10 a 15 mg para dinoprost (Talafha et al., 2009; Rawlings et al., 1983; Roberts et al., 1985), y 100 a 250  $\mu$ g para cloprostenol (González-Bulnes et al., 2005; Zonturlu et al., 2009; Scaramuzzi et al., 2010). Existen varios trabajos con resultados disímiles en los que se utilizan dosis reducidas de cloprostenol (Contreras-Solis et al., 2009b) o dinoprost (Hackett y Robertson, 1980; Juengel et al., 2000). Por otra parte, el resultado de usar uno u otro análogo es similar en la incidencia de estros, tasa de concepción en hembras que fueron apareadas por los machos, tasa de preñez (Smith, 1982), y aborto (Audicana y Harvey, 1993). Los análogos de la PGF $2\alpha$  pueden utilizarse en protocolos como hormona única (Acritopoulou y Haresign, 1980), o en combinación con otras hormonas (Titi, 2010), como la P4 (Dixon et al., 2006), o la GnRH (Zonturlu et al., 2009). Dado que el cuerpo lúteo responde a la PGF $2\alpha$  entre los días 3 y 14 del ciclo estral (Greyling y Van Der Westhuysen, 1979; Silva 2000; Rubianes et al., 2003), es usual utilizar protocolos de dos dosis separadas entre 7 y 14 días (ver revisión: Fierro et al., 2013; Menchaca y Rubianes, 2004; Fairnie et al., 1976).

El tratamiento con PGF $2\alpha$  es efectivo en sincronizar el estro, pero existen diferencias entre el ciclo estral obtenido por el uso de prostaglandinas y el ciclo estral natural. Luego de la luteólisis inducida, la disminución de la P4 es más pronunciada y la regresión luteal es más rápida que en la luteólisis natural. Asimismo, en la luteólisis inducida se pueden presentar diferencias con un ciclo estral natural, como por ejemplo en la descarga de LH (un segundo pico a las 7-10 h post inyección), en los folículos (son más grandes) y en los folículos preovulatorios (son más chicos pero de crecimiento más rápido) (ver revisión: Fierro et al., 2013). Estas diferencias se traducen en peores resultados reproductivos en comparación con animales con luteólisis natural, observándose menores tasas de ovulación, concepción, prolificidad y fecundidad (Fierro et al., 2011).

Existen diferencias en los resultados de sincronizar los estros con análogos de la prostaglandina o con los progestágenos. González-Bulnes et al. (2005) observaron que la sincronización del celo y la ovulación con progestágenos (en un tratamiento de 14 días) indujo una menor calidad de folículos preovulatorios en comparación con la obtenida en tratamientos en base a prostaglandina, lo que derivó en una menor viabilidad embrionaria. Estos folículos presentaban deficiencias en la secreción de estradiol durante

la fase preovulatoria, en la capacidad de ovular un ovocito que pueda ser fertilizado y desarrolle un embrión viable, y en la secreción de P4 por parte del cuerpo lúteo subsecuente.

De forma contraria, se ha reportado que la fertilidad al primer servicio de las ovejas sincronizadas con prostaglandina se ve reducida cuando se la compara con la obtenida con esponjas con progestágenos (Boland et al., 1978). Estos autores encontraron que los animales cuyos ciclos fueron sincronizados con progestágenos ovularon una mayor cantidad de óvulos que aquellos en que se usó PGF2 $\alpha$ . A su vez, de los animales que ovularon, en el grupo tratado con progestágenos el porcentaje de óvulos fertilizados fue mayor que en los tratados con PGF2 $\alpha$ . Una posible explicación para esta menor fertilidad puede estar relacionada con el hecho de que usando un intervalo de 9-10 días entre las dos dosis de PGF2 $\alpha$  se asegura la presencia de un cuerpo lúteo, pero la funcionalidad y maduración final de los folículos preovulatorios puede estar alterada. Esto se debe a que concentraciones elevadas de P4 durante la fase luteal del ciclo estral inducen una menor concentración de LH en sangre, siendo la LH crucial para el crecimiento y maduración de los folículos preovulatorios (Contreras-Solís, 2009a). Por ello se puede esperar que la fertilidad sea mayor sobre el final de la fase luteal y no a los 9 a 10 días del ciclo.

La sincronización de celos con progestágenos en ovinos conduce a tasas de concepción menores que con servicio natural, debido a alteraciones en los patrones de liberación de LH, en la calidad de las ovulaciones y/o en el transporte y la supervivencia espermática en el tracto reproductivo de las hembras (González-Bulnes et al., 2005). Además, el uso de esponjas impregnadas con progestágenos afecta negativamente la atraktividad sexual de las ovejas (Gatti y Ungerfeld, 2012), probablemente debido a la alteración de la flora vaginal, necesaria para la atraktividad sexual normal (Ungerfeld y Silva, 2005).

A pesar de los aspectos negativos mencionados, los beneficios obtenidos (genéticos, económicos, manejo) con los protocolos de sincronización de celos y de la ovulación, hacen que esta práctica se extienda cada vez más.

### 1.3 Efecto macho

Los eventos reproductivos (estacionalidad, ciclo estral, ovulación, luteólisis, celo, etc.) son controlados por factores internos (endócrinos, genéticos, etarios, experiencia sexual), y ambientales (fotoperíodo, temperatura, nutrición, interacciones socio-sexuales). Dentro de estos factores, las interacciones entre parejas sexuales y entre animales del mismo sexo son especialmente importantes en cuanto al control de la reproducción. De hecho, dependiendo del contexto biológico, los efectos de las interacciones sociales pueden resultar en la inhibición de la reproducción en algunos individuos del grupo, o en la estimulación y sincronización de la neuroendocrinología y del comportamiento (ver revisión: Gelez y Fabre-Nys, 2004).

Underwood et al. (1944) reportaron que la introducción súbita de carneros podría ser inductor del estro en ovejas anéstricas. Sin embargo, no fue sino hasta la década de 1980 en que se comenzó a investigar este efecto en forma sistemática (Ungerfeld, 2005). Es así que se observó que si se aísla a ovejas acíclicas, tanto prepúberes, en anestro estacional, como anovulatorias en lactación, de todo contacto con carneros se puede estimular su ovulación a partir de la reintroducción de los machos (ver revisión: Martin et al., 1986). Este efecto es llamado “efecto macho” (ver revisión: Delgadillo et al., 2009). El efecto macho también ha sido estudiado en otras especies, tales como caprinos (Chemineau, 1983), suinos (Brooks y Cole, 1970) y bovinos (Rekwot et al., 2000).

El efecto macho puede ser incluido en un sistema de producción que tienda a ser limpio, verde y ético de manera aislada o utilizado para minimizar la cantidad total de hormonas utilizadas (Martin et al., 2004). A pesar de que la utilización del efecto macho ha sido ampliamente estudiada en ovejas en anestro – inducción de la ovulación, estro comportamental y preñez fuera de la estación reproductiva para la producción de corderos (ver revisión: Ungerfeld et al., 2004) –, los resultados del uso del efecto macho durante la temporada reproductiva han sido poco estudiados.

El efecto macho se produce por una combinación de estímulos, donde no es una condición necesaria el contacto directo entre machos y hembras (Pearce y Oldham, 1988; Cushwa et al., 1992). La lana, la cera y la secreción de la glándula anteorbital del macho contienen sustancias que estimulan a la hembra (Knight y Lynch, 1980; Cohen-Tannoudji et al., 1994), por lo que los estímulos químicos juegan un papel importante (ver revisión: Gelez y Fabre-Nys, 2004). Aunque no se ha podido caracterizar totalmente las sustancias responsables del efecto macho, se ha trabajado en la identificación química de las mismas, encontrándose que la respuesta de la hembra depende de varios componentes (Cohen-Tannoudji et al., 1994), observándose que los ácidos grasos de las secreciones presentes en la lana son importantes para las respuestas fisiológicas de la oveja (Cohen-Tannoudji, 1984). Cohen-Tannoudji et al. (1994) analizaron componentes (fracción ácida y fracción neutra) de la secreción de la lana observando que ambos son necesarios para obtener una respuesta. Además, combinaron formulaciones sintéticas con la fracción ácida obteniendo también una respuesta. El olor (Over et al., 1990) o la presencia (Knight et al., 1983) de los machos cabríos también puede estimular a las ovejas, y a su vez el olor de los carneros puede estimular a las cabras (Ichimaru et al., 2008), por lo que es posible que las moléculas de las sustancias responsables del efecto macho sean muy similares en estas dos especies (Knight et al., 1983; Ichimaru et al., 2008). El sistema olfatorio principal (Gelez et al., 2004b), y no el accesorio (Cohen-Tannoudji et al., 1989), es el principal responsable de la respuesta de LH en las ovejas en anestro.

La experiencia sexual de las ovejas puede influir en su respuesta a la presencia de los machos. El olor de los machos no es capaz de activar totalmente los sistemas olfatorios involucrados en la respuesta a los carneros en ovejas sin experiencia sexual (Chanvallon y Fabre-Nys, 2009). Las ovejas experientes exhiben una respuesta de LH frente al olor de los machos significativamente mayor que las ovejas inexperientes (Gelez et al., 2004a). Según Chanvallon et al. (2010), el contacto previo de ovejas jóvenes (5 o 9 meses de edad) con machos puede significar una experiencia estresante, la cual conduce

a una inhibición del efecto macho en una experiencia posterior (12 meses de edad). Sin embargo, ante la introducción de los machos, Gelez et al. (2004a) no encontraron diferencias en la respuesta de LH entre ovejas inexperientes u ovejas con experiencia. Más aún, la cantidad de hembras en celo fue mayor en corderas de 14-15 meses que habían estado en contacto con machos durante 6 semanas a los 10-11 meses, que las que no estuvieron en contacto con machos (Murtagh et al., 1984). De todas formas, está claro que tanto la edad como la experiencia sexual pueden influenciar la actividad sexual. Como hemos visto, para que el conjunto de estímulos que se ha mencionado sea efectivo en inducir la ovulación, tradicionalmente se ha considerado necesario que exista un aislamiento previo entre machos y hembras. A pesar de ello, no existen estudios sistematizados sobre la duración y distancia necesarias para el aislamiento. Es así que los períodos de aislamiento tradicionalmente reportados varían mucho, siendo por ejemplo de 2 semanas (Abecia et al., 2002), 45 días (Ungerfeld y Rubianes, 1999) o 3 meses (Atkinson y Williamson, 1985; Rosa et al., 2003). Incluso en algunos casos se aisló a los animales pero no se reportó la duración del período (Evans et al., 2004; Hawken et al., 2005). Si se reintroducen los mismos carneros que estaban en contacto con las ovejas previo a la separación sería necesario al menos un mes de aislamiento (Jorre de St Jorre et al., 2012). En algunas condiciones, en animales muy receptivos, el período de aislamiento previo podría ser sustituido por la introducción de machos nuevos, distintos a los que ya estaban en contacto con las hembras (Pearce y Oldham, 1988; Hawken y Beard, 2009, Jorre de St Jorre et al., 2012), hecho también observado en cabras (Veliz et al., 2006). Esto no sería generalizable para su utilización en establecimientos ganaderos ya que habría que tener más machos de los necesarios, pero en algún caso podría facilitar el manejo a nivel experimental al disminuir los tiempos de aislamiento necesarios para realizar experimentos. Al margen de estudios puntuales y con un número bajo de animales (Rodríguez Iglesias et al., 1997; Scaramuzzi et al., 1992), no se ha estudiado en profundidad la relación macho:hembra necesaria para producir un estímulo adecuado. De todas formas, la mayoría de los autores utilizan entre 3 y 8% de machos en estudios de campo.

Las hembras ovulan y presentan estro en mayor porcentaje cuando se utilizan carneros adultos que cuando se utilizan carneros jóvenes (Ungerfeld et al., 2008). Por otra parte, Fulkerson et al. (1981) determinaron que machos ovinos castrados tratados con testosterona son igual de eficaces en inducir la ciclicidad en hembras en anestro que machos sin castrar. Con esto se podría deducir que el nivel de testosterona es determinante en el efecto macho. Sin embargo, Signoret et al. (1982) encontraron que para inducir el comienzo de la ciclicidad, es más efectiva la introducción de machos castrados tratados con testosterona y con una importante actividad sexual, que la introducción de machos tratados con la misma cantidad de andrógenos pero con menor actividad sexual. Además, Tervit y Peterson (1978) concluyeron que las diferencias en nivel de testosterona circulante no reflejan la efectividad del efecto macho para estimular el inicio de actividad ovárica de las ovejas. Machos con mayor actividad sexual proveen un mejor estímulo para el inicio de la ciclicidad que machos con menor actividad sexual, dando como resultado un número mayor de ovejas en celo y una mejor calidad del ciclo estral (elevación de P4 durante más tiempo) (Perkins y Fitzgerald, 1994). Es así que una conjunción de los niveles de testosterona, secreción de sustancias

químicas, experiencia y comportamiento sexual determinan el efecto de los machos sobre las hembras.

La raza de los machos también influye sobre la intensidad de la respuesta por parte de la hembra. En machos de razas más sensibles al fotoperíodo, el crecimiento testicular generalmente comienza con el aumento de las horas de luz en primavera-verano, y el tamaño de los testículos tiene su pico sobre el final del verano y comienzo del otoño, antes del pico en la actividad ovulatoria espontánea en hembras, al final del otoño o comienzo del invierno (Walkden-Brown et al., 1999). De esta manera, diferentes razas tienen diferentes perfiles de testosterona durante la temporada reproductiva (D'Occhio et al., 1984). Meyer (1979) encontró una mejor respuesta (manifestación del celo semanas antes) en hembras estimuladas con machos Dorset, que en hembras estimuladas con machos Finn x Romney o Romney. Los machos Dorset también presentan diferencias por sobre los Romney en términos de momento del estro y de la concepción (Tervit et al., 1977) y sobre los machos Suffolk en términos de tasa de nacimientos y fecha de nacimiento (Nugent et al., 1998b). Si bien los carneros Corriedale tienen un patrón estacional similar a los Milchschaaf, resultan más efectivos en inducir la ciclicidad en ovejas en anestro que estos últimos (Ungerfeld, 2012). Las diferencias en libido y/o producción de sustancias químicas, todo lo cual se encuentra relacionado con los niveles de testosterona, pueden ser condicionantes para esta diferencia entre razas. Los machos de estas razas podrían generar estímulos de baja intensidad y calidad (Martin y Greef, 2011). Además, es posible que las razas difieran en algunas señales sexuales, tales como señales químicas u otras, así como en diferentes niveles de adaptación a condiciones de manejo, y/o en diferencias entre la raza de los machos y de las hembras (Ungerfeld, 2012).

También se han encontrado diferencias en las respuestas de ovejas de diferentes razas (Nugent et al., 1988a; Thompson et al., 1990; Meyer, 1979). La raza de la oveja y el momento del anestro estacional son determinantes importantes en la profundidad del anestro y por tanto en la respuesta a la introducción de los machos (Chanvallon et al., 2011). Si bien no existe acuerdo en que significa la profundidad del anestro desde el punto de vista fisiológico (Ungerfeld et al., 2004), algunos autores establecen que la pulsatilidad de LH puede utilizarse como parámetro de medida de profundidad del anestro (ver revisión: Ungerfeld et al., 2004). La frecuencia de pulsos, la concentración media de LH y el grado de interacción macho-hembra difiere según raza o momento del anestro, siendo mayores en las razas menos estacionales y habiendo mayor posibilidad de encontrar un porcentaje de animales en celo en el período de anestro tardío. Ungerfeld et al. (2004) destacan que las ovejas que luego presentarán fase luteal presentan mayores concentraciones de FSH antes de la introducción de los carneros que aquellas que no lo harán. Por otra parte, este período de anestro profundo se sitúa entre dos períodos de transición (Mallampati et al., 1971), los cuales han sido estudiados para las distintas razas (Forcada et al., 1992; Rubianes et al., 1995). En razas ovinas con estación reproductiva más marcada la profundidad del anestro puede hacer más refractaria la oveja al estímulo de los machos (Nugent et al., 1988a).

El conocimiento de todos estos aspectos del efecto macho, sumado a que los costos de la utilización del mismo son relativamente bajos, hace interesante el uso del mismo

en reproducción. Su uso en ovejas cíclicas se fundamenta en la potencialidad de obtener respuestas que permitan incluirlo en el manejo a nivel productivo. Por ello es interesante estudiar el posible uso conjunto con los tratamientos tradicionales de sincronización de celo, y con ello poder minimizar el uso de hormonas.

### *1.3.1 Efecto macho en ovejas en anestro estacional*

Durante el anestro estacional, el estímulo de los machos determina un incremento de la pulsatilidad y concentración de LH de las ovejas (Martin et al., 1980) y un crecimiento de los folículos ováricos (Atkinson y Williamson, 1985), finalizando con la ovulación (ver revisión: Delgadillo et al., 2009). Esta ovulación no se asocia con una manifestación de celo, siendo una ovulación silenciosa. En algunas ovejas, el primer celo se da junto con la segunda ovulación, 17-20 días después de la introducción de los carneros. Mientras tanto, en otras ovejas existe una fase luteal inicial corta de 4 a 5 días, luego una segunda ovulación sin signos de celo, seguido por una fase luteal de duración normal. Luego de ello, se produce una tercera ovulación, la que sí está asociada con el celo (ver revisión: Ungerfeld et al., 2004). Además, en ovejas en anestro existen otras respuestas ováricas, tales como la luteinización de folículos no ovulatorios, ovulaciones retardadas (a los 4-5 días de la introducción de los carneros), y el desarrollo de quistes foliculares luteinizados (Ungerfeld et al., 2002).

Tal como se mencionó anteriormente, se ha observado que si se aísla a ovejas prepúberes, en anestro estacional, o anovulatorias en lactación de los carneros, se puede estimular su ovulación mediante la reintroducción de los mismos (Martin et al., 1986). El mecanismo por el que las ovejas responden es el mismo. La introducción de machos también estimula la secreción de LH y la ovulación en ovejas prepúberes (Al-Maully, 1991), pudiendo adelantar la pubertad de las mismas (Murtagh et al., 1984; Oldham y Gray, 1984).

El efecto macho puede reducir la duración del anestro posparto en hembras que parieron en otoño o primavera (Wright et al., 1989). Lassoued et al. (2004) observaron que la introducción de los carneros desde el momento del parto (si este ocurre durante la estación reproductiva), adelanta el inicio de la actividad ovárica postparto en aproximadamente 30 días, e induce un pico de estros aproximadamente a los 40 días.

López-Sebastian e Inskeep (1988) en ovejas, y López-Sebastian et al. (2007) en cabras, utilizaron efecto macho y una sola dosis de PGF<sub>2</sub> $\alpha$  varios días después de la introducción de los machos. Estos autores buscaron comparar la efectividad de distintos protocolos para la sincronización de celos u ovulación, respectivamente. Sin embargo, desde el punto de vista de la cantidad de hormonas utilizada, estos protocolos no colaboran en disminuir la dosis total de las mismas ya que sugieren un pretratamiento con P4.

Para lograr que se presente celo de manera conjunta con la primera ovulación seguido de una fase luteal normal, se pueden utilizar dispositivos con progestágenos antes de la introducción de los carneros (Hunter et al., 1971). Por otra parte, con la administración de 2,5 mg de acetato de medroxiprogesterona 1, 3 o 5 días antes de la

introducción de los machos se obtiene una concentración de celos 17 a 20 días después de la misma (Ungerfeld et al., 2003). Los progestágenos cumplen el papel de un cuerpo lúteo y permiten, en conjunto con el efecto macho, adelantar la manifestación de celos en ovejas en anestro, y que los mismos sean seguidos de una fase luteal normal.

### 1.3.2 *Efecto macho en ovejas cíclicas*

Aunque la información es escasa, se han observado efectos positivos del efecto macho sobre ovejas durante la transición a la estación reproductiva. Schinkel (1954) observó que la introducción de machos durante esta etapa, a ovejas que aún no habían comenzado la actividad cíclica, estimulaba una ovulación sin celo. Esta ovulación sin celo también ha sido observada en ovejas que están en transición de prepúberes a púberes, encontrando además una sincronización de las montas por la presencia de los machos (Dýrmundsson y Lees, 1972). Sin embargo, estos autores no observaron un adelantamiento del comienzo de la actividad estral en comparación con animales que no fueron expuestos al efecto macho.

Al igual que en ovejas en anestro, en ovejas cíclicas también se han reportado períodos de aislamiento muy variables, yendo de 1 (Lucidi et al., 2001) a 10 meses (Ngere y Dzakuma, 1975). Inclusive se ha observado que una exposición previa a los machos, durante la mitad del período de anestro, es importante para el desarrollo de interacciones macho-hembra apropiadas, pero no es un pre-requisito para la respuesta endócrina al efecto macho (en términos de frecuencia, amplitud y pico de LH) (Hawken et al., 2007b).

La presencia crónica de los machos adelanta el comienzo de la estación reproductiva (Eldon, 1993), efecto que se puede mejorar si además se aumenta la cantidad de horas de luz o si se aplican implantes con melatonina a los animales (Sweeney y O'Callaghan, 1996). O'Callaghan et al., (1994) observaron que la finalización de la estación reproductiva puede extenderse uno o dos ciclos mediante el contacto continuo con carneros desde el solsticio de invierno. De esta manera, se puede lograr extender la misma.

Se ha observado que la introducción de los carneros al comienzo de la temporada reproductiva provoca un incremento súbito en los niveles de LH de las ovejas (Chesworth y Tait, 1974). Además, las ovejas cíclicas responden a la introducción de carneros con un incremento en la frecuencia de pulsos de LH independientemente del momento del ciclo estral (Hawken et al., 2007a). Este incremento en pulsatilidad de LH se produce incluso en ovejas preñadas (Al-Gubory, 1998) y en ovejas tratadas con dispositivos con progestágenos al ser estimuladas con machos durante el tratamiento (Evans et al., 2004). Sin embargo, en cabras cíclicas habría un nivel de P4 (en la fase luteal media) por arriba del que los machos no producen efecto (Hawken et al., 2009). Evans et al (2004) observaron que el incremento de la secreción de LH provocado por la exposición de las ovejas a los machos estimula el desarrollo folicular, lo que a su vez determina una mayor producción de estradiol (Baird, 1978; Spencer et al., 1995). Por lo tanto, el efecto macho podría desencadenar respuestas similares a los cambios fisiológicos que se dan durante una fase luteal tardía normal (Figura 2). En este sentido,

Chemineau (1983) observó una respuesta estral bimodal luego de la introducción de machos a un grupo de cabras cíclicas previamente aisladas, sugiriendo que se provocó la luteólisis en parte de las cabras del rebaño. Asimismo, Mellado y Hernández (1996) observaron una importante concentración de celos en cabras cíclicas estimuladas por machos, lo que puede ser consecuencia del adelantamiento de la luteólisis en algunas hembras.

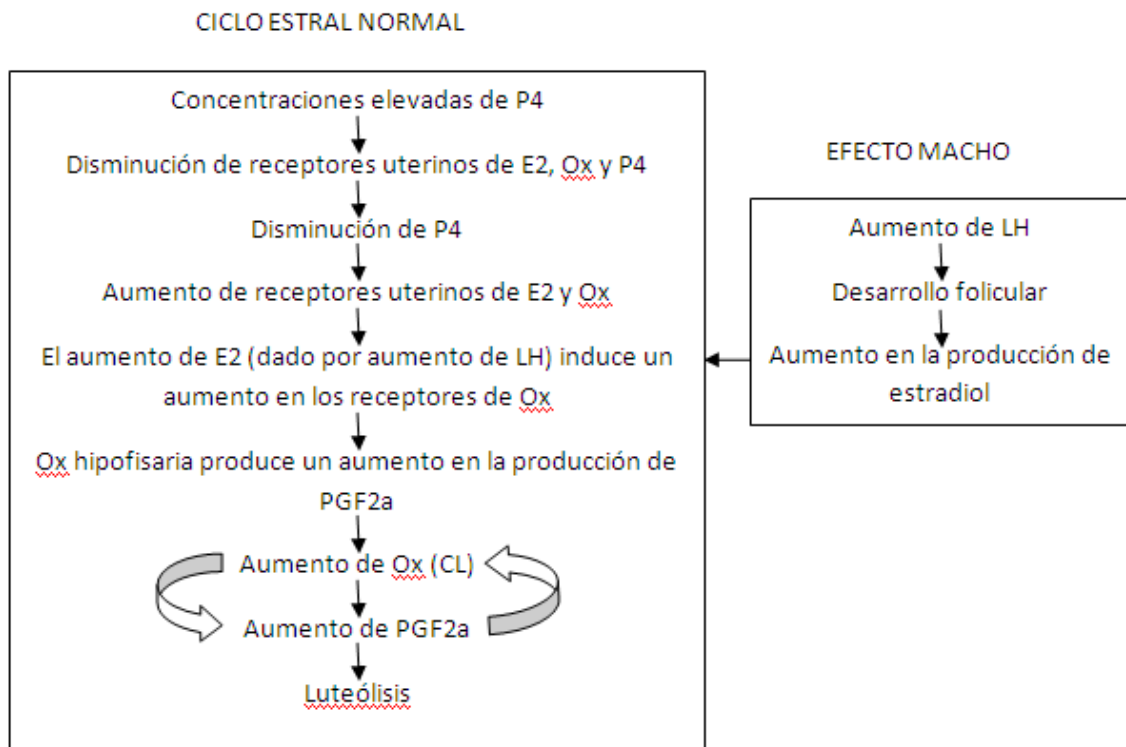


Figura 2. Esquema de un ciclo estral normal, de los efectos del efecto macho, y de cómo éste podría desencadenar respuestas similares a las que se dan durante una fase luteal normal, finalizando en luteólisis.

Ahondar en la relación entre la respuesta neuroendócrina al efecto macho, la dinámica del ciclo estral y la fertilidad, podría permitir el desarrollo de estrategias de manejo basadas en la sincronización de celos durante la estación reproductiva (ver revisión: Delgadillo et al., 2009). Se han probado protocolos de manejo reproductivo en los que se combina la utilización del efecto macho con protocolos hormonales durante la estación reproductiva para obtener mejores resultados en la sincronización de los celos. Entre ellos, se puede destacar el uso de progestágenos y PGF2 $\alpha$ . Para el caso de los progestágenos, el uso del efecto macho al final del tratamiento con progestágenos logró adelantar el pico de LH y la ovulación (Lucidi et al., 2001) y acortar el intervalo al celo en ovejas durante la estación reproductiva temprana (Ungerfeld y Rubianes, 1999). Contreras-Solis et al. (2009a) utilizaron efecto macho y PGF2 $\alpha$  en protocolos cortos (dos dosis separadas 7 días), logrando una inducción más temprana del pico



preovulatorio de LH y de la ovulación que cuando se utilizó el mismo protocolo pero sin utilizar efecto macho. Por último, Hawken et al. (2007a) sugieren diferentes implicancias del efecto macho en ovejas cíclicas según el momento del ciclo estral, planteando la posibilidad de un efecto luteolítico del mismo durante la fase luteal tardía.

Ungerfeld (2011) estudió la incorporación del efecto macho a tratamientos de sincronización de celo con dos dosis de PGF2 $\alpha$ . La introducción de machos de manera simultánea con la segunda administración de PGF2 $\alpha$  provocó un adelantamiento del comienzo del celo e incrementó el número de ovejas que fueron observadas en celo. Mientras tanto, la introducción de los machos 13 días después de una dosis de PGF2 $\alpha$  no sustituyó la administración de una segunda dosis de PGF2 $\alpha$ . El autor especuló con que la potencia del efecto macho pudo no haber sido suficiente para sustituir completamente la administración de la segunda dosis de PGF2 $\alpha$ . Por tanto, una alternativa podría ser utilizar media dosis de prostaglandina para complementar el efecto de la introducción de los machos. A pesar de que esto implica solo una leve disminución en el total de hormonas utilizadas, la posible obtención de resultados positivos proveería una base para continuar con el desarrollo de tratamientos con menor contenido hormonal.

## **2 Hipótesis**

Como hipótesis general de esta tesis se planteó que el efecto macho es efectivo en sustituir parcialmente a la  $\text{PGF2}\alpha$  durante la fase luteal tardía para inducir la presentación de celo. En base a ello se diseñaron dos trabajos experimentales.

Para el primero se testeó la hipótesis de que en un protocolo de dos dosis de  $\text{PGF2}\alpha$  separadas 13 días, el efecto macho sustituye la mitad de la segunda dosis.

Luego de ello, y dados los resultados del primer experimento, se planteó la hipótesis de que el día de la fase luteal tardía en que se estimula a las ovejas afecta la respuesta al tratamiento.

### **3 Objetivos**

El objetivo general fue determinar si el efecto macho puede sustituir parcialmente el uso de  $\text{PGF2}\alpha$  en un tratamiento de sincronización de celo en ovejas cíclicas.

#### **3.1 Objetivos Específicos**

El objetivo del primer trabajo fue determinar si la segunda dosis de  $\text{PGF2}\alpha$ , en un protocolo de sincronización de celos en ovejas cíclicas, puede ser sustituida por el uso conjunto de media dosis y el efecto macho.

El objetivo del segundo trabajo fue determinar si existe un momento de la fase luteal tardía en la que las ovejas sean más sensibles al tratamiento descrito anteriormente.

## **4 Estrategia de investigación**

### **4.1 Marco**

Este trabajo de Tesis se enmarca dentro de una de las líneas de trabajo del Laboratorio de Fisiología de la Reproducción de Facultad de Veterinaria, UdelaR. De hecho, intenta responder interrogantes planteadas en un trabajo de este mismo laboratorio (Ungerfeld, 2011). En este sentido, los tratamientos en los que las dos dosis de PGF2 $\alpha$  son administradas separadas pocos días (7-8) proveen los mejores resultados en cuanto a sincronización de celo (Olivera-Muzante et al., 2011; Menchaca y Rubianes, 2004) aunque los resultados de los índices de concepción y fertilidad podrían mejorar separando ambas dosis 14 a 16 días (Dutra y Soler, 2013). A pesar de que el acortar los tiempos entre dosis mejoraría la sincronización de los celos, en este estudio ambas dosis de PGF2 $\alpha$  fueron administradas con una separación de 13 días para asegurarse de que las ovejas estuviesen en fase luteal tardía, y que por lo tanto la respuesta al efecto macho terminase en luteólisis.

### **4.2 Inserción en el manejo productivo de los establecimientos**

Los trabajos experimentales se llevaron a cabo durante la temporada reproductiva, tratando de alterar lo menos posible el manejo reproductivo de los establecimientos en los que se realizaron. Esto impidió que se realizaran ecografías o tomas de muestras de sangre a los animales. Por otra parte, al separar las hembras en celo, estas eran inseminadas y apartadas. Las hembras inseminadas fueron dejadas con machos, y si bien se podría haber pintado a los machos para obtener información de repetición de celo, no siempre se utilizó la misma dosis de semen durante la inseminación artificial. Por esta última razón no fue posible obtener datos de fertilidad.

### **4.3 Procedimientos experimentales**

Debido a que en el primer experimento se observó que el efecto macho puede adelantar la manifestación de celo en al menos una proporción de las ovejas, se estableció la hipótesis y el objetivo del segundo experimento.

## 5 Materiales y Métodos

### 5.1 Experimento 1

#### 5.1.1 *Animales y localización*

Este experimento se llevó a cabo en un establecimiento ganadero en Artigas, Uruguay (30° S). Se utilizaron 296 ovejas nulíparas Merino x Corriedale, de 1 a 2 años de edad, con un peso de  $33,5 \pm 2,0$  kg, y 24 carneros vasectomizados. Este experimento se realizó durante la estación reproductiva (14 al 24 de marzo). En este aspecto, es de destacar que el trabajo experimental se enmarcó dentro del esquema anual de trabajo del establecimiento; es decir, que todos los años en esa misma fecha se lleva a cabo el trabajo de sincronización de celos de esa majada. Los animales de los distintos grupos fueron mantenidos en iguales condiciones de alimentación (pasturas naturales) con agua ad libitum. Si bien el área disponible para los animales en los distintos grupos fue diferente, la dotación por hectárea fue similar, así como la oferta de forraje.

#### 5.1.2 *Grupos experimentales y manejo*

Las ovejas fueron asignadas al azar a tres grupos experimentales. Las ovejas de 2 de estos grupos (PG2: n = 91 y PGM: n = 110) fueron mantenidas en contacto permanente con 16 machos vasectomizados desde el Día -40 (Día 0 = introducción de los carneros) (ver Figura 3). Ambos grupos recibieron una dosis completa de un análogo de PGF2 $\alpha$  (dinoprost trometamina; Lutalyse, Pfizer, Kalamazoo, Michigan, Estados Unidos de América) el día -13. El día 0, las ovejas del grupo PG2 recibieron una segunda dosis completa de PGF2 $\alpha$ , y las ovejas del grupo PGM recibieron media dosis (5 mg). Las ovejas del tercer grupo (PGME; n = 95) fueron mantenidas aisladas de los machos hasta el Día 0 (vista, sonido, olor; distancia mínima: 1000 m), y recibieron 10 mg de PGF2 $\alpha$  al Día -13, y una media dosis (5 mg) al Día 0. El día 0 se reunió a los tres grupos y se sumaron 8 carneros vasectomizados para mantener la relación macho:hembra (un macho por cada 12 hembras; 8%). La receptividad sexual fue estimada a partir de las marcas de pintura, dos veces al día hasta el día 11,5. Esto fue llevado a cabo en la mañana (comenzando a las 7:30 am) y en la tarde (comenzando a las 6 pm).

		Días											Machos		
Grupo		-13	-12	-11	-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0
Con machos desde d -40	PG2	PGF2 $\alpha$												PGF2 $\alpha$	
	PGM	PGF2 $\alpha$												1/2 PGF2 $\alpha$	
Aisladas d -40	PGME	PGF2 $\alpha$												1/2 PGF2 $\alpha$ + EM	

Figura 3. – Protocolo para el Experimento 1. Las ovejas de los grupos que estuvieron en contacto con los machos (PG2 y PGM) recibieron una dosis de PGF2 $\alpha$  el día -13. El día 0 las ovejas del primero de estos grupos recibieron otra dosis de PGF2 $\alpha$ , mientras que las ovejas del segundo grupo recibieron media dosis. Las ovejas del grupo PGME, que se mantuvieron aisladas de los machos hasta el día 0, recibieron una dosis de PGF2 $\alpha$  el día -13 y media dosis al día 0. El día 0 se reunió a los tres grupos, introduciendo más machos para mantener la relación macho hembra.

## 5.2 Experimento 2

### 5.2.1 *Animales y localización*

Este experimento se llevó a cabo en un establecimiento ganadero en Flores, Uruguay (33° S), con 218 ovejas multíparas Corriedale de 3 a 5 años de edad, durante la estación reproductiva (en los meses de enero y febrero). Al igual que en el primer experimento, el trabajo experimental se enmarcó dentro del esquema anual de trabajo del establecimiento, aunque en este caso en el establecimiento no se llevaba a cabo sincronización de celos, sino monta natural. Todos los animales fueron mantenidos en iguales condiciones de alimentación (pasturas naturales) con agua ad libitum. Si bien el área disponible para los animales en los distintos grupos fue diferente, la dotación por hectárea fue similar, así como la oferta de forraje.

### 5.2.2 *Grupos experimentales y manejo*

Las ovejas fueron asignadas al azar a 5 grupos, de los que solo el grupo control (PG3; n = 44) se mantuvo en contacto con capones androgenizados desde el Día -40 (Día 0 = introducción de los machos). Los capones fueron tratados semanalmente con propionato de testosterona (30 mg/kg; Testosterona Ultra Lenta Fuerte, Dispert, Montevideo, Uruguay). Las otras 174 ovejas fueron mantenidas aisladas de los machos desde el Día -30. Se presincronizó los ciclos estrales de los cinco grupos con 2 dosis completas (10 mg) de un análogo de PGF2 $\alpha$  (dinoprost trometamina; Lutalyse, Pfizer, Kalamazoo, Michigan, Estados Unidos de América) separadas 7 días, y recibieron o una tercera dosis completa (10 mg) 13 días más tarde (Día 0) (ovejas del grupo PG3), o media dosis (5 mg) junto con la introducción de los machos 12, 13, 14 o 15 días después

(Día 0) para los grupos FL12 (n = 43), FL13 (n = 43), FL14 (n = 44), FL15 (n = 44) respectivamente. El esquema general del experimento es presentado en la Figura 4. Al día 0 todas las ovejas fueron reunidas de manera que se mantuviera una relación de un macho por cada 13 hembras (7%). Los machos fueron pintados en la zona ventral. La receptividad sexual fue estimada a partir de las marcas de pintura, dos veces al día hasta el día 5,5. Esto fue llevado a cabo en la mañana (comenzando a las 7:30 am) y en la tarde (comenzando a las 6 pm).

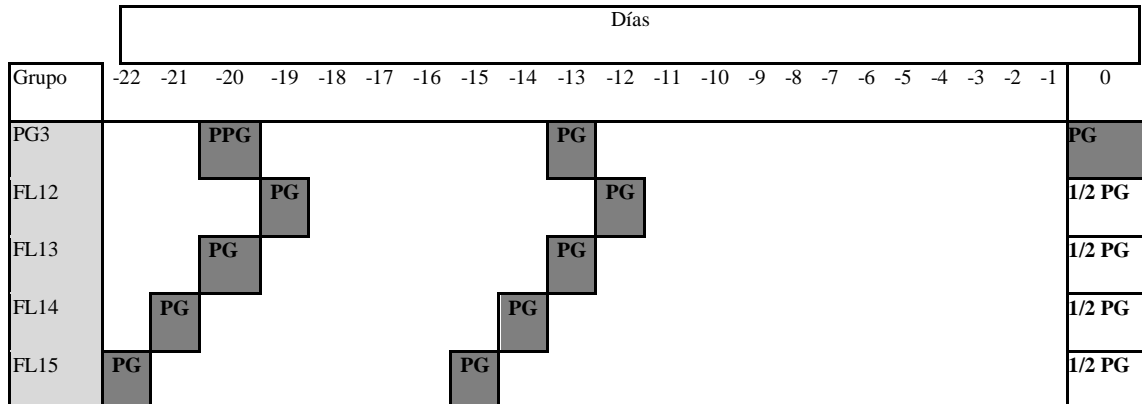


Figura 4.- Protocolo para el Experimento 2. Las ovejas que estuvieron en contacto con los machos (PG3) recibieron 2 dosis de PGF2 $\alpha$  separadas 7 días, y una tercera dosis 13 días después (Día 0). Las ovejas que se mantuvieron aisladas de los carneros hasta el Día 0 fueron tratadas con 2 dosis de PGF2 $\alpha$  separadas 7 días, y con una tercera media dosis y la introducción de los machos 12, 13, 14 o 15 días después (Día 0) (Grupos FL12, FL13, FL14 o FL15).

### 5.3 Análisis estadístico

En el Experimento 1, se comparó la frecuencia acumulada diaria de ovejas marcadas en los 3 grupos mediante el test de chi cuadrado. En el Experimento 2, se comparó la frecuencia acumulada diaria de cada grupo experimental (FL12, FL13, FL14 y FL15) con la del grupo control (PG3) mediante el test de chi cuadrado. En ambos experimentos se consideró un nivel de significancia de P = 0,05.

## 6 Resultados

### 6.1 Experimento 1

En la Figura 5 se presenta la frecuencia acumulada de ovejas marcadas hasta el día 4,5. En los días 1 y 1,5 más ovejas del grupo PGME presentaron estro en comparación con las ovejas de los grupos PG2 ( $P = 0.0007$  y  $P = 0.02$ ) y PGM ( $P = 0.004$  y  $P = 0.02$ ). Durante los días 2 y 2,5 la frecuencia acumulada de ovejas que presentaron estro fue similar para los tres grupos. Desde el día 3 a 4,5 más hembras del grupo PG2 presentaron estro en comparación con las hembras de los grupos PGME (Día 3:  $P = 0,005$ ; Día 3,5:  $P = 0,008$ ; Día 4:  $P = 0,008$ ; Día 4,5:  $P = 0,02$ ) y PGM (Día 3:  $P = 0,0004$ ; Día 3,5:  $P = 0,0006$ ; Día 4:  $P = 0,001$ ; Día 4,5:  $P = 0,02$ ). A partir del día 4,5 hasta la finalización del experimento (Día 11,5) no hubo diferencias entre los tres grupos en cuanto a las frecuencias acumuladas de ovejas que presentaron estro. Al momento de la finalización del experimento, 87 de las 95 (91,6%) ovejas del grupo PGME, 104 de las 110 ovejas del grupo PGM (94,5%) y 87 de las 91 (95,6%) ovejas del grupo PG2 habían presentado estro.



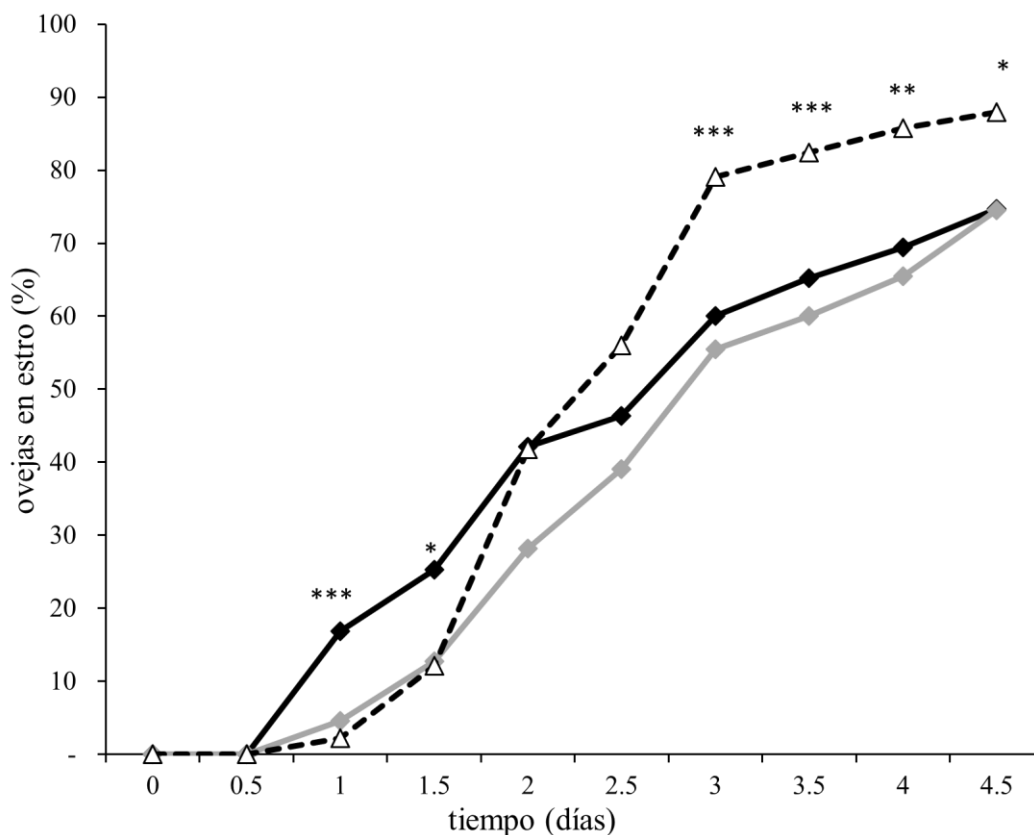


Figura 5. Frecuencia acumulada de ovejas en estró hasta el día 4,5. Las ovejas que se mantuvieron en contacto con los machos recibieron dos dosis completas de PGF2 $\alpha$  (PG2;  $\cdots\triangle\cdots$ ) o una dosis completa seguida de una media dosis de PGF2 $\alpha$  13 días después (PGM;  $\text{---}\blacklozenge\text{---}$ ); las ovejas que se mantuvieron aisladas de machos fueron tratadas con una dosis completa seguida de media dosis de PGF2 $\alpha$  13 días después (PGME;  $\text{---}\blacklozenge\text{---}$ ). Al Día 1 y 1,5 más ovejas del grupo PGME presentaron estró que ovejas de los grupos PG2 y PGM. Durante los Días 2 y 2,5 no hubo diferencias y las frecuencias acumuladas fueron similares para los tres grupos. Del Día 3 al Día 4,5 más ovejas del grupo PG2 presentaron estró en comparación con las ovejas de los otros dos grupos. Los asteriscos indican diferencias significativas (\*:  $P\leq 0.05$ ; \*\*:  $P\leq 0.01$ ; \*\*\*:  $P\leq 0.001$ ).

En la Figura 6 se presenta la distribución de celos. Al igual que en el Experimento 1, no se observaron aspectos a destacar.

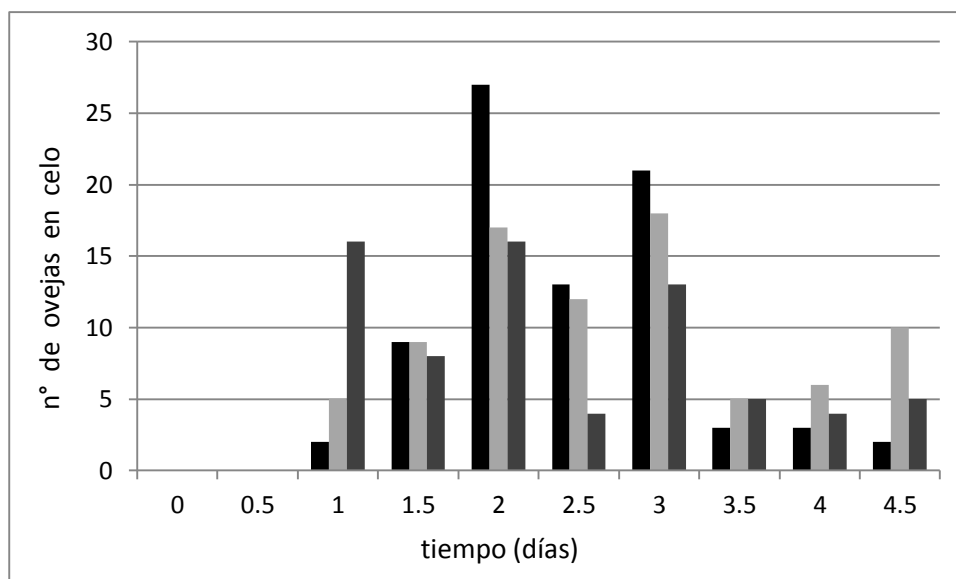


Figura 6. Distribución de celos hasta el día 4,5. Las ovejas que se mantuvieron en contacto con los machos recibieron dos dosis completas de PGF2 $\alpha$  (PG2; ■) o una dosis completa seguida de una media dosis de PGF2 $\alpha$  13 días después (PGM; ■); las ovejas que se mantuvieron aisladas de machos fueron tratadas con una dosis completa seguida de media dosis de PGF2 $\alpha$  13 días después (PGME; ■). No se observaron aspectos a destacar.

## 6.2 Experimento 2

En la Figura 7 se presenta la frecuencia acumulada de ovejas marcadas hasta el día 5,5. Al haber comparado de manera individual los grupos FL12, FL13, FL14 y FL15 con el grupo PG3, las Figuras 7a, 7b, 7c y 7d presentan, respectivamente, los datos de cada grupo, incluyendo en cada figura los datos del grupo PG3. Hasta el Día 2 no hubo diferencias entre grupos. Hasta el Día 2 no hubo diferencias entre las hembras del grupo PG3 y las de los grupos experimentales. En los días 2,5, 3, 3,5 y 4 más hembras del grupo PG3 presentaron estro en comparación con las ovejas del grupo FL12 ( $P < 0,05$ ) (Figura 7a). En los días 2, 2,5, 3, 3,5 y 4 más ovejas del grupo PG3 fueron detectadas en estro que las ovejas del grupo FL13 ( $P < 0,05$ ) (Figura 7b). En los días 2,5, 3 y 3,5 se detectaron en estro más ovejas del grupo control que del grupo FL14 ( $P < 0,05$ ) (Figura 7c). En los días 2,5, 3, 3,5 y 4,5 se detectaron en estro más ovejas del grupo PG3 que del grupo FL15 ( $P < 0,05$ ) (Figura 7d). En el Día 1 se observó una tendencia ( $P = 0,08$ ) de para el grupo FL14 (Figura 7d). Al finalizar el experimento (Día 5,5, no hubo diferencias entre grupos en cuanto a las frecuencias acumuladas de ovejas que presentaron estro: 44/44 (100%), 41/42 (97,6%), 42/43 (97,7%), 43/44 (97,7%), y 42/44 (95,5%) para PG3, FL12, FL13, FL14 y FL15 respectivamente.

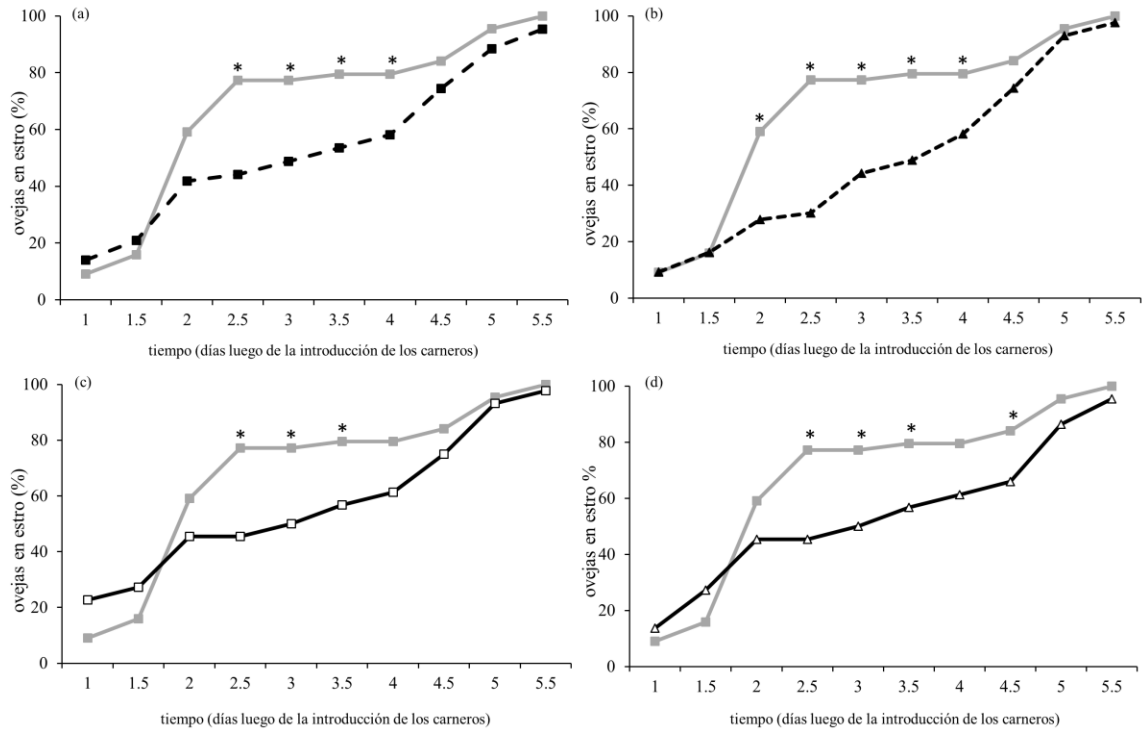


Figura 7. Frecuencia acumulada de ovejas en estro hasta el día 5,5. Las ovejas que se mantuvieron en contacto con los machos (PG3; —■—) recibieron 2 dosis de PGF2 $\alpha$  separadas 7 días, y una tercera dosis 13 días después (Día 0). Las ovejas que fueron mantenidas aisladas de los carneros hasta el Día 0 fueron tratadas con dos dosis de PGF2 $\alpha$  separadas 7 días, y recibieron una tercera media dosis la cual fue administrada 12, 13, 14 o 15 días más tarde (Día 0), al mismo momento de la introducción de los machos (grupos FL12 --■--; FL13 -▲-; FL14 —□—; FL15 —△—). A los días 2, 2,5, 3, 3,5 y 4 más ovejas del grupo control fueron detectadas en estro en comparación con al menos uno de los otros cuatro grupos. Al finalizar el experimento (Día 5,5), no hubo diferencias entre los tres grupos en cuanto a las frecuencias acumuladas de hembras en estro. Los asteriscos indican diferencias significativas (\*: P≤0.05). En el Día 1 se observó una tendencia (P = 0,08) de para el grupo FL14.

En la Figura 8 se presenta la distribución de celos. Al igual que en el Experimento 1, no se observaron aspectos a destacar.

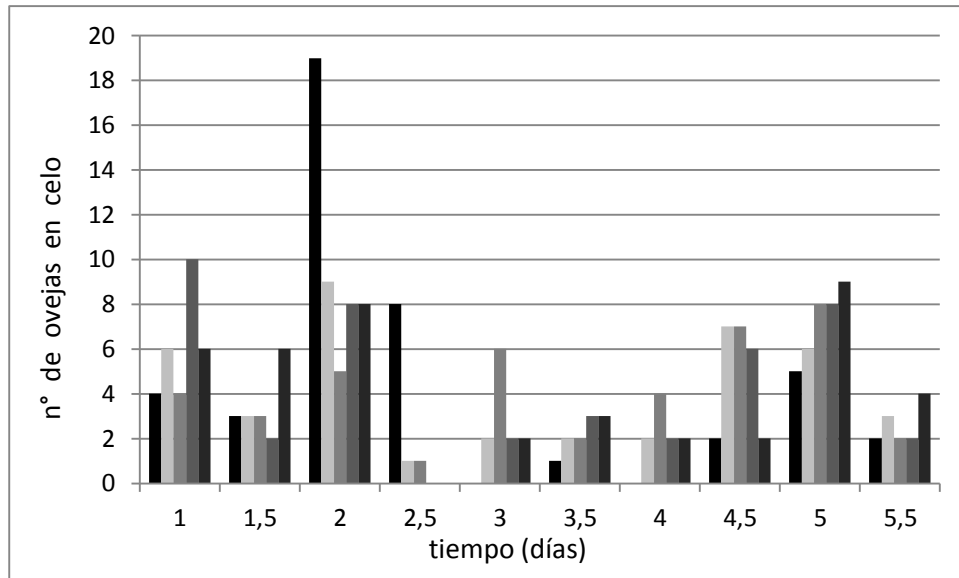


Figura 8. Distribución de celos hasta el día 5,5. Las ovejas que se mantuvieron en contacto con los machos (PG3; ■) recibieron 2 dosis de PGF2 $\alpha$  separadas 7 días, y una tercera dosis 13 días después (Día 0). Las ovejas que fueron mantenidas aisladas de los carneros hasta el Día 0 fueron tratadas con dos dosis de PGF2 $\alpha$  separadas 7 días, y recibieron una tercera media dosis la cual fue administrada 12, 13, 14 o 15 días más tarde (Día 0), al mismo momento de la introducción de los machos (grupos FL12 ■; FL13 ■; FL14 ■; FL15 ■). No se observaron aspectos a destacar.

## 7 Discusión

En el primer experimento la introducción de los machos de manera simultánea con la administración de media dosis de PFG2 $\alpha$  incrementó el número de ovejas que presentó celo poco después de esta segunda dosis (grupo PGME). Esto concuerda con los resultados obtenidos por Contreras-Solis et al. (2009a), los cuales observaron un adelantamiento del pico preovulatorio de LH y de la ovulación en ovejas sincronizadas con PFG2 $\alpha$  y estimuladas con efecto macho, lo que puede ser explicado por una luteólisis temprana. Asimismo, este resultado puede ser generado por una mayor pulsatilidad de LH durante la fase folicular, luego de inducida la luteólisis por la PGF2 $\alpha$ . Además, cuando se asoció a los carneros con media dosis de PGF2 $\alpha$  se obtuvo un mejor resultado que los reportados por Ngere y Dzakuma (1972), quienes introdujeron machos en una majada de ovejas tropicales no estacionales. Estos autores observaron una sincronía en la presentación de celos, pero no un adelantamiento de los mismos. A pesar de que la respuesta en el primer experimento fue presentada por una pequeña parte de la majada, queda claro que las ovejas que presentaron estro en ese período adelantaron el comienzo del mismo, demostrando que este tipo de manejo es potencialmente efectivo. Sin embargo, lo limitado de la respuesta sugiere que el efecto macho puede no ser lo suficientemente potente como para sustituir media dosis de PGF2 $\alpha$  cuando las ovejas tienen su cuerpo lúteo en su momento de máxima actividad funcional. La exposición de las ovejas a los machos incrementa la secreción de LH, lo que a su vez estimula el desarrollo folicular y la producción de estradiol (Evans et al., 2004). Chemineau (1983) sugirió que el aumento de estrógenos subsecuente a la introducción de machos a un grupo de cabras previamente aisladas puede inducir una rápida luteólisis y el estro. Sin embargo, Cahill (1981) encontró que la tasa ovulatoria se vincula con el pico de estradiol, y, dado que las razas Corriedale y Merino tienen una tasa de ovulación baja, la falta de una respuesta positiva de la mayor parte de la majada puede ser una consecuencia de que el incremento de estradiol provocado por los carneros no haya sido suficiente. A su vez, esto puede ser debido a que los folículos preovulatorios obtenidos luego de la primera inyección de PGF2 $\alpha$  podrían secretar menor cantidad de estrógenos que un folículo preovulatorio normal (Fierro et al., 2011). Este menor nivel de estrógenos llevaría a que no se desencadene el proceso luteolítico, de manera similar a lo reportado previamente por Ungerfeld (2011) donde no se incluyó la segunda administración de PGF2 $\alpha$ .

Por otra parte, esta falta de respuesta podría deberse a una baja sensibilidad del endometrio al estradiol en diferentes días del ciclo estral, o del cuerpo lúteo al mecanismo luteolítico. Lamsa et al. (1992) y Custer et al. (1995) demostraron que concentraciones reducidas de PGF2 $\alpha$  conducen a una desensibilización momentánea de los receptores de PGF2 $\alpha$ , y que debe transcurrir cierto tiempo hasta que los receptores vuelvan a su estado normal o se necesitarán concentraciones elevadas (luteolíticas) para superar ese estado de desensibilización. Por ello, se puede suponer que la elevación en la concentración de PGF2 $\alpha$  producida por la introducción de los machos podrían 1) no ser suficiente en algunos animales y 2) retrasar la luteólisis en otros. A pesar de que los resultados positivos no fueron importantes en cantidad, los mismos sirven como base para otro experimento que para su aplicación directa en condiciones de campo. Tomando

en cuenta todo esto, se diseñó un segundo experimento para determinar si el momento de la fase luteal (día del ciclo estral) podía limitar el porcentaje de hembras que responde.

En el segundo experimento no se observó diferencia en la respuesta estral de las ovejas según el día en que fueron estimuladas. Dado que en este experimento no se incluyó nuevamente un grupo en contacto con machos y tratado con una segunda media dosis de PGF2 $\alpha$ , no se puede descartar que hubiera un efecto positivo del efecto macho, pero en cualquier caso no estuvo relacionado con el día de la introducción de los carneros. Sin embargo, en este caso no se observó la ventaja de utilizar el efecto macho, tal como se observó en el Experimento 1. Debido a que el período de aislamiento necesario para el efecto macho no permite determinar el momento del estro, una limitante de este experimento es que no fue posible conocer el momento exacto del ciclo estral de cada oveja. El porcentaje total de animales en estro en este experimento fue levemente mayor que el observado en el Experimento 1, probablemente debido al uso de ovejas múltiparas en lugar de ovejas nulíparas. Desde un punto de vista práctico, dado que los resultados de utilizar media dosis de PGF2 $\alpha$  y el efecto macho no alcanzaron los resultados de una dosis completa hasta los días 4 a 5, el beneficio de este tratamiento solamente sería la disminución en el uso de hormonas y el costo de las mismas.

Estos estudios tienen la limitante de que la única variable de respuesta estudiada fue el número de ovejas en estro. Sin embargo, al mismo tiempo provee información útil para especular y, por tanto, estudiar los mecanismos básicos que se encuentran por detrás de esta respuesta. Por ejemplo, es interesante especular con una posible estrategia para incrementar la respuesta a la media dosis de PGF2 $\alpha$  y el efecto macho. Dado que se trató de combinar dos efectos (efecto macho y PGF2 $\alpha$  exógena), estos deben actuar de manera sincronizada. Las ovejas responden a los machos con un rápido incremento en la pulsatilidad de LH independientemente de la etapa del ciclo estral (Hawken et al., 2007a), incluso con P4 alta (Evans et al., 2004). Sin embargo, se puede asumir que el efecto macho necesita más tiempo que la PGF2 $\alpha$  exógena para generar un efecto luteolítico. Es interesante especular con una posible estrategia para incrementar la respuesta a media dosis de PGF2 $\alpha$  y el efecto macho: el tiempo que va desde el incremento de estradiol al incremento de PGF2 $\alpha$  varía desde 12 a 48 h (Ford et al., 1975). Además, los análogos de prostaglandinas producen una disminución de la síntesis de P4 luteal más rápida que durante la luteólisis natural (Liu et al., 2006), y la regresión luteal completa se alcanza antes mediante el uso de análogos de PGF2 $\alpha$  que de manera natural (ver revisión: Fierro et al., 2013). Por ello, si también se considera el tiempo que pasa desde la introducción de los machos hasta que se secreta estradiol, la secreción de PGF2 $\alpha$  provocada finalmente por los machos podría haber estado desincronizada de la administración parenteral del análogo de PGF2 $\alpha$ , haciendo menos efectivo el tratamiento de la inducción de la luteólisis. Por todo esto, una posibilidad alternativa a ser estudiada sería administrar la segunda (media) dosis de PGF2 $\alpha$  24 a 36 h después de la introducción de los machos, cuando se espera que suceda la secreción endógena de PGF2 $\alpha$  (Ford et al., 1975). En este caso, con el fin de analizar el comportamiento del cuerpo lúteo, también sería necesario estudiar los perfiles de progesterona de las ovejas para determinar si el tratamiento efectivamente desencadena el proceso luteolítico.

## **8 Conclusiones**

En conclusión, el efecto macho fue efectivo al sustituir media dosis de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  en una parte menor de la majada, aunque la respuesta no estuvo relacionada con el día de la fase luteal tardía en la cual las ovejas son estimuladas. Dado que estos resultados constituyen una base para continuar estudiando este tema, aún se debe determinar cómo obtener un mayor porcentaje de ovejas que responden, de manera de incluir este manejo en trabajos prácticos de sincronización de celo.

## 9 Bibliografía

- Abecia-Martínez A, Forcada-Miranda F. (2010). Manejo reproductivo en ganado ovino. Editorial Servet. P: 5.
- Abecia JA, Forcada F, Zúñiga O. (2002). A note on the effect of individual housing conditions on LH secretion in ewes after exposure to ram. *Appl Anim Behav Sci* 75, 347-352.
- Acritopoulou S, Haresign W. (1980). Response of ewes to a single injection of an analogue of PGF<sub>2</sub>alpha given at different stages of the oestrous cycle. *J Reprod Fertil* 58, 219-223.
- Adams NR, Abordi JA, Briegel JR, Sanders MR. (1994). Effect of diet on the clearance of estradiol-17 $\beta$  in the ewe. *Biol Reprod* 51, 668-674.
- Al-Gubory KH. (1998). Effects of the presence of rams during pregnancy on lambing performance in ewes. *Anim Reprod Sci* 52, 205-211.
- Al-Mauly NZN, Bryant MJ, Cunningham FJ. (1991). Effect of the introduction of rams on the pulsatile release of luteinizing hormone and the onset of reproductive activity in ewe lambs. *Anim Prod* 53, 209-214.
- Arcand-Hoy LD, Nimrod AC, Benson WH. (1998). Endocrine-modulating substances in the environment: estrogenic effects of pharmaceutical products. *Intl J Toxic* 17, 139-158.
- Arimura, A, Kastin AJ, Gonzalez-Barcena, D, Siller J, Weaver RE, Schally AV. (1974). Disappearance of LH releasing hormone in man determined by radioimmunoassay. *Clin Endocrinol* 3, 421-425.
- Atkinson S, Williamson P. (1985). Ram-induced growth of ovarian follicles and gonadotrophin inhibition in anoestrous ewes. *J Reprod Fertil* 73, 185-189.
- Audicana L, Harvey MJA. (1993). Termination of early pregnancy in sheep with dinoprost or cloprostenol: comparison of two commercial preparations. *Vet Rec* 133, 574-576.
- Baird DT. (1978). Pulsatile secretion of LH and ovarian estradiol during the follicular phase of the sheep estrous cycle. *Biol Reprod* 18, 359-364.
- Bazer FW, Thatcher WW, Hansen PJ, Mirando MA, Ott TL, Plante C. (1991). Physiological mechanisms of pregnancy recognition in ruminants. *J Reprod Fertil Suppl* 43, 39-47.
- Boland MP, Gordon I, Kelleher DL. (1978). The effect of treatment by prostaglandin analogue (ICI-80, 996) or progestagen (SC-9880) on ovulation and fertilization of cyclic ewes. *J Agric Sci* 91, 727-730.



- Brooks PH, Cole DJA. (1970). The effect of the presence of a boar on the attainment of puberty in gilts. *J Reprod Fertil* 23, 435-440.
- Burns PD, Mendes Jr JOB, Yemm RS, Clay CM, Nelson SE, Hayes SH, Silvia WJ., (2001). Cellular mechanisms by which oxytocin mediates ovine endometrial prostaglandin F2 $\alpha$  synthesis: role of G $_i$  proteins and mitogen-activated protein kinases. *Biol Reprod* 65, 1150-1155.
- Cahill LP, Saumande J, Ravault JP, Blanc M, Thimonier J, Mariana JC, Mauléon P. (1981). Hormonal and follicular relationships in ewes of high and low ovulation rates. *J Reprod Fertil* 62, 141-150.
- Caswell J. (2007). "Consumer Demand for Quality: Major Determinant for Agricultural and Food Trade in the Future?" Working Paper 2007-4. Department of Resource Economics, University of Massachusetts Amherst. [http://works.bepress.com/julie\\_caswell/90](http://works.bepress.com/julie_caswell/90). Acceso: 19/08/2013.
- Challis JRG, Harrison FA, Heap RB. (1973). The kinetics of oestradiol 17 $\beta$  metabolism in the sheep. *J Endocrin* 57, 97-110.
- Chanvallon A, Fabre-Nys C. (2009). In sexually naive anestrus ewes, male odour is unable to induce a complete activation of olfactory systems. *Behav Brain Res* 205, 272-279.
- Chanvallon A, Sagot L, Pottier E, Debus N, François D, Fassier T, Scaramuzzi RJ, Fabre-Nys C. (2011). New insights into the influence of breed and time of the year on the response of ewes to the 'ram effect'. *Anim* 5, 1594-1604.
- Chanvallon A, Scaramuzzi RJ, Fabre-Nys C. (2010). Early sexual experience and stressful conditions affect the response of young ewes to the male. *Physiol & Behav* 99 457-465.
- Chemineau P. (1983). Effect on oestrus and ovulation of exposing creole goats to the male at three times of the year. *J Reprod Fertil* 67, 65-72.
- Chesworth JM, Tait A. (1974). A note on the effect of the presence of rams upon the amount of luteinizing hormone in the blood of ewes. *Anim Prod* 19, 107-110.
- Cohen-Tannoudji J. (1984). L'effet male chez les ovins – Conditions de stimulation – Voies sensorielles. Mémoire. Diplôme d'études approfondies de biologie animale. Universidad de Paris VI, Francia.
- Cohen-Tannoudji J, Einhorn J, Signoret JP. (1994). Ram sexual pheromone: first approach of chemical identification. *Physiol & Behav* 56, 955–61.
- Cohen-Tannoujdi J, Lavenet C, Locatelli A, Tillet Y, Signoret JP. (1989). Non-involvement of the accessory olfactory system in the LH response of anoestrous ewes to male odour. *J Reprod Fertil* 86, 135-144.

- Colazo MG, Kastelic JP, Whittaker PR, Gavaga QA, Wilde R, Mapletoft RJ. (2004). Fertility in beef cattle given a new or previously used CIDR insert and estradiol, with or without progesterone. *Anim Reprod Sci* 81, 25-34
- Contreras-Solis I, Vasquez B, Diaz T, Letelier C, López-Sebastian A, González-Bulnes A. (2009a). Efficiency of estrous synchronization in tropical sheep by combining short-interval cloprostenol-based protocols and “male effect” *Theriogenology* 71, 1018–1025.
- Contreras-Solis I, Vasquez B, Diaz T, Letelier C, López-Sebastian A, González-Bulnes A. (2009b). Ovarian and endocrine responses in tropical sheep treated with reduced doses of cloprostenol. *Anim Reprod Sci* 114, 384–392.
- Cushwa WT, Bradford GE, Stabenfeldt GH, Berger YM, Dally MR. (1992). Ram influence on ovarian and sexual activity in anestrous ewes: effects of isolation of ewes from rams before joining and date of ram introduction. *J Anim Sci* 70, 1195-2000.
- Custer EE, Lamsa JC, Eldering JA, McCracken JA. (1995). Identification of functional high and low affinity states of the prostaglandin F<sub>2</sub> alpha receptor in the ovine corpus luteum *in vivo* and their role in hormone pulsatility. *Endocrine* 3, 761-764.
- D’Occhio MJ, Schanbacher BD, Kinder. (1984). Profiles of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, testosterone and prolactin in rams of diverse breeds: effects of contrasting short (8L:16D) and long (16L:8D) photoperiods. *Biol Reprod* 30, 1039-1054.
- Davis AJ, Fleet IR, Harrison FA, Maule Walker FM. (1980). Pulmonary metabolism of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  in the conscious non-pregnant ewe and sow. *J Physiol* 301, 86.
- Dimov V, Green K. (1990). Metabolism of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  in sheep. *Drug Metab Disp* 18, 107-114.
- Delgadillo JA, Gelez H, Ungerfeld R, Hawken PAR, Martin GB. (2009). The ‘male effect’ in sheep and goats— Revisiting the dogmas. *Behav Brain Res* 200, 304–314.
- Dixon AB, Knights M, Pate JL, Lewis PE, Inskeep EK. (2006). Reproductive Performance of Ewes after 5-Day Treatment with Intravaginal Inserts Containing Progesterone in Combination with Injection of Prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$ . *Reprod Dom Anim* 41, 142–148.
- Duggavathi R, Bartlewski PM, Barrett DMW, Rawlings NC. (2005). The temporal relationship between patterns of LH and FSH secretion, and development of ovulatory-sized follicles during the mid- to late-luteal phase of sheep. *Theriogenology* 64, 393–407.
- Dýrmundsson ÓR, Lees JL. (1972). Effect of rams on the onset of breeding activity in Clun Forest ewe lambs. *J Agric Sci* 79, 269-271.

- Dutra Da Silvera R, Soler Sienna D. (2013). Respuesta estral y reproductiva en ovejas sincronizadas con dos dosis de un análogo sintético de prostaglandina F2 $\alpha$  administrada a diferentes intervalos de tiempo. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay.
- El-Sherry TM, Senosy W, Mahmoud GB, Wasfy SI (2013). Effect of dinoprost and cloprostenol on serum nitric oxide and corpus luteum blood flow during luteolysis in ewes. *Theriogenology* 80, 513-518.
- Eldon J. (1993). Effect of exogenous melatonin and exposure to a ram on the time of onset and duration of the breeding season in Icelandic sheep. *J Reprod Fertil* 99, 1-6.
- Espey LL, Richards JS. (2006). Ovulation. En Knobil and Neills *Physiology of Reproduction*. Third Edition. Neill, JD (Editor). Academic Press-Elsevier, 425-474.
- Evans ACO, Duffy P, Crosby TF, Hawken PAR, Boland MP, Beard AP. (2004). Effect of ram exposure at the end of progestagen treatment on estrus synchronization and fertility during the breeding season in ewes. *Anim Reprod Sci* 84, 349-358.
- Evans G, Maxwell WMC. (1990). Inseminación artificial de ovejas y cabras. Editorial Acribia, Zaragoza, España.
- Fairnie IJ, Gumming IA, Martin ER. (1976). Use of the prostaglandin analogue, ICI 80996, to synchronize ovulation in sheep in an artificial insemination programme. *Proc Australian Soc Anim Prod*, 11:133-136.
- Fernández-Abella D. (1993). Principios de fisiología reproductiva ovina. Editorial Hemisferio Sur.
- Fernández-Abella D, Becu-Villalobos, Lacau-Mengido IM, Villegas N, Bentancur O. (1999). Sperm production, testicular size, serum gonadotropins and testosterone levels in Merino and Corriedale breeds. *Reprod Nutr Dev* 39, 617-624.
- Fierro S, Gil J, Viñoles, Olivera-Muzante J. (2013). The use of prostaglandins in controlling estrous cycle of the ewe: A review. *Theriogenology* 79, 399-408.
- Fierro S, Olivera-Muzante J, Gil J, Viñoles C. (2011). Effects of prostaglandin administration on ovarian follicular dynamics, conception, prolificacy, and fecundity in sheep. *Theriogenology* 76, 630-639.
- Flint APF, Leat WMF, Sheldrick EL, Stewart HJ. (1986). Stimulation of phosphoinositide hydrolysis by oxytocin and the mechanism by which oxytocin controls prostaglandin synthesis in the ovine endometrium. *Biochem J* 237, 797-805.
- Flint APF, Sheldrick EL. (1982). Ovarian secretion of oxytocin is stimulated by prostaglandin. *Nature* 297, 587-588.

- Forcada F, Abecia JA, Sierra I. (1992). Seasonal changes in oestrus activity and ovulation rate in Rasa Aragonesa ewes maintained at two different body condition levels. *Small Rum Res* 8, 313-324.
- Ford SP, Weems CW, Pitts RE, Pexton JE, Butcher RL, Inskoop EK. (1975). Effects of estradiol-17 $\beta$  and progesterone on prostaglandins F in sheep uteri and uterine venous plasma. *J Anim Sci* 41, 1407-1413.
- Fulkerson WJ, Adams NR, Gherardi PB. (1981). Ability of castrate male sheep treated with oestrogen or testosterone to induce and detect oestrus in ewes. *Appl Anim Ethol* 7, 57-66.
- Gatti M, Ungerfeld R. (2012). Intravaginal sponges to synchronize estrus decrease sexual attractiveness in ewes. *Theriogenology*, 78, 1796-1799.
- Gelez, H, Fabre-Nys C. (2004). The “male effect” in sheep and goats: a review of the respective roles of the two olfactory systems. *Horm Behav* 46, 257- 271.
- Gelez H, Archer E, Chesnau D, Campan R, Fabre-Nys C. (2004a). Importance of learning in the response of ewes to male odor. *Chem. Senses* 29, 555-563.
- Gelez H, Archer E, Chesnau D, Magallon T, Fabre-Nys C. (2004b). Inactivation of the olfactory amygdale prevents the endocrine response to male odour in anoestrus ewes. *European J Neurosci*, 19, 1581-1590.
- González-Bulnes A, Veiga-Lopez A, Garcia P, Garcia-Garcia RM, Ariznavarreta C, Sanchez MA, Tresguerres JAF, Cocero MJ, Flores JM. (2005). Effects of progestagens and prostaglandin analogues on ovarian function and embryo viability in sheep. *Theriogenology* 63, 2523-2534.
- Gordon I. (1999). Reproducción controlada del ganado vacuno y búfalos. Editorial Acribia, Zaragoza, España.
- Goodman RL, Inskoop EK. (2006). Neuroendocrine control of the ovarian cycle of sheep. En *Knobil and Neills Physiology of Reproduction*. Third Edition. Neill, JD (Editor). Academic Press-Elsevier, 2389-2447.
- Greyling JPC, Van Der West Huysen JM. (1979). The synchronization of oestrus in sheep. 2. Dose effect of prostaglandin in the double injection regime. *S Afr J Anim Sci* 9, 193-195.
- Hackett AJ, Robertson HA. (1980). Effect of dose and time of injection of prostaglandin F $2\alpha$  in cycling ewes. *Theriogenology* 13 (5), 347-351.
- Hafez ESE, Hafez B. (2002). Ciclos reproductivos. En: Hafez, E.S.E, Hafez, B. (editores): *Reproducción e inseminación artificial en animales*. Séptima edición. McGraw-Hill. P: 33-55.

- Hafez ESE, Jainudeen MR, Rosnina Y. (2002). Hormonas, factores Ciclos reproductivos. En: Hafez, E.S.E, Hafez, B. (editores): Reproducción e inseminación artificial en animales. Séptima edición. McGraw-Hill. P: 56-69.
- Hawken PAR, Beard AP. (2009). Ram novelty and the duration of ram exposure affects the distribution of mating in ewes exposed to rams during the transition into the breeding season. *Anim Reprod Sci* 111, 249-260.
- Hawken PAR, Beard AP, Esmaili T, Kadokawa H, Evans ACO, Blache D, Martin GB. (2007a). The introduction of rams induces an increase in pulsatile LH secretion in cyclic ewes during the breeding season. *Theriogenology* 68, 56-66.
- Hawken PAR, Beard AP, O'Meara CM, Duffy P, Quinn KM, Crosby TF, Boland MP, Evans ACO. (2005). The effects of ram exposure during progestagen oestrus synchronisation and time of ram introduction post progestagen withdrawal on fertility in ewes. *Theriogenology* 63, 860-871.
- Hawken PAR, Esmaili T, Jorre de St Jorre T, Martin GB. (2009). Do cyclic female goats respond to males with an increase in LH secretion during the breeding season? *Anim Reprod Sci* 112, 384-389.
- Hawken PAR, Evans ACO, Beard AP. (2007b). Prior exposure of maiden ewes to rams enhances their behavioural interactions with rams but is not a pre-requisite to their endocrine response to the ram effect. *Anim Reprod Sci* 108, 13-21.
- Hixon JE, Flint APF. (1987). Effects of a luteolytic dose of oestradiol benzoate on uterine oxytocin receptor concentrations, phosphoinositide turnover and prostaglandin F-2 $\alpha$  secretion in sheep. *J Reprod Fertil* 79, 457-467.
- Hunter GL, Bolenje PC, Van Niekerk CH. (1971). Synchronized mating and lambing in spring-bred Merino sheep: the use of progestagen-impregnated intra-vaginal sponges and teaser rams. *Agroanimalia* 3, 133-40.
- Ichimaru T, Mogi K, Ohkura S, Mori Y, Okamura H. (2008). Exposure to ram wool stimulates gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity in the female goat. *Anim Reprod Sci* 106, 361-368.
- Jainudeen MR, Wahid H, Hafez ESE. (2002). Ovejas y cabras. En: Hafez ESE, Hafez B. (editores): Reproducción e inseminación artificial en animales. Séptima edición. McGraw-Hill. P: 177-187.
- Juengel JL, Haworth JD, Rollyson MK, Silva PJ, Sawyer HR, Niswender GD. (2000). Effect of dose of prostaglandin F2 $\alpha$  on steroidogenic components and oligonucleosomes in ovine luteal tissue. *Biol Reprod* 62, 1047-1051
- Jorre de St Jorre T, Hawken PAR, Martin GB. (2012). Role of male novelty and familiarity in male-induced LH secretion in female sheep. *Reprod Fertil Dev* 24, 523-530.

- Knight TW, Lynch PR. (1980). Source of ram pheromones that stimulate ovulation in the ewe. *Anim Reprod Sci* 3, 133–6.
- Knight, TW, Tervit HR, Lynch PR. (1983). Effects of boar pheromones, ram's wool and presence of bucks on ovarian activity in anovular ewes early in the breeding season. *Anim Reprod Sci*, 6 129–134.
- Lamsa JC, Cushman RA, Nay MG, McCracken JA. (1992). In vivo desensitization of a high affinity PGF<sub>2</sub> alpha receptor in the ovine corpus luteum. *Prostaglandins* 43, 165-179.
- Lassoued N, Naouali M, Khaldi G, Rekik M. (2004). Influence of the permanent presence of rams on the resumption of sexual activity in postpartum Barbarine ewes. *Small Rum Res* 54, 25-31.
- Light JE, Silvia WJ, Reid 2nd RC. (1994). Luteolytic effect of prostaglandin F<sub>2</sub> alpha and two metabolites in ewes. *J Anim Sci*, 72, 2718-2721.
- Liu X, Dai Q, Hart E, Duggavathi R, Barret DMW, Rawlings NC, Bartlewski PM. (2006). Ovarian and endocrine responses to prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  (PGF<sub>2</sub> $\alpha$ ) given at the expected time of the endogenous FSH peak at mid-cycle in ewes. *Theriogenology* 66, 811-821.
- Liu X, Dai Q, Hart E, Barrett D, Rawlings N, Pierson R, Bartlewski P. (2007). Ultrasonographic Characteristics of ovulatory follicles and associated endocrine Changes in Cyclic Ewes Treated with Medroxyprogesterone Acetate (MAP)-releasing intravaginal sponges and equine chorionic gonadotropin (eCG). *Reprod Dom Anim* 42, 393-401.
- López-Sebastian A, Inskoop EK. (1988). Effects of progesterone pretreatment and duration of ram exposure on synchronization of estrus, conception and pregnancy by prostaglandin during seasonal anestrus. *Anim Reprod Sci* 17, 185-195.
- López-Sebastian A, González-Bulnes A, Carrizosa A, Urrutia B, Díaz-Delfa C, Santiago-Moreno J, Gómez-Brunet A,. (2007). New estrus synchronization and artificial insemination protocol for goats based on male exposure, progesterone and cloprostenol during the non-breeding season. *Theriogenology* 68, 1081-1087.
- Lucidi P, Barboni B, Mattioli M. (2001). Ram-induced ovulation to improve artificial insemination efficiency with frozen semen in sheep. *Theriogenology* 55, 1797-1805.
- Mallampati RS, Pope AL, Casida LE. (1971). Breeding pattern in Targhee ewes and ewe lambs throughout the year. *J Anim Sci* 33, 1278-1281.
- Malpoux, B. (2006). En Knobil and Neills *Physiology of Reproduction*. Third Edition. Neill, JD (Editor). Academic Press-Elsevier, 2231-2281.

- Martin G B, JC Greeff. (2011). Genetic frontiers in the development of “Clean, green and ethical” management systems for the extensive sheep industry. *Proc Assoc Adv Anim Breed Genet* 19, 143-150.
- Martin GB, Milton JT, Davidson RH, Banchemo Hunzicker GE, Lindsay DR, Blache D. (2004). Natural methods for increasing reproductive efficiency in small ruminants. *Anim Reprod Sci* 82-83, 231-45.
- Martin GB, Oldham CM, Cognié Y, Pearce DT. (1986). The physiological responses of anovulatory ewes to the introduction of rams—a review. *Liv Prod Sci* 15, 219-247.
- Martin GB, Oldham CM, Lindsay DR. (1980). Increased plasma LH levels in seasonally anovular Merino ewes following the introduction of rams. *Anim Reprod Sci* 3: 125-132.
- McCracken JA, Carlson JC, Glew ME, Goding JR, Baird DT, Green K, Samuelsson B. (1972). Prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  identified as a luteolytic hormone in sheep. *Nat New Biol* 238, 129-134.
- McCracken JA, Custer EE, Lamsa JC. (1999). Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol Rev* 79, 263-325.
- McCracken JA, Schramm W, Okulicz WC. (1984). Hormone receptor control of pulsatile secretion of PGF<sub>2</sub> $\alpha$  from the ovine uterus during luteolysis and its abrogation in early pregnancy. *Anim Reprod Sci* 7, 31-55.
- Mcmillan KL, Peterson KJ. (1993). A new intravaginal progesterone releasing device for cattle (CIDR-B) for oestrous synchronisation, increasing pregnancy rates and the treatment of post-partum anoestrus. *Anim Reprod* 33, 1-25.
- Mellado M, Hernández JR. (1996). Ability of androgenized goat wethers and does to induce estrus in goats under extensive conditions during anestrus and breeding seasons. *Small Rum Res* 23, 37-42.
- Menchaca A, Rubianes E. (2004). New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reprod Fertil Dev* 16, 403-413.
- Meyer HH. (1979). Ewe and teaser breed effects on reproductive behavior and performance. *Proc New Zealand Soc Anim Prod* 39, 68-76.
- M.G.A.P. 1962. Decreto 5/4/962: Se reglamenta la prohibición de preparados a utilizar en la neutralización sexual y engorde de los animales. [http://www.mgap.gub.uy/DGSG/DILAVE/ProductosVeterinarios/Dec514\\_05\\_04\\_96%20PROHIBICION.pdf](http://www.mgap.gub.uy/DGSG/DILAVE/ProductosVeterinarios/Dec514_05_04_96%20PROHIBICION.pdf). Acceso: 19/08/2013.
- Milgrom E, Thi L, Atger M, Baulieu E. (1973). Mechanisms regulating the concentration and the conformation of progesterone receptor(s) in the uterus. *J Biol Chem* 248, 6366-6374.

- Moore LG, Choy VJ, Elliot RL, Watkins WB. (1986). Evidence for the pulsatile release of PGF-2 $\alpha$  inducing the release of ovarian oxytocin during luteolysis in the ewe. *J Reprod Fertil* 76, 159-166.
- Murtagh JJ, Gray SJ, Lindsay DR, Oldham CM. (1984). The influence of the ram effect in 10–11 month old Merino ewes on subsequent performance when introduced to rams again at 15 months. *Proc Australian Soc Anim Prod* 15, 490-493.
- Ngere LO, Dzakuma JM. (1975). The effect of sudden introduction of rams on oestrous pattern of tropical ewes. *J Agric Sci* 84, 263-264.
- Noakes DE, Parkinson TJ, England GCW. (2001). *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*. Eight edition 2001. Saunders. Elsevier Limited.
- Noel B, Bister JL, Paquay R. (1993). Ovarian follicular dynamics in Suffolk ewes at different periods of the year. *J Reprod Fertil* 99, 675-700.
- Nugent III RA, Notter DR, Beal WE. (1998a). Effects of ewe breed and ram exposure on estrous behavior in May and June. *J Anim Sci* 66, 1363-1370.
- Nugent III RA, Notter DR, McClure WH. (1998b). Effects of ram preexposure and ram breed on fertility of ewes in summer breeding. *J Anim Sci* 66, 1622-1626.
- O'Callaghan D, Donovan A, Sunderland SJ, Boland MP, Roche JF. (1994). Effect of the presence of male and female flockmates on reproductive activity in ewes. *J Reprod Fertil* 100, 497-503.
- Oldham CM, Gray SJ. (1984). The "ram effect" will advance puberty in 9 to 10 month old merino ewes independent of their season of birth. *Proc Australian Soc Anim Prod* 15, 727.
- Over R, Cohen-Tannoudji J, Dehnhard M, Claus R, Signoret JP. (1990). Effect of pheromones from male goats on LH secretion in anoestrous ewes. *Physiol & Behav* 48, 665-668.
- Panter GH, Thompson RS, Sumpeter JH. (2000). Intermittent Exposure of Fish to Estradiol. *Environm Sci Techn* 34, 2756-2760.
- Pearce DT, Oldham CM. (1988). Importance of non-olfactory stimuli in mediating ram induced ovulation in the ewe. *J Reprod Fertil* 84, 333-339.
- Peel RK, Eckerle GJ, Anthony RV. (2012). Effects of overfeeding naturally-mated adolescent ewes on maternal, fetal, and postnatal lamb growth. *J Anim Sci* 90, 3698-3708.
- Perkins A, Fitzgerald JA. (1994). The behavioral component of the ram effect: the influence of ram sexual behavior on the induction of estrus in anovulatory ewes. *J Anim Sci* 72, 51-55.



- Perdigón F, Sosa L, Cavestany D. (1997). Duración de la estación de cría en ovejas corriedale en Uruguay. *Rev Arg Prod Anim* 17, 257.
- Rawlings NC, Jeffcoate IA, Savage NC, Steuart DMK, Stewart LHM. (1983). The effect of season and technique on synchronized and induced estrus and the induction of lambing in the ewe in a commercial setting. *Theriogenology* 19, 665-675.
- Redding TW, Schally AV. (1973). The distribution, half-life, and excretion of tritiated luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) in rats. *Life Sci* 12, 23-32.
- Roberts AJ, Dunn TG, Murdoch WJ. (1985). Induction of ovulation in proestrous ewes: Identification of the ovulatory follicle and functional status of the corpus luteum. *Dom Anim Endocrin* 2, 207-210.
- Rodríguez-Sabarrós, M (2013). Razas ovinas en Uruguay. [http://www.fagro.edu.uy/~ira/ur/materiales/grupo2/2013/razas\\_ovinas\\_en\\_ROU.pdf](http://www.fagro.edu.uy/~ira/ur/materiales/grupo2/2013/razas_ovinas_en_ROU.pdf) Acceso el 22 de octubre de 2013.
- Rosa, HJD, Silva CC, Bryant MJ. (2003). The effect of paddock size on the response of seasonal anestrus ewes to the ram effect. *Small Rum Res* 48, 233-237.
- Rubianes E, Ibarra D, Ungerfeld R, Carbajal B, de Castro T. (1995). Superovulatory response in anestrus ewes is affected by the presence of a large follicle. *Theriogenology* 43, 465-472.
- Rubianes E, Menchaca A, Carbajal B. (2003). Response of the 1-5 day-aged ovine corpus luteum to prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$ . *Anim Reprod Sci* 78, 47-55.
- Scaramuzzi RJ, Radford HM. (1983). Factors regulating ovulation rate in the ewe. *J Reprod Fertil* 69, 353-367.
- Scaramuzzi RJ, Campbell BK, Souza CJH, Baird DT. (2010). Glucose uptake and lactate production by the autotransplanted ovary of the ewe during the luteal and follicular phases of the oestrous cycle. *Theriogenology*, 73, 1061-1067.
- Scaramuzzi RJ, Martin GB, Fisher JS, Adams NR, Lindsay DR, Wilkins JF, Oldham CM, Downing JA, Masters DG, Young JM. (1992). Reproductive management of ewes for extensive wool production. *Proc Australian Soc Anim Prod* 19, 213-215.
- Schinkel PG. (1954). The effect of the presence of the ram on the ovarian activity of the ewe. *Australian J Agric Res* 5, 465-469.
- Signoret JP, Fulkerson WJ, Lindsay DR. (1982). Effectiveness of testosterone treated wethers and ewes as teasers. *Appl Anim Ethol* 9, 37-45.
- Silva PJ, Juengel JL, Rollyson MK, Niswender GD. (2000). Prostaglandin metabolism in the ovine corpus luteum: catabolism of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  (PGF<sub>2</sub> $\alpha$ ) coincides with resistance of the corpus luteum to PGF<sub>2</sub> $\alpha$ . *Biol Reprod* 63, 1229-1236

- Silvia WJ, Lewis GS, McCracken JA, Thatcher WW, Wilson Jr L. (1991). Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  during luteolysis in ruminants. *Biol Reprod* 45, 655-663.
- Smith ID. (1982). The synchronization and conception in merino ewes by single or sequential administration of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$ . *Proc Australian Soc Anim Prod* 14, 531-534.
- Spencer TE, Becker WC, George P, Mirando MA, Ogle TF, Bazer FW. (1995). Ovine interferon-tau inhibits estrogen receptor up-regulation and estrogen-induced luteolysis in cyclic ewes. *Endocrinology* 136, 4932-4944.
- Stouffer RL. (2006). Structure, function, and regulation of the corpus luteum. In Knobil and Neills *Physiology of Reproduction*. Third Edition. Neill, JD (Editor). Academic Press-Elsevier, 475-526.
- Stupnicki R, Cracken JA, Williams KIH. (1969). Progesterone metabolism in the ewe. *J Endocrin* 45 : 67-74.
- Sweeney T, O'Callaghan D. (1996). Breeding season and ovulation rate in ewes treated with long days in spring followed by a melatonin implant and exposure to a ram. *Anim Sci* 62, 507-512.
- Talafha AQ, Lafi SQ, Ababneh MM. (2009). The effect of estrus synchronization treatments on somatic cell count on transitional-anestrus Awassi ewes' milk. *Trop Anim Health Prod* 41, 161-170.
- Tervit HR, Havik PG, Smith JF. (1977). Effect of breed of ram on the onset of the breeding season in Romney ewes. *Proc New Zealand Soc Anim Prod* 37, 142-148.
- Tervit HR, Peterson AJ. (1978). Testosterone levels in Dorset and Romney rams and the effectiveness of these breeds in stimulating early onset of estrus in Romney ewes. *Theriogenology* 9, 271-277.
- Thomas GB, Martin GB, Ford JR, Moore PM, Campbell BK, Lindsay DR. (1988). Thomas 1988 - Secretion of LH, FSH and Oestradiol-17 $\beta$  during the follicular phase of the oestrous cycle in the ewe. *Aust J Biol Sci* 41, 303-308.
- Thompson LH, Stookey JM, Giles JR, Thomas DL. (1990). Reproductive response of mature ewes of different breeds to teasing prior to mating. *Small Rum Res* 3, 373-381.
- Thundathil J, Kastelic JP, Mapletoft RJ. (1999). The effect of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular development and ovulation in dairy cattle. *Can J Vet Res* 61, 314-316.

- Titi HH, Kridli RT, Alnimer MA. (2010). Estrus synchronization in sheep and goats using combinations of GnRH, progestagen and prostaglandin F2 $\alpha$ . *Reprod Dom Anim* 45, 594-599.
- Turner HN. (1978). Selection for reproduction rate in Australian Merino sheep: direct responses. *Australian J Agric Res* 29, 327-350.
- Underwood EJ, Shier FL, Davenport NJ. (1944). Studies in sheep husbandry in Western Australia. V. The breeding season of Merino, crossbred and British breed ewes in agricultural districts. *J Dep Agric, WA*, 21, 135-43.
- Ungerfeld R. (2005). Sixty years of the ram effect (1944-2004): how we have learned what we know about it. *J Anim Vet Adv* 4, 716-718.
- Ungerfeld R. (2011). Combination of the ram effect with PGF2 $\alpha$  estrous synchronization treatments in ewes during the breeding season. *Anim Reprod Sci* 124, 65-68.
- Ungerfeld R. (2012). Seasonal reproductive patterns and effectiveness as teasers (ram effect) of Corriedale and Milchschaf rams. *Anim Prod Sci* 52, 1036-1041.
- Ungerfeld R, Forsberg M, Rubianes E. (2004). Overview of the response of anoestrous ewes to the ram effect. *Reprod Fertil Dev* 16, 479-490.
- Ungerfeld R, Pinczak A, Forsberg M, Rubianes E. (2002). Ovarian responses of Corriedale ewes to "ram effect" in the non-breeding season. *Can J Anim Sci* 82, 599-602.
- Ungerfeld R, Ramos MA, González-Pensado SP. (2008). Ram effect: adult rams induce a greater reproductive response in anestrous ewes than yearling rams. *Anim Reprod Sci* 103, 271-277.
- Ungerfeld R, Rubianes E. (1999). Estrus response to the ram effect in Corriedale ewes primed with medroxyprogesterone during the breeding season. *Small Rum Res* 32, 89-91.
- Ungerfeld R, Silva L. (2005). The presence of normal vaginal flora is necessary for normal sexual attractiveness of estrous ewes. *Appl Anim Behav Sci*, 93, 245-250.
- Ungerfeld R, Suárez G, Carbajal B, Silva L, Laca M, Forsberg M, Rubianes E. (2003). Medroxiprogesterone priming and response to the ram effect in corriedale ewes during the nonbreeding season. *Theriogenology* 60, 35-45.
- Unión Europea, 2012. Reglamento (UE) N° 464/2012 del Parlamento Europeo y del Consejo.
- Unión Europea, 2003. Directiva 2003/74/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2003.

- Unión Europea, 1996. Directiva 96/22/CE del Consejo, de 29 de abril de 1996.
- Vallet JL, Lamming GE, Batten M. (1990). Control of endometrial oxytocin receptor and uterine response to oxytocin by progesterone and oestradiol in the ewe. *J Reprod Fertil* 90, 625-634.
- Veliz FG, Poindron P, Malpoux B, Delgadillo JA. (2006). Maintaining contact with bucks does not induce refractoriness to the male effect in seasonally anestrus female goats. *Anim Reprod Sci* 92, 300-309.
- Vilariño M, Rubianes E, Menchaca A. (2011). Re-use of intravaginal progesterone devices associated with the Short-term Protocol for timed artificial insemination in goats. *Theriogenology* 75, 1195-1200.
- Walkden-Brown SW, Martin GB, Restall BJ. (1999). Role of male-female interaction in regulating reproduction in sheep and goats. *J Reprod Fertil Suppl* 52, 243-257.
- Wildeus S. (1999). Current concepts in synchronization of estrus: sheep and goats. *J Anim Sci* 77, 1-14.
- Wright PJ, Geytenbeek PE, Clarke IJ, Hoskinson RM. (1989). The efficacy of ram introduction, GnRH administration, and immunisation against androstenedione and oestrone for the induction of oestrus and ovulation in anoestrous post-partum ewes. *Anim Reprod Sci* 21, 237-247.
- Zonturlu AK, Aral F, Yavuzer U. (2009). Effect of different method GnTH-PGF2 $\alpha$  treatment of induced of estrus and pregnancy in breeding season in awasi ewes. *J Anim Vet Adv* 8, 660-663.

## **Anexo I**

## Accepted Manuscript

Title: Does introduction of rams during the late luteal phase promote the estrus response in cyclic ewes?

Author: J. Meilán R. Ungerfeld

PII: S0921-4488(14)00094-7  
DOI: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.smallrumres.2014.03.011>  
Reference: RUMIN 4707

To appear in: *Small Ruminant Research*

Received date: 18-11-2013  
Revised date: 25-2-2014  
Accepted date: 27-3-2014



Please cite this article as: Meilán, J., Ungerfeld, R., Does introduction of rams during the late luteal phase promote the estrus response in cyclic ewes?, *Small Ruminant Research* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2014.03.011>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

1

2 **Does introduction of rams during the late luteal phase promote the estrus**  
3 **response in cyclic ewes?**

4 J. Meilán, R. Ungerfeld\*

5

6 Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República,  
7 Lasplaces 1620, Montevideo 11600, Uruguay

8

9 \* Corresponding author: phone: +598-26286955, e-mail: rungerfeld@gmail.com

1

Page 1 of 23

10

11 **Abstract**

12 The administration of two doses of PGF $2\alpha$  is widely used for estrous  
13 synchronization in cyclic ewes. The introduction of rams to previously isolated ewes (ram  
14 effect) induces an increase in LH pulsatility which stimulates estradiol secretion.  
15 Consequently, the introduction of the rams may trigger the luteolytic process through the  
16 increase of estradiol. Therefore, the aim of our first experiment was to determine if the  
17 second dose of a two PGF $2\alpha$  treatment can be substituted by half PGF $2\alpha$  dose plus the ram  
18 effect. Ewes were randomly assigned to 3 experimental groups. Ewes from 2 of those  
19 groups (E1-PGFD: n=91, and PGHD: n=110) remained in permanent contact with 16  
20 vasectomized males since Day -40 (Day 0 = introduction of the rams). Both groups  
21 received a dose of PGF $2\alpha$  on Day -13. On Day 0, E1-PGFD ewes received a second dose of  
22 PGF $2\alpha$ , and PGHD ewes received a half-dose. Ewes from the third group (HD+RE; n = 95)  
23 remained isolated from males until Day 0, and received a dose of PGF $2\alpha$  on Day -13, and a  
24 half-dose on Day 0. On Day 0, the three groups were joined. The introduction of the rams  
25 increased the number of ewes that came into estrus early after the second dose, but this  
26 difference was not maintained the following days. Thus, we designed another experiment to  
27 determine if the day of the late luteal phase in which ewes are stimulated by the rams (12 to  
28 15 days after a dose of PGF $2\alpha$  dose) influences the response. The ewes were randomly  
29 assigned to five groups, from which only the control group (n = 44) remained in contact  
30 with males; the other 174 ewes remained isolated from males since Day -30. Estrous cycles  
31 were presynchronized with 2 PGF $2\alpha$  doses separated 7 days, and received a third dose 13  
32 days later (Day 0) (control group), or a half-dose plus the introduction of rams 12, 13, 14 or

2

Page 2 of 23



33 15 days later (Day0). However, we did not observe any differences in the estrus response  
34 according to the estrous cycle day. In conclusion, the ram effect was effective substituting  
35 half PGF2 $\alpha$  in part of the flock, but the response was unrelated to the day of the late luteal  
36 phase in which the ewes are stimulated.

37

38 Keywords: estrous synchronization, luteal phase, PGF2alpha, sheep, socio-sexual signals

39

**40 Conflict of interest statement**

41 The first author works for Zoetis. This factor did not exert any kind of influence, neither  
42 positive nor negative, regarding the aims, the outcomes or any part of the study.

43

44

**45 1. Introduction**

46 The administration of the PGF2 $\alpha$  to cyclic ewes induces luteolysis in those animals  
47 that are in their luteal phase. The administration of a second dose ensures that most ewes  
48 come in estrus in a very short time period. The good synchronization of estrus obtained,  
49 and a relatively low cost makes the administration of two doses of PGF2 $\alpha$  7 to 11 days  
50 apart one of the most widely used technique for estrous synchronization in cyclic ewes (see  
51 review: Fierro et al., 2013). However, actual market tendencies push to minimize the use of  
52 hormones and other chemicals in animal production (Martin et al., 2004). Therefore, it is  
53 important to substitute hormonal treatments by other alternatives, like socio-sexual  
54 stimulation. In sheep, the introduction of males to a flock of previously isolated anestrus  
55 females (the ram effect) induces ovulation, estrus, and might end in out-of-season  
56 pregnancies (for reviews, see: Ungerfeld et al., 2004; Delgadillo et al., 2009). The  
57 introduction of rams induce an increase in LH pulsatility in both, anestrus (Martin et al,  
58 1986) and cyclic (Hawken et al., 2007) ewes. This increase is even observed in ewes treated  
59 with progestagens (Evans et al., 2004), and in pregnant ewes (Al-Gubory, 1998). However,  
60 although the use of the ram effect has been widely studied in seasonal anestrus ewes, its  
61 possible applications in cyclic ewes have been scarcely studied.

4

Page 4 of 23

62 It has been demonstrated that luteolysis is triggered by an increase in estradiol  
63 concentrations during the second half of the luteal phase (Hawk and Bolt, 1970) by the  
64 following pathway: 1) the increase in estradiol concentrations induce the synthesis of  
65 uterine oxytocin receptors, so the uterus becomes responsive to oxytocin stimulation  
66 (Hixon and Flint, 1987); 2) the uterus responds to oxytocin secreting PGF $2\alpha$  (Flint et al,  
67 1986); 3) this triggers a positive feedback between luteal secretion of oxytocin and uterine  
68 secretion of PGF $2\alpha$ , which ends with peaks of PGF $2\alpha$  concentrations (Bazer et al, 1991;  
69 Flint and Sheldrick, 1982), responsible for the regression of the corpus luteum (McCracken  
70 et al, 1972). Therefore, if we consider that the increase in LH pulsatility stimulates estradiol  
71 secretion by the larger follicles present in the ovaries (Baird, 1978; Spencer et al, 1995), the  
72 introduction of males may elicit the luteolytic process. Supporting this hypothesis,  
73 Chemineau (1983) observed a bimodal estrual response after the introduction of bucks to  
74 cyclic goats, suggesting that luteolysis was provoked in part of the flock. Also in goats,  
75 Mellado and Hernández (1996) observed an important concentration of estrus in cyclic  
76 goats stimulated by males, which may be consequence of by the advancement of the  
77 luteolysis in some does.

78 Considering all this information, it may be expected that the introduction of rams in  
79 a flock of previously isolated ewes during the late luteal phase will trigger the luteolytic  
80 process, and thus, it might be included in estrous synchronization protocols. However, it  
81 has been observed that the introduction of rams 13 days after a single PGF $2\alpha$   
82 administration could not substitute the administration of a second PGF $2\alpha$  dose (Ungefeld,  
83 2011). This author considered that the strength of the ram effect may have been not enough  
84 to completely substitute the administration of the second PGF $2\alpha$ . Thus, it was proposed that  
85 the ram effect may be combined with low doses of PGF $2\alpha$  to induce luteolysis during the

86 late luteal phase (Ungerfeld, 2011). Although this implies only a slight decrease in total  
87 hormonal use, possible positive results would provide a basis to continue in the  
88 development of treatments with less hormonal content. Therefore, our hypothesis was that  
89 the ram effect may substitute the administration of a second half-PGF2 $\alpha$  dose during the  
90 late luteal phase in a treatment of two doses administrated 13 days apart. Although the  
91 treatments in which both PGF2 $\alpha$  doses are shortly separated (7-8 days) provide the best  
92 results in estrus synchronization and pregnancy rates (Olivera-Muzante et al. 2011;  
93 Menchaca and Rubianes, 2004) in this study both PGF2 $\alpha$  were separated 13 days to ensure  
94 that the ewes were in their late luteal phases, and then that the response to the ram effect  
95 may end in luteolysis. Then, the aim of the experiment was to determine if the second dose  
96 of a two PGF2 $\alpha$  treatment can be substituted by half-dose plus the ram effect. As with this  
97 alternative we observed advancement of estrus but only in a small part of the flock, we  
98 designed a second experiment to determine if the day of the late luteal phase in which ewes  
99 are stimulated influences the response to the treatment.

100

101 **2. Materials and methods**102 *2.1. Experiment 1*

## 103 2.1.1. Animals and management

104 The experiment was performed on a farm located near Artigas, Uruguay (30° S),  
105 with 296 nulliparous Merino X Corriedale (1-2 years;  $33.5 \pm 2.0$  kg) ewes during the mid-  
106 breeding season (March, late summer-early autumn). All ewes grazed on native pastures.

107

## 108 2.1.2. Experimental treatments

109 Ewes were randomly assigned to 3 experimental groups. Ewes from 2 of those  
110 groups (E1-PGFD: n=91, and PGHD: n=110) remained in permanent contact with 16  
111 vasectomized males since Day -40 (Day 0 = introduction of the intact rams). Both groups  
112 received a full dose of a PGF $2\alpha$  analogue (10 mg, Dinoprost tromethamine, Lutalyse®,  
113 Pfizer, Kalamazoo, MI, USA) on Day -13. On Day 0, E1-PGFD ewes received a second  
114 full dose of PGF $2\alpha$ , and PGHD ewes received a half-dose (5 mg). Ewes from the third  
115 group (HD+RE; n = 95) remained isolated from males until Day 0 (sight, sound, smell,  
116 minimum distance: 1000m), and received 10 mg of PGF $2\alpha$  on Day -13, and a half-dose (5  
117 mg) on Day 0. On Day 0, the three groups were joined and 8 marking vasectomized rams  
118 were added to maintain the male:female ratio (one male for every 12 females; 8%). Sexual  
119 receptivity was estimated from marks on the rumps twice daily until Day 5.5.

120

121 *2.2. Experiment 2*

## 122 2.2.1. Animals and management

7

Page 7 of 23

123 The experiment was performed on a farm located in Trinidad, Uruguay (33°S) with  
124 218 multiparous Corriedale ewes (3-5 years) during the breeding season (February-March).  
125 All ewes grazed on native pastures.

126

### 127 2.2.2. Experimental treatments

128 The ewes were randomly assigned to five experimental groups, from which only the  
129 control group (E2-PGFD; n = 44) remained in contact with 16 androgen-treated wethers  
130 since Day -40 (Day 0 = introduction of the rams). Wethers were weekly treated with  
131 testosterone cyclopentil propionate (30 mg/kg; Testosterona Ultra Lenta Fuerte, Disper,  
132 Montevideo, Uruguay). The other 174 ewes remained isolated from males since Day -30.  
133 Estrous cycles of the five groups were presynchronized with 2 PGF2 $\alpha$  doses (Dinoprost  
134 tromethamine, Lutalyse, Pfizer, Kalamazoo, MI, USA) separated 7 days, and received a  
135 third full dose 13 days later (Day 0) (E2-PGFD ewes), or a half-dose plus the introduction  
136 of rams 12, 13, 14 or 15 days later (Day 0) for groups LP12 (n = 43), LP13 (n = 43), LP14  
137 (n = 44), LP15 (n = 44) respectively. The general scheme of the experiment is presented in  
138 Figure 1.

139 On Day 0 all ewes were joined with marking androgen-treated wethers with a  
140 male:female ratio of one male for every 13 females (7%). Sexual receptivity was estimated  
141 from marks on the rumps twice daily from Day 1 to Day 5.5.

142

### 143 2.3. Data analysis

144 In Experiment 1, the daily accumulated frequency of marked ewes in the 3 groups  
145 was compared with chi square test. In Experiment 2, the daily accumulated frequency from  
146 each experimental group (LP12, LP13, LP14 and LP15) was compared with that of the

8

147 control group (E2-PGFD) with chi square test.

Accepted Manuscript

148

149 **3. Results**150 *3.1. Experiment 1*

151 The accumulated frequency of marked ewes until Day 4.5 is presented in Figure 2.  
152 On Day 1 and 1.5 more HD+RE ewes than E1-PGFD ( $P = 0.0007$  and  $P = 0.02$ ) and PGHD  
153 ewes ( $P = 0.004$  and  $P = 0.02$ ) came into estrus. During Day 2 and Day 2.5 the accumulated  
154 frequencies of ewes that came into estrus were similar for the three groups. From Day 3 to  
155 Day 4.5 more E1-PGFD ewes than HD+RE ewes (Day 3:  $P = 0.005$ ; Day 3.5:  $P = 0.008$ ;  
156 Day 4:  $P = 0.008$ ; Day 4.5:  $P = 0.02$ ) and PGHD ewes (Day 3:  $P = 0.0004$ ; Day 3.5:  $P =$   
157  $0.0006$ ; Day 4:  $P = 0.001$ ; Day 4.5:  $P = 0.02$ ) had come into estrus. From Day 4.5 until the  
158 end of the experiment (Day 5.5), there were no differences in the accumulated frequencies  
159 of ewes that came into estrus between the three groups. At Day 5.5, 83/95 (87.4%)  
160 HD+RE, 92/110 (83.6%) PGHD and 85/91 (93.4%) E1-PGFD ewes had come into estrus.

161

162 *3.2. Experiment 2*

163 The accumulated frequency of marked ewes until Day 5.5 is presented in Figure 3.  
164 As LP12, LP13, LP14, and LP15 groups were individually compared with E2-PGFD group,  
165 Figures 3A, 3B, 3C and 3D present the data of each group respectively, including the data  
166 of the E2-PGFD group in all of them. Until Day 2 there were no differences between E2-  
167 PGFD ewes and the experimental groups. On Days 2.5, 3, 3.5 and 4 more E2-PGFD ewes  
168 were detected in estrus than LP12 ewes ( $P < 0.05$ ) (Figure 3A). On Days 2, 2.5, 3, 3.5 and 4  
169 more E2-PGFD ewes were detected in estrus than LP13 ewes ( $P < 0.05$ ) (Figure 3B). On  
170 Days 2.5, 3 and 3.5 more E2-PGFD ewes were detected in estrus than LP14 ewes ( $P < 0.05$ )  
171 (Figure 3C). On Days 2.5, 3, 3.5 and 4.5 more E2-PGFD ewes were detected in estrus than

10



172 LP15 ewes ( $P<0.05$ ) (Figure 3D). By the end of the experiment (Day 5.5), there were no  
173 differences in the accumulated frequencies of ewes that came into estrus in any group:  
174 44/44 (100%), 41/42 (97.6%), 42/43 (97.7%), 43/44 (97.7%), and 42/44 (95.5%) for E2-  
175 PGFD, LP12, LP13, LP14, and LP15 respectively.

176

177 **4. Discussion**

178 In the first experiment, although the final results were similar for all groups, the  
179 introduction of the males simultaneously with the administration of a half PGF2 $\alpha$  dose  
180 increased the number of ewes that responded with estrus early after the second dose  
181 (HD+RE ewes). This agrees with the results of Contreras-Solis et al (2009), who obtained  
182 an advancement of the preovulatory LH surge and ovulation in ewes synchronized with  
183 PGF2 $\alpha$  and stimulated with the ram effect, effect that may be explained by an earlier  
184 luteolysis. The positive effects of rams on estrous synchronization when associated with  
185 half PGF2 $\alpha$  dose are greater than those reported by Ngere and Dzakuma (1972), who  
186 introduced rams to tropical non-seasonal ewes. Although this response was displayed by a  
187 small part of the flock, it implies that those ewes that came into estrus in that period  
188 advanced their onset of estrus, demonstrating that the management is potentially effective.  
189 The ram effect maybe not strong enough to substitute half PGF2 $\alpha$  dose when ewes have  
190 their corpus luteum in its maximum functional activity. In this sense, the lack of a positive  
191 response of the major part of the flock maybe consequence of a weak increase of estradiol  
192 concentration provoked by the rams, not triggering luteolysis, similar to what was  
193 previously reported without the addition of PGF2 $\alpha$  (Ungerfeld, 2011). This maybe due to a  
194 low sensitivity of the endometrium to estradiol, or of the corpus luteum to the luteolytic  
195 mechanism in different days of the estrous cycle (Lamsa et al., 1992; Custer et al., 1995). In  
196 any case, due to the low positive results, it seems that these results are more useful as a  
197 basis for other experiment than for the direct application at field conditions. Therefore, we  
198 designed the second experiment to determine if the luteal phase stage (day of the estrous  
199 cycle) may limit the percentage of ewes responding.

12

Page 12 of 23

200 In Experiment 2 we did not observe any differences in the estrus response of the  
201 ewes according to the day in which they were stimulated. As in Experiment 2 we did not  
202 include again a group treated with the second half-dose without the ram effect, we cannot  
203 discard that there was a positive response of the ram effect, but in any case it was unrelated  
204 to the day of the introduction of the rams. However, there was no advantage on using the  
205 ram effect, as was observed in Experiment 1 even in few ewes. A limitation is that in this  
206 experiment it was not possible to know the exact day of the estrous cycle of each ewe, as  
207 estrus could not be determined due to the isolation period needed by the ram effect. The  
208 overall estrous rate in this experiment was slightly higher than that of Experiment 1,  
209 probably due to the use of multiparous instead of nulliparous ewes. From a practical view,  
210 as the results of using half PGF2 $\alpha$  dose and the ram effect did not achieve the results of a  
211 full dose until days 4 to 5, the only benefit of this treatment would be a decrease of the  
212 PGF2 $\alpha$  cost, although it would have lower reproductive results.

213 Overall, these studies have the limitation that the number of ewes that came into  
214 estrous was the only response determined. However, at the same time provides information  
215 useful to speculate and thus study basic mechanisms that may be behind this response. For  
216 example, it is interesting to speculate with a possible strategy to increase the response to  
217 half PGF2 $\alpha$  dose and the ram effect: the time needed from the estradiol increase to the  
218 increase in PGF2 $\alpha$  ranges 12 to 48 h (Ford et al., 1975). Moreover, considering also the  
219 delay occurring from the introduction of the males until estradiol is secreted, the stimulated  
220 secretion of PGF2 $\alpha$  may have been desynchronized with the pharmacological application,  
221 making the treatment less effective in inducing luteolysis. An alternative possibility to be  
222 tested would be to administer the PGF2 $\alpha$  24-36 h after the introduction of the males, when  
223 the endogenous secretion of PGF2 $\alpha$  may be expected (Ford et al., 1975). It would also be

224 necessary to study the progesterone profile of ewes to ensure if the management effectively  
225 triggers the luteolytic process.

226

227 **Conclusion**

228 In conclusion, the ram effect was effective substituting half PGF<sub>2</sub>α in part of the  
229 flock, but the response was unrelated to the day of the late luteal phase in which the ewes  
230 are stimulated. As these results may be considered as a basis to continue studying this issue,  
231 it remains to determine how to obtain greater effects recruiting a higher percentage of ewes  
232 responding to include these managements in practical estrous synchronization trials.

233

234 **Acknowledgements**

235 We acknowledge César Niell, Walter Rodríguez Núñez, Lito, Jorge Riani Conti, Alfredo  
236 Irazábal, José Arias, and the staff of the farms where the experiments were performed for  
237 their kind contribution in the animal management.

238

239 **Conflict of interest statement**

240 The first author works for Zoetis. This factor did not exert any kind of influence, neither  
241 positive nor negative, regarding the aims, the outcomes or any part of the study.

15

Page 15 of 23

242

243 **References**

- 244 Al-Gubory, K.H., 1998. Effects of the presence of rams during pregnancy on lambing  
245 performance in ewes. *Anim. Reprod. Sci.* 52, 205–211.
- 246 Baird, D.T., 1978. Pulsatile secretion of LH and ovarian estradiol during the follicular  
247 phase of the sheep estrous cycle. *Biol. Reprod.* 18, 359–364.
- 248 Bazer, F.W., Thatcher, W.W., Hansen, P.J., Mirando, M.A., Ott, T.L., Plante, C., 1991.  
249 Physiological mechanisms of pregnancy recognition in ruminants. *J. Reprod. Fert.*  
250 *Suppl* 43, 39–47.
- 251 Chemineau, P., 1983. Effect on estrous and ovulation of exposing creole goats to the male  
252 at three times of the year. *J. Reprod. Fert.* 67, 65–72.
- 253 Contreras-Solis, I. Vasquez, B., Diaz, T., Letelier, C., Lopez-Sebastian, A., Gonzalez-  
254 Bulnes, A., 2009. Efficiency of estrous synchronization in tropical sheep by  
255 combining short-interval cloprostenol-based protocols and “male effect”.  
256 *Theriogenology* 71, 1018–1025.
- 257 Custer, E.E., Lamsa, J.C., Eldering, J.A., McCracken, J.A., 1995. Identification of  
258 functional high and low affinity states of the prostaglandin F2 alpha receptor in the  
259 ovine corpus luteum in vivo and their role in hormone pulsatility. *Endocrine* 3,  
260 761–764.
- 261 Delgadillo, J.A., Gelez, H., Ungerfeld, R., Hawken, P.A.R., Martin, G.B., 2009. The “male  
262 effect” in sheep and goats – Revisiting the dogmas. *Behav. Brain Res.* 200, 304–  
263 314.
- 264 Evans, A.C.O., Duffy, P., Crosby, T.F., Hawken, P.A.R., Boland, M.P., Beard, A.P., 2004.  
265 Effect of ram exposure at the end of progestagen treatment on estrus

16

Page 16 of 23

- 266 synchronisation and fertility during the breeding season in ewes. *Anim. Reprod. Sci.*  
267 84, 349–358.
- 268 Fierro, S., Gil, J., Viñoles, C., Olivera-Muzante, J., 2013. The use of prostaglandins in  
269 controlling estrous cycle of the ewe: A review. *Theriogenology* 79, 399-408.
- 270 Flint, A.P.F., Leat, W.M.F., Sheldrick, E.L., Stewart, H.J., 1986. Stimulation of  
271 phosphoinositide hydrolysis by oxytocin and the mechanism by which oxytocin  
272 controls prostaglandin synthesis in the ovine endometrium. *Biochem. J.* 237,  
273 797–805.
- 274 Flint, A.P.F., Sheldrick, E.L., 1982. Ovarian secretion of oxytocin is stimulated by  
275 prostaglandin. *Nature* 297, 587–588.
- 276 Ford, S.P., Weems, C.W., Pitts, R.E., Pexton, J.E., Butcher, R.L., Inskeep, E.K., 1975.  
277 Effects of estradiol-17 $\beta$  and progesterone on prostaglandins F in sheep uteri and  
278 uterine venous plasma. *J. Anim. Sci.* 41, 1407–1413.
- 279 Hawk, H.W., Bolt, D.J., 1970. Luteolytic effect of estradiol-17 $\beta$  when administered after  
280 midcycle in the ewe. *Biol. Reprod.* 2, 275–278.
- 281 Hawken, P.A.R., Beard, A.P., Esmaili, T., Kadokawa, H., Evans, A.C.O., Blache, D.,  
282 Martin, G.B., 2007. The introduction of rams induces an increase in pulsatile LH  
283 secretion in cyclic ewes during the breeding season. *Theriogenology* 68, 56–66.
- 284 Hixon, J.E., Flint, A.P.F., 1987. Effects of a luteolytic dose of oestradiol benzoate on  
285 uterine oxytocin receptor concentrations, phosphoinositide turnover and  
286 prostaglandin F-2 $\alpha$  secretion in sheep. *J. Reprod. Fert.* 79, 457–467.
- 287 Lamsa, J.C., Cushman, R.A., Nay, M.G., McCracken, J.A., 1992. In vivo desensitization of  
288 a high affinity PGF $_2$  alpha receptor in the ovine corpus luteum. *Prostaglandins* 43,  
289 165–179.

- 290 Martin, G.B., Milton, J.T.B., Davidson, R.H., Banchemo Hunzicker, G.E., Lindsay, D.R.,  
291 Blache, D., 2004. Natural methods for increasing reproductive efficiency in small  
292 ruminants. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83, 231-246.
- 293 Martin, G.B., Oldham, C.M., Cognie, Y., Pearce, D.T., 1986. The physiological response of  
294 anovulatory ewes to the introduction of rams - a review. *Livest. Prod. Sci.* 15, 219-  
295 247.
- 296 McCracken, J.A., Carlson, J.C., Glew, M.E., Goding, J.R., Baird, D.T., Green, K.,  
297 Samuelsson, B., 1972. Prostaglandin F<sub>2α</sub> identified as a luteolytic hormone in  
298 sheep. *Nature* 238, 129-134.
- 299 Mellado, M., Hernández, J.R., 1996. Ability of androgenized goat wethers and does to  
300 induce estrus in goats under extensive conditions during anestrus and breeding  
301 seasons. *Small Rum. Res.* 23, 37-42.
- 302 Menchaca, A., Rubianes, E., 2004. New treatments associated with timed artificial  
303 insemination in small ruminants. *Reprod. Fert. Dev.* 16, 403-413.
- 304 Ngere, L.O., Dzakuma, J.M., 1975. The effect of sudden introduction of rams on oestrus  
305 pattern of tropical ewes. *J. Agric. Sci.* 2, 263-264.
- 306 Olivera-Muzante, J., Gil, J., Fierro, S., Menchaca, A., Rubianes, E., 2011. Alternatives to  
307 improve a prostaglandin-based protocol for timed artificial insemination in sheep.  
308 *Theriogenology* 76, 1501-1507.
- 309 Spencer, T.E., Becker, W.C., George, P., Mirando, M.A., Ogle, T.F., Bazer, F.W., 1995:  
310 Ovine interferon- $\tau$  inhibits estrogen receptor up-regulation and estrogen-induced  
311 luteolysis in cyclic ewes. *Endocrinology* 136, 4932-4944.
- 312 Ungerfeld, R., 2011. Combination of the ram effect with PGF<sub>2α</sub> estrus synchronization  
313 treatments in ewes during the breeding season. *Anim. Reprod. Sci.* 124, 65-68.



314 Ungerfeld, R., Forsberg, M., Rubianes, E., 2004. Overview of the response of anoestrous  
315 ewes to the ram effect. *Reprod. Fert. Dev.* 16, 479-490.

Accepted Manuscript

316

317 Figure 1. Experimental procedures in Experiment two. The control group (Ex2-PGFD) was  
318 compared against 4 groups in which the second dose was administered on different days of  
319 the late luteal phase (Days 12, 13, 14 and 15).

320

321 Figure 2. Accumulated frequency of ewes in estrus until Day 4.5 in Experiment 1. Ewes  
322 received: 1) two doses of PGF2 $\alpha$  and remain in contact with males (Ex1-PGFD;  $\blacktriangle$ ); 2)  
323 half dose of PGF2 $\alpha$  at the second dosage in contact with males (PGHD;  $\blacklozenge$ ); and 3)  
324 ewes that remained isolated from males and treated with half dose of PGF2 $\alpha$  at the second  
325 dosage (PGHDRE;  $\blacklozenge$ ). On Day 1 and 1.5 more PGHDRE ewes than Ex1-PGFD and  
326 PGHD ewes had come into estrus. During Days 2 and 2.5 there were no differences and the  
327 accumulated frequencies were similar for the three groups. From Day 3 to Day 4.5 more  
328 Ex1-PGFD ewes had come in estrus than PGHDRE ewes. See *P* values in Results section.

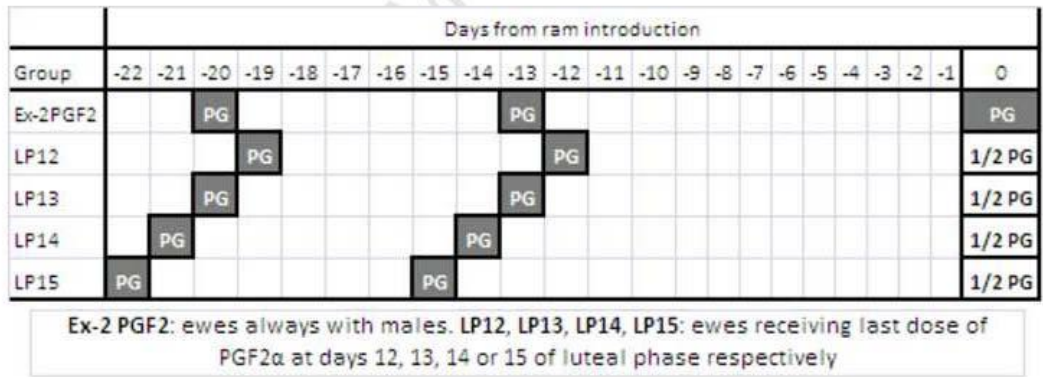
329

330 Figure 3. Accumulated frequency of ewes in estrus until Day 5.5 from ram introduction in  
331 Experiment 2. On Days 2.5, 3, 3.5 and 4 more Ex2-PGFD ( $\blacksquare$ ) ewes were detected in  
332 estrus than LP12 ( $\blacksquare$ ) ewes (3a). On Days 2, 2.5, 3, 3.5 and 4 more Ex2-PGFD ewes  
333 were detected in estrus than LP13 ( $\blacktriangle$ ) ewes (3b). On Days 2.5, 3 and 3.5 more Ex2-  
334 PGFD ewes were detected in estrus than LP14 ( $\square$ ) ewes (3c). On Days 2.5, 3, 3.5 and  
335 4.5 more Ex2-PGFD ewes were detected in estrus than LP15 ( $\blacktriangle$ ) ewes (3d). By the end  
336 of the experiment (Day 5.5), there were no differences in the accumulated frequencies of  
337 ewes that came into estrus between the three groups.

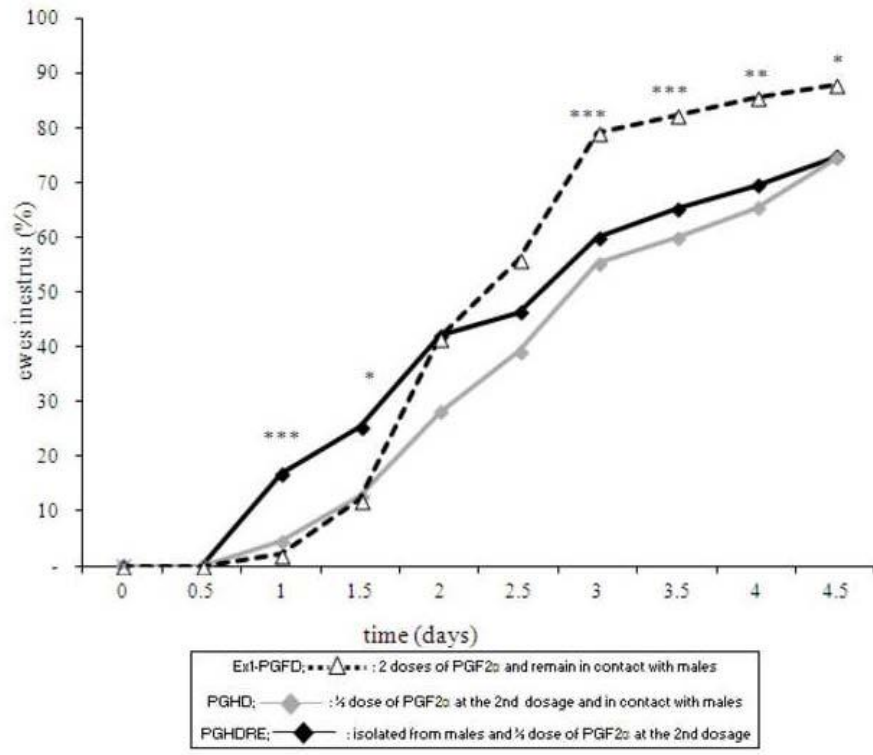
20

Page 20 of 23

Figure



Figure



Figure

