

1. Título del proyecto

Inducción de la actividad sexual de carneros adultos con testosterona y/o glutamato durante el periodo de reposo sexual.

2. Introducción

Las ovejas tienen una actividad reproductiva que es considerada como estacional (Hafez, 1952). Este fenómeno se ve influenciado principalmente por el fotoperiodo y cambios en la duración del día (Rosa y Briant, 2003). Hafez, en 1952, describió ampliamente las características estacionales de la oveja, con periodos de actividad sexual que abarcan desde el momento de transición de los días largos hacia cortos (verano-otoño), hasta el comienzo de un nuevo periodo de incremento de horas luz diaria. Esta característica junto con el control específico del fotoperiodo sobre la actividad sexual de los pequeños rumiantes domésticos, ha sido objeto de numerosos estudios tanto sobre los factores que influyen en su duración, como sobre los mecanismos capaces de transformar la evolución, a lo largo del año, de las horas de luz diarias en estímulos endocrinos que controlen la actividad sexual (López *et al.*, 1993).

En efecto, mientras que las hembras muestran un anestro reproductivo en épocas del año con días más largos, los machos exhiben un comportamiento de arresto reproductivo durante el mismo lapso (Carrillo *et al.*, 2010). Se entiende como anestro estacional el periodo de no receptividad sexual, en hembras la inhibición de la ovulación y en machos el reposo sexual como consecuencia de un cambio en el patrón de secreción de melatonina por parte de la glándula pineal, que a su vez se ve modificada por cambios en el número de horas luz/oscuridad a través del año (Chemineau *et al.*, 2007).

Un estudio reciente ha demostrado que el efecto de días cortos puede ser imitado por el uso de melatonina exógena, que ayuda a carneros alcanzar los valores máximos de las características reproductivas a través del largo del día con luz natural o artificial generando un patrón estacional que promueve variabilidad en la calidad espermática, la libido y el peso testicular (Carrillo *et al.*, 2010). Por otro lado, Rosa *et al.* (2012) ha encontrado que el tratamiento de melatonina aplicado al final de primavera y sin un tratamiento precedente del largo del día no tiene efecto sobre el volumen de eyaculación y la concentración de espermatozoides, así este estímulo no es suficiente para el aumento de las dimensiones testiculares y la producción de semen. Sin embargo es bien sabido que la estacionalidad es claramente reflejada por cambios detectables en el comportamiento sexual, dimensiones testiculares (masa y volumen), gametogénesis y la secreción hormonal (Chemineau *et al.*, 1986; Hafez, 1952). Los niveles de hormonas (secretadas por el hipotálamo, pituitaria, hipófisis y gónadas) tienen efectos sobre el sistema reproductivo a través de cambios fotoperiódicos que dependen de las variaciones de la duración de horas luz/oscuridad (Hafez, 1993). Los cambios estacionales de las dimensiones testiculares son controlados por cambios en el fotoperiodo, cuyos efectos son regulados a través de las acciones de LH y FSH (Sarlós *et al.*, 2013). En turno, LH estimula las células de Leydig en los testículos para la producción de testosterona, mientras que FSH se fija y activa las células de Sertoli, y junto con testosterona estimulan la síntesis y liberación de varios productos como las proteínas transportadoras de andrógenos, inhibina, y activina, los cuales están implicados en la transferencia de nutrientes a las células germinales, la meiosis y maduración de los espermatozoides (Aman *et al.*, 1983).

La intensidad de la producción de testosterona individual básicamente determina el comportamiento reproductivo de los machos (Sarlós *et al.*, 2013). La actividad de este sistema neuronal es controlada a su vez por diferentes sistemas neurotransmisores, siendo un incremento en la neurotransmisión glutamatérgica, el principal evento excitador que estimula el inicio de la actividad reproductiva (Brann y Mahesh, 1997). El glutamato es el principal neurotransmisor excitador del cerebro, el cual ha sido localizado en núcleos hipotalámicos involucrados en la regulación de la reproducción y de ciertos procesos neuroendocrinos tales como pubertad, secreción pulsátil de las hormonas gonadotrópicas, y conducta reproductiva en mamíferos (Brann y Mahesh, 1997; Meza-Herrera *et al.*, 2011).

Las propiedades del glutamato como neurotransmisor y excitador de la producción de hormonas como LH y FSH en pituitaria han sido previamente evaluadas. Sin embargo, la totalidad de acciones de glutamato tanto en el cerebro como en el SNC permanecen desconocidas. Wright y McCarthy (2009), sugieren que la participación de los receptores a glutamato como reguladores de las acciones de Prostaglandina E2 (PGE2), tienen un rol crítico en la

masculinización del cerebro y desarrollo del comportamiento del macho en ratones.

3. Objetivo

Evaluar la efectividad de tres tratamientos (Glutamato, Testosterona, Testosterona y Glutamato) para estimular el comportamiento sexual de carneros adultos durante el periodo de reposo sexual.

4. Hipótesis

Carneros adultos tratados con testosterona y/o glutamato estimulan el comportamiento sexual durante el periodo de reposos sexual.

5. Revisión de Literatura

Antecedentes e investigaciones previas

Las relaciones sociales entre individuos de la misma especie pueden modificar su estado reproductivo. Durante el periodo de anestro, las ovejas y cabras no desarrollan ciclos estrales u ovulatorios, pero su exposición a los machos puede estimular inmediatamente la secreción de la hormona luteinizante (LH; respuesta inmediata), seguida por la ovulación y el comportamiento estral (respuesta mediata). Este fenómeno de estimulación sexual se llama efecto macho (Delgadillo *et al.*, 2006). La respuesta de las ovejas y cabras al efecto macho depende de factores internos y externos que operan en los dos sexos, tales como la variación de la respuesta de las hembras a la presencia de los machos, la raza y la calidad del estímulo otorgado por los machos (Delgadillo *et al.*, 2008).

Tanto el estado metabólico como la disponibilidad de nutrientes son algunos de los principales factores ambientales necesarios para el establecimiento de la función reproductiva (Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2011). Dicho estado metabólico así como las alteraciones que afectan la partición de nutrientes y el apetito, son regulados por una serie de interacciones complejas entre las concentraciones sanguíneas de hormonas metabólicas y el perfil de metabolitos sanguíneos (Meza-Herrera *et al.*, 2011). En consecuencia, muchas de las hormonas metabólicas y los nutrientes que pueden ayudar a mantener la homeostasis también afectan el sistema reproductivo (Scaramuzzi *et al.*, 2006; Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2011), promoviendo alteraciones importantes en la sensibilidad del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, caracterizadas por cambios que están asociados, ya sea con la activación o inhibición en la síntesis y secreción de la GnRH (Meza-Herrera *et al.*, 2009; Meza-Herrera *et al.*, 2011).

Para maximizar el éxito reproductivo en condiciones marginales de alimentación, el sistema endocrino regula los mecanismos internos y trata de alinearlos respecto cambios en el medio ambiente externo; primero, mediante cambios en la anatomía y fisiología reproductiva, y posteriormente, en el comportamiento reproductivo. Un grupo importante de hormonas está involucrado en esta regulación, pero el iniciador común es la GnRH, cuyo patrón de pulsatilidad constituye la unión clave entre la percepción de las condiciones ambientales por el cerebro y el sistema reproductivo. La actividad de este sistema neuronal es controlado a su vez por diferentes sistemas neurotransmisores, siendo un incremento en la neurotransmisión glutamatérgica, el principal evento excitador que estimula el inicio de la pubertad (Brann y Mahesh, 1997), proponiendo una ruta dependiente en hormonas metabólicas tales como la triyodotironina (T3) e insulina a través del tiempo (Meza-Herrera *et al.*, 2011).

La relación entre inicio de la actividad reproductiva y la suplementación con glutamato, muestra un rol significativo como sustrato gluconeogénico, posiblemente influye positivamente en el estado energético del animal, promoviendo una mejor comunicación entre los componentes del eje hipotalámico-hipofisiario-gonadal, generando así un mejor ambiente neuroendócrino para la activación del desarrollo y la esteroidogénesis folicular, originando la primo-ovulación en las cabras suplementadas con glutamato en una ruta independiente de los niveles séricos de proteína total y urea; dichos resultados destacan una importancia no solo clínica sino productiva (Calderón-Leyva, 2012).

Los conocimientos sobre la respuesta reproductiva de los ovino y caprinos a cambios fotoperiódicos han permitido el desarrollo de una variedad bastante amplia de tratamientos que permiten tener una fertilidad alta a contra estación (Chemineau *et al.*, 2003). Se ha reportado que el principal factor regulador de los niveles plasmáticos de testosterona en machos caprinos es el fotoperiodo, siendo éste el principal agente capaz de influenciar el cambio en el patrón de secreción de esta hormona con respecto a otros factores ambientales como la temperatura y la disponibilidad de alimento (Delgadillo *et al.*, 2006). El fotoperiodo juega un rol clave tanto en la expresión de la conducta sexual como de las características morfo-sexuales, teniendo un espectro de acción inhibitoria durante los meses de enero a julio en latitudes subtropicales (26° LN) sobre la calidad espermática, peso testicular y circunferencia escrotal (Carrillo *et al.*, 2010).

Localización del estudio

El estudio se realizara en el establo "El Milagro" dentro del Ejido Granada perteneciente al municipio de Matamoros, Coahuila 26° LN.

Animales y Diseño de Tratamientos

Se utilizaran 20 carneros adultos de la raza Dorper, se dividirán en cuatro grupos homogéneos:

- 1) grupo control (CONT)
- 2) grupo testosterona (T4)
- 3) grupo glutamato (GLU)
- 4) grupo glutamato más testosterona (GLU + T4)

Al grupo T4 se le aplicará una dosis de 20 mg de testosterona (propiionato de testosterona), al grupo GLU se le aplicarán 7 mg kg⁻¹ PV de L-Glutamato (Merck, Germany), al grupo GLU + T4 se le aplicaran 20 mg de testosterona (propiionato de testosterona) y 7 mg kg⁻¹ PV de L-Glutamato (Merck, Germany) y al grupo CONT se le aplicaran 0.5 ml de solución salina para homogenizar condiciones entre los grupos. Los diferentes tratamientos se aplicaran a los machos cada cinco días durante 30 días para inducir una intensa actividad sexual.

Durante todo el experimento los machos de los diferentes grupos tendrán libre acceso al agua, sales minerales y sombra.

Variables a evaluar

Peso Vivo y Condición Corporal

Tanto el Peso Vivo (PV) como la Condición Corporal (CC) serán registradas cada quince días previo a la alimentación durante todo el periodo experimental. La CC se evaluara mediante palpación dorsal utilizando la técnica de Russell (1984) que va de una escala de 1 (muy flaca) a 5 (muy gorda).

Intensidad de Olor, Circunferencia Escrotal y Calidad Seminal

Se registrara el olor de los machos tomando una escala de 0-3 usando la técnica descrita por Walkden-Brown *et al.* (1993). Para medir circunferencia escrotal se utilizara una cinta métrica flexible y se toma la medida de la parte más ancha de los testículos, calidad seminal (motilidad, viabilidad, volumen, concentración espermática, rechazos, latencia y eyaculado) (Carrillo *et al.*, 2010) estos registros se realizaran cada 10 días durante el periodo experimental.

Prueba de Comportamiento Sexual

Se observara el comportamiento sexual al inicio y al final del estudio realizando una prueba de 15 min con cada macho exponiéndolos con una hembra estrogenizada, donde se registrara el olfateo, aproximación, intento de monta, monta con eyaculación, automarcajes, agresiones hacia hembras, pasos durante la prueba (Walkden-Brown *et al.*, 1993).

Muestreo Sanguíneo Intermitente

Antes de la aplicación de los tratamientos y a partir del día 1 de aplicación se colectaran muestras de sangre de cada carnero mediante venopunción yugular una vez cada cinco días, utilizando agujas estériles de 0.8 x 38 mm y tubos colectores estériles Vacutainer de 10 mL; dicho muestreo se realizara por un periodo de 40 días. Una vez tomadas las muestras de sangre, se dejaran reposar a temperatura ambiente por un lapso de 30 minutos hasta que ocurra la retroacción del coágulo, después de esto, serán centrifugadas (3,500 g x 15 min), y se colectara y almacenara el suero con su réplica en tubos de propileno de 1.5 mL a una temperatura de - 20° C.

Cuantificación de Testosterona

Para determinar los niveles séricos de Testosterona se utilizara la técnica de radioinmunoanálisis (RIA).

Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se efectuaran mediante el paquete estadístico SYSTAT 10 (Evenston, ILL, USA, 2000). Los datos de prueba de comportamiento sexual se compararan mediante una prueba de chi-cuadrada. Para comparar la actividad sexual durante el día y la noche se juntara a 12 h cada uno.

7. Cronograma de actividades

Actividad a realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Estabulaciones de los animales		X	X									
Tratamiento de los animales			X									
Prueba de semen		X	X	X								
Prueba de comportamiento		X	X	X								
Análisis de datos					X	X	X	X				
Redacción del trabajo final									X	X	X	

8. Productos esperados

1 Tesis de nivel doctorado
 1 Artículos publicado en congreso internacional
 1 Artículo Arbitrado

9. Literatura citada

- Aman R.P. & Schanbacher B.D. 1983. Physiology of male reproduction. *Journal of Animal Science*; 57, 380-403.
- Brann D.W., Mahesh Virendra B., 1997. Excitatory amino acids: evidence for a role in the control of reproduction and anterior pituitary hormone secretion. *Endocrine Rev*; 18, 678-700.
- Calderón-Leyva. 2012. Suplementación de Glutamato e inicio de pubertad en cabras y metabolitos sanguíneos. Proteína total y Urea. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Chapingo. Bermejillo, Dgo. México.
- Carrillo E., Meza-Herrera C.A., Véliz F.G. 2010. Estacionalidad reproductiva de los machos cabríos de la raza Alpino-Francés adaptados al subtrópico Mexicano. *Rev Mex Cienc Pecu*; 1:2, 169-178.
- Chemineau P., Malpoux B., Brillard J.P., Fostier A. 2007. Seasonality of reproduction and production in farm fishes, birds mammals. *Animal*; 1, 419-432.
- Chemineau P., Morello H., Delgadillo J.A., Malpoux B. 2003. Estacionalidad reproductiva en pequeños rumiantes: mecanismos fisiológicos y técnicas para la inducción de una actividad sexual a contra-estación. 3er Congreso ALEPRYCS, Viña del Mar, Chile; 7-9.
- Chemineau P., Normant I., Ravault J. P., Thimonier J. 1986. Induction and persistence of pituitary and ovarian activity in the out-of-season lactating dairy goat after a treatment combining a skeleton photo-period, melatonin and the male effect. *Journal of Reproduction and Fertility*; 78, 497-504.
- Delgadillo J.A., Flores J.A., Véliz F.G., Duarte G., Vielma J., Hernandez H., Fernandez I.G. 2006. Importance of the signals provided by the buck for the success of the male effect in goats. *Reproduction, Nutrition and Development*; 44, 391-400.
- Delgadillo J.A., Vielma J., Flores J.A., Véliz F.G., Duarte G., Vielma J., Hernandez H. 2008. La calidad del estímulo emitido por el macho determina la respuesta de las cabras sometidas al efecto macho. *Tropic Subtrop Agroecos*; 9, 39 – 45.
- Gonzalez-Bulnes A., Meza-Herrera C.A., Rekik M., Ben Salem H., Kridli RT. 2011. *Semi-Arid Environments Agriculture, Water Supply and Vegetation*. Kara M Degenovine, Editor. Published by Nova Science Publishers, Inc. New York, 41-62.
- Hafez E.S.E. 1993. Reproductive behaviour. In: Hafez E S E, ed., *Reproduction in farm animals*. Lea and Febiger, Philadelphia, USA; 424-439.
- Hafez E.S.E., 1952. Studies on the breeding season and reproduction of the ewe. *J. Agric. Sci. Camb*; 42, 189-265.
- López S.A., Santiago M.J., G. de Bulnes A., García L.M. 1993. Aspectos característicos de la fisiología reproductiva de la oveja. *Revista Científica, FVC-Luz*; 3:2, 123-133.
- Meza-Herrera C.A., Gonzalez-Bulnes A., Kridli R.T., Mellado M., Arechiga-Flores C.F., Salinas H., Luginbuhl J.M. 2009. Neuroendocrine, metabolic and genomic cues signalling the onset of puberty in females. *Reprod Dom Anim* doi: 10.1111 0936-6768.
- Meza-Herrera C.A., Torres-Moreno M., Lopez-Medrano J.I., Gonzalez-Bulnes A., Veliz F.G., Mellado M., Wurzinger M., Soto-Sanchez M.J., Calderon-Leyva M.G. 2011. Glutamate supply positively affects serum release of triiodothyronine and insulin across time without increases of glucose during the onset of puberty in female goats. *Anim Rep Sci*; 125, 74-80.
- Rosa H.J.D. and Bryant M.J., 2003. Seasonality of reproduction in sheep. *Small Rumin. Es*; 48, 155-171.
- Rosa H.J.D., Silva C.C., Bryant M.J. 2012. The effect of melatonin treatment in rams on seasonal variation of testicular size and semen production parameters. *Small Rumin. Res*; 102, 197-202.
- Russell A. 1984. Body condition scoring of sheep. In *Practice*; 6:3 91-93.
- Sarlos P., Egerszegia I., Balogha O., Molnara A., Csehb S., Ratkya J. 2013. Seasonal changes of scrotal circumference, blood plasma testosterone concentration and semen characteristics in Racka rams. *Small Ruminant Research*; 111; 90-95.
- Scaramuzzi R.J., Campbell B.K., Downing J.A., Kendall N.R., Khalid M., Muñoz Gutierrez M., Somchit A. 2006. A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reprod Fert Develop*; 46, 1-16.
- Walkden-Brown S.W., Restall B.J., Henniawati. 1993. The male effect in the Australian cashmere goat. 3. Enhancement with buck nutrition and use of oestrous females. *Anim. Reprod. Sci.* 32, 69-84.
- Wright C.L. and McCarthy M. 2009. Prostaglandin E2-Induced masculinization of brain and behavior requires protein kinase A, AMPA/Kainate, and Metabotropic Glutamate receptor signaling. *The Journal of Neuroscience*; 29:42,13274-13282.