



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

**KISSPEPTINA, AMAMANTAMIENTO Y EFECTO MACHO EN
LA SECRECIÓN PULSÁTIL Y PICO PREEVULATORIO DE
LH DURANTE EL PERIODO POSTPARTO DE OVEJAS
PELIBUEY**

JOSÉ MANUEL HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2018

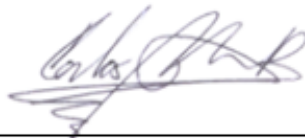
**CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y
DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN**

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe, **José Manuel Hernández Hernández**, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor **Carlos Miguel Becerril Pérez**, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 29 de junio de 2018



Firma del Alumno (a)



Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

**KISSPEPTINA, AMAMANTAMIENTO Y EFECTO MACHO EN LA
SECRECIÓN PULSÁTIL Y PICO PREEVULATORIO DE LH DURANTE
EL PERIODO POSTPARTO DE OVEJAS PELIBUEY**

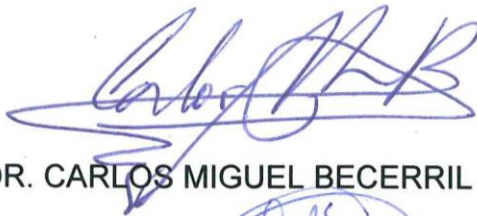


La presente tesis titulada: “**Kisspeptina, amamantamiento y efecto macho en la secreción pulsátil y pico preovulatorio de LH durante el periodo postparto de ovejas Pelibuey**”, realizada por el alumno: **José Manuel HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



DR. CARLOS MIGUEL BECERRIL PÉREZ

DIRECTOR DE TESIS:



DR. JAIME GALLEGOS SÁNCHEZ

ASESOR:

DR. ARTURO PRO MARTÍNEZ

ASESOR:

DR. CÉSAR CORTEZ ROMERO

ASESOR:

DR. JUAN SALAZAR ORTIZ

ASESOR:

DR. ALEJANDRO VILLA GODOY

Montecillo, Texcoco, estado de México, junio de 2018

KISSPEPTINA, AMAMANTAMIENTO Y EFECTO MACHO EN LA SECRECIÓN PULSÁTIL Y PICO PREEVULATORIO DE LH DURANTE EL PERIODO POSTPARTO DE OVEJAS PELIBUEY

José Manuel Hernández Hernández, D. en C.
Colegio de Postgraduados, 2018

RESUMEN

Se realizaron tres experimentos para evaluar el efecto de la kisspeptina (Kp), el amamantamiento controlado (R) y el efecto macho (M) en la secreción pulsátil y pico preovulatorio de LH; así como, en el comportamiento reproductivo de ovejas durante el anestro postparto. El objetivo del primer estudio fue determinar si el amamantamiento controlado y el efecto macho, como efectos simples o en interacción, mejoran el desempeño reproductivo de ovejas en anestro postparto. Se incluyeron en el estudio 60 ovejas con 1.4 ± 0.15 d de paridas y amamantando a sus crías. El día 6 postparto se formaron 4 grupos: amamantamiento continuo (A; n=15), A más efecto macho (AM; n=15), amamantamiento controlado (R; n=15), y R más efecto macho (RM; n=15). El diseño fue un completamente al azar en arreglo factorial 2x2. A partir del día 35 se empezó la observación para detectar la incidencia de estros en todos los grupos y toda hembra detectada en celo se empadró con monta natural. El efecto macho redujo el tiempo al primer estro en 7 días ($p \leq 0.001$), incrementó 47 % las gestaciones ($p \leq 0.030$) y aumentó la fecundidad de 0.7 a 1.4 ($p \leq 0.002$). El amamantamiento controlado redujo los días al primer estro en 3 ($p \leq 0.016$). Se concluyó que el efecto macho y el amamantamiento controlado, como efectos independientes, mejoran el desempeño reproductivo de ovejas en anestro postparto. El segundo experimento se realizó para probar si la aplicación de Kp i.v. incrementaba la secreción pulsátil de LH en ovejas en anestro postparto, con amamantamiento continuo, y si el incremento es mayor que con amamantamiento controlado. Diez días después del parto, se formaron 2 grupos de ovejas: (1) A (n=8) y (2) R (n=8). El día 19, a cada oveja se le colocó un catéter en ambas venas yugulares y después cada una se puso en una jaula individual, con acceso a agua y alimento. El día 20, a las 14:00 h, la mitad de las ovejas de cada grupo recibió 120 μ g de Kp, diluida en 3 mL de solución salina y aplicada por infusión continua durante 6 h, mientras que la otra mitad sólo recibió solución salina. El diseño

experimental fue factorial 2x2. Se tomaron muestras sanguíneas (4 mL) cada 15 min, desde las 8:00 hasta las 20:00 h, para determinar LH. La frecuencia de secreción de LH antes de la Kp fue similar entre tratamientos (1.50 ± 0.40 ; $p > 0.05$), pero incrementó a 3.50 ± 0.43 pulsos con la aplicación de Kp ($p \leq 0.0140$). Se concluyó que la aplicación de Kp incrementa la secreción pulsátil de LH de manera similar, en ovejas en anestro postparto, con amamantamiento continuo o controlado. El tercer estudio se realizó para evaluar la aplicación de Kp con efecto macho o amamantamiento controlado, en la inducción del pico preovulatorio y la concentración de LH de ovejas en anestro postparto. Se utilizaron 40 ovejas Pelibuey, múltiparas, con 10 días de paridas y amamantando a una cría. El día 1 del experimento (día 10 postparto) se formaron 4 grupos de ovejas como sigue: amamantamiento continuo (A; n=8); A con efecto macho (AM; n=12); amamantamiento controlado (R; n=8); R con efecto macho (RM; n=12). El día 9, a cada oveja le fue colocado un catéter en cada vena yugular. Cada grupo de ovejas se dividió en 2 para aplicarles 12 mL de solución salina (S) o 12 mL de S más 480 μg de Kp en 24 h por infusión continua. El diseño experimental fue factorial 2x2x2 (ocho tratamientos). El día 10, a las 14:00 h, se inició la aplicación de la S y Kp mediante una bomba de infusión constante conectada al catéter derecho por una manguera plástica durante 24 h. La tasa de aplicación fue $500 \mu\text{L h}^{-1}$ y $20 \mu\text{g h}^{-1}$ de Kp, respectivamente. El día 10 y 11 del experimento se tomaron muestras sanguíneas para medir LH cada 2 h, desde 6 h antes de la infusión hasta 6 h después del final de la misma. El 65 % de las ovejas con Kp tuvieron pico preovulatorio. Hubo efecto independiente del factor Kp ($p \leq 0.0005$) y la interacción Kp-efecto macho ($p \leq 0.002$). La interacción Kp-efecto macho-amamantamiento controlado no fue significativa ($p > 0.05$), pero en el tratamiento RMKp hubo el 100 % de ovejas con pico preovulatorio. Se puede concluir que la Kp induce el pico preovulatorio y el aumento de la concentración de LH en ovejas en anestro postparto; la incidencia incrementa con el efecto macho, pero no con el amamantamiento controlado.

Palabra clave: anestro, reproducción, ovinos, neuroendocrinología

KISSPEPTIN, SUCKLING AND MALE EFFECT IN THE FREQUENCY OF PULSES AND LH SURGE IN POSTPARTUM PERIOD OF PELIBUEY EWES

José Manuel Hernández Hernández, D. in C.
Colegio de Postgraduados, 2018

ABSTRACT

Three experiments were carried out to evaluate effects of kisspeptin (Kp), controlled suckling I and the male effect (M) on the pulsatile secretion and preovulatory surge of LH, as well as the reproductive behavior of postpartum ewes. The objective of the first study was to determine whether or not controlled suckling, the male effect and their interactions, improve the reproductive behavior of ewes during the postpartum interval. According to a 2X2 factorial design, 60 suckling ewes that were 1.4 ± 0.15 d from calving, were randomly allotted on day 6 postpartum to four groups: continuous suckling (A; n = 15), A plus male effect (AM; n = 15), controlled suckling (R; n = 15), R plus male effect (RM; n = 15). At day 35, observations for estrus detection began and all ewes detected in heat were exposed to natural mating. Male effect reduced the interval to first estrus in 7 days ($p \leq 0.001$), increased pregnancy rate by 47% ($p \leq 0.030$) and improved fecundity from 0.7 to 1.4 ($p \leq 0.002$). Controlled suckling reduced the interval to first estrus by 3 days ($p \leq 0.016$). It was concluded that male effect and controlled suckling, as independent effects, improve the reproductive performance of postpartum ewes. The second experiment was performed to test whether the i.v. application of Kp increased the pulsatile LH secretion in sheep at postpartum anestrus, with continuous suckling, and if the increase is greater than with controlled suckling. Ten days after calving, ewes were allotted into two groups: (1) A (n = 8) and (2) R (n = 8). On day 19, a catheter was inserted in each of the Jugular veins of all ewes, and then each sheep was placed in an individual cage, with access to water and food. On day 20, at 14:00 h, half of the sheep in each group received 120 μ g of Kp, diluted in 3 mL of saline and applied by continuous infusion for 6 h, while the other half received only saline. The experiment was a 2x2 factorial design for repeated measures over time. Blood samples (4 mL) were taken every 15 min, from 08:00 to 20:00 h, to determine LH. The LH frequency of

secretion before Kp was similar for all treatments (1.50 ± 0.40 , $p > 0.05$), but increased to 3.50 ± 0.43 pulses with the Kp application ($p \leq 0.0140$). It was concluded that the application of Kp increases the pulsatile LH secretion in a similar way, in sheep at postpartum anestrus, with continuous or controlled suckling. The third study was carried out to evaluate the application of Kp with male effect or controlled suckling, in the induction of the preovulatory surge and LH concentration of sheep in postpartum anestrus. Forty Pelibuey multiparous ewes that were 10 days from lambing and suckling one lamb. On day 1 of the experiment (10th postpartum day) sheep were allotted into four groups as follows: continuous suckling (A; n = 8); A plus male effect (AM; n = 12); controlled suckling (R; n = 8); R and male effect (RM, n = 12). On day 9, a catheter was inserted in each jugular vein of each sheep. Each group of sheep was divided into two subgroups that received either 12 mL of saline solution (S) or 12 mL of S plus 480 µg of Kp in 24 h by continuous infusion. The experiment was a 2x2x2 (eight treatments) factorial design for repeated samples over time. On day 10, at 14:00 h, application of the S and Kp began by a constant infusion pump connected to the right catheter by a plastic hose. The application rate was $500 \mu\text{L h}^{-1}$ and $20 \mu\text{g h}^{-1}$ of Kp, respectively. On day 10 and 11 of the experiment, blood samples were taken to measure LH every 2 h, from 6 h before the infusion to 6 h after the end of the infusion. Sixty five per cent of sheep with Kp had preovulatory surge. There was a simple effect of the factor Kp ($p \leq 0.0005$), and Kp-male effect interaction ($p \leq 0.002$). The Kp, male effect and controlled suckling interaction was not significant ($p > 0.05$), but in the RMKp treatment there was 100% of sheep with preovulatory surge. It can be concluded that Kp induces preovulatory LH surge in sheep at postpartum anestrus; the incidence increases with male effect, but not with controlled suckling; this same tendency occurs with LH concentration.

Key words: anestrus, reproduction, sheep, neuroendocrinology

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, por las facilidades prestadas para llevar a cabo mis estudios de doctorado.

A los integrantes del Laboratorio de Reproducción de Ovinos y Caprinos (LaROCa) encabezado por el Dr. Jaime Gallegos Sánchez, por las facilidades prestadas para la realización de la fase experimental de estas investigaciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el financiamiento otorgado.

Al Dr. Rubén Santos Echeverría por las observaciones hechas en la planeación de la investigación y su apoyo en la obtención de recursos materiales.

A todas las personas que apoyaron en las actividades de la fase campo de este proyecto, en especial a MVZ. Jesús Mateo Hoyos, M.C. J. Vicente Velázquez Morales, M.C. Jimena Munguía Velázquez, Ing. Ismael Hernández Hernández, Ing. Sandra Acosta Almaguer, Dra. Tania Arellano Lezama.

CONTENIDO

RESUMEN.....	v
ABSTRACT	vii
AGRADECIMIENTOS	ix
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE CUADROS	xiv
ABREVIATURAS	xv
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
El efecto del amamantamiento en el anestro postparto de ovejas.....	2
Causales del anestro postparto.....	3
Efectos neuroendocrinos del amamantamiento durante el anestro postparto	4
El establecimiento de la relación madre-cría	4
Efecto en el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas	4
Los péptidos opioides endógenos	6
La leptina	8
Manejo del amamantamiento para reducir el anestro postparto	8
El efecto macho y su relación con la duración del anestro de ovejas	10
Vías de estimulación	11
El efecto de las feromonas	11
El contacto directo macho-hembra	13
Los estímulos visuales.....	14
El efecto en el eje reproductivo	14
La frecuencia de LH.....	14
El pico preovulatorio de LH.....	15
La longitud del ciclo estral y presentación de estros	15
Ovulación.....	16
Factores que influyen en la respuesta al efecto macho	18
Aislamiento previo y el cambio de machos.....	18
La raza en el anestro de las ovejas	19
La experiencia con estímulos previos.....	19
El amamantamiento.....	20
Nutrición.....	20
La kisspeptina y su efecto en la reproducción de los ovinos.....	20
Anatomía de la kisspeptina	20
La kisspeptina.....	20
Localización de las neuronas Kp	21
Contacto de neuronas Kp con GnRH	22

Regulación del estradiol en la kisspeptina y GnRH.....	22
Receptores de E ₂ en neuronas Kp	22
Acción diferenciada de los esteroides en las Kp en el ARC y POA.....	23
El estímulo de la kisspeptina en el eje reproductivo.....	24
Forma de acción de la kisspeptina en la secreción de gonadotropinas	24
Efecto de la Kp en la secreción de gonadotropinas	25
Acción de la Kp en la hipófisis	28
Acción de la Kp en el ovario	29
Vías y métodos de administración de kisspeptina.....	29
Vías de administración	29
Métodos de aplicación de kisspeptina	30
El amamantamiento, el efecto macho y kisspeptina en el anestro postparto	31
La hipótesis KNDy	32
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	33
CAPÍTULO I. INDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD REPRODUCTIVA DE OVEJAS EN ANESTRO POSTPARTO CON EFECTO MACHO Y CONTROL DEL AMAMANTAMIENTO	36
1.1. Resumen.....	36
1.2. Introducción.....	36
1.3. Materiales y métodos	38
1.3.1. Localización del experimento.....	38
1.3.2. Animales y alimentación	38
1.3.3. Tratamientos.....	38
1.3.4. Toma de muestras.....	39
1.3.5. Análisis estadístico	39
1.4. Resultados	39
1.4.1. Incidencia de estros.....	39
1.4.2. Tiempo al primer estro.....	40
1.4.3. Gestación.....	40
1.4.4. Fecundidad y prolificidad	41
1.4.5. Cambio de peso de las ovejas.....	42
1.4.6. Cambio de peso de las crías	42
1.5. Discusión.....	44
1.6. Conclusiones.....	47
CAPÍTULO II. LA KISSPEPTINA Y SU EFECTO EN LA SECRECIÓN PULSÁTIL DE HORMONA LUTEINIZANTE (LH) DURANTE EL ANESTRO POSTPARTO EN OVEJAS PELIBUEY AMAMANTANDO	48
2.1. Resumen.....	48
2.2. Introducción.....	48

2.3. Materiales y métodos	50
2.3.1. Localización del experimento.....	50
2.3.2. Animales y alimentación	50
2.3.3. Tratamientos.....	51
2.3.4. Toma de muestras.....	51
2.3.5. Determinación de LH	52
2.3.6. Análisis estadístico	52
2.4. Resultados	52
2.4.1. Frecuencia de secreción de LH	52
2.4.2. Amplitud de los pulsos de secreción de LH	54
2.4.3. Área bajo la curva	55
2.4.4. Concentración de LH	56
2.4.5. Peso de las ovejas.....	56
2.5. Discusión.....	57
2.6. Conclusiones.....	61
CAPÍTULO III. PICO PEOVULATORIO DE LH EN OVEJAS ANÉSTRICAS POSTPARTO CON KISSPEPTINA Y EFECTOS SOCIOSEXUALES	62
3.1. Resumen.....	62
3.2. Introducción.....	63
3.3. Materiales y métodos	65
3.3.1. Localización del experimento.....	65
3.3.2. Animales y alimentación	65
3.3.3. Tratamientos.....	65
3.3.4. Toma de muestras.....	66
3.3.5. Determinación de LH	66
3.3.6. Análisis estadístico	67
3.4. Resultados	67
3.4.1. Concentración de LH	67
3.4.2. Caracterización del pico preovulatorio	68
3.4.3. Peso de las ovejas.....	71
3.5. Discusión.....	72
3.6. Conclusiones.....	77
DISCUSIÓN GENERAL	78
CONCLUSIONES GENERALES	81
LITERATURA CITADA.....	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efectos simples de los factores amamantamiento y efecto macho en la incidencia de estros (I) y tiempo al primer estro.....	40
Figura 2. Interacción entre el tipo de amamantamiento y efecto macho en la gestación de ovejas en anestro postparto ($p>0.05$)..	41
Figura 3. Efectos simples de los factores amamantamiento y efecto macho en la gestación (I) y fecundidad (II) de ovejas.....	42
Figura 4. Cambio de peso de ovejas, desde el parto al día 63 postparto..	43
Figura 5. Cambio de peso de crías, desde el nacimiento hasta el día 63 de edad..	43
Figura 6. Secreción de LH de una oveja, elegida al azar, en anestro postparto con amamantamiento continuo y solución salina.....	55
Figura 7. Respuesta integral de secreción de LH (UAC) por efecto de la aplicación de kisspeptina (Kp) a ovejas en anestro postparto.	56
Figura 8. Cambio de peso de ovejas en anestro postparto tratadas con kisspeptina y amamantamiento controlado o continuo.	57
Figura 9. Concentración de LH de ovejas en anestro postparto tratadas con kisspeptina (Kp), efecto macho (M) y amamantamiento controlado..	68
Figura 10. Kisspeptina (Kp) x efecto macho (M) en la incidencia de pico preovulatorio en ovejas anéstricas postparto.	69
Figura 11. Pico preovulatorio de LH en ovejas en anestro postparto tratadas con kisspeptina (Kp), efecto macho (M), amamantamiento controlado (R)..	71
Figura 12. Cambio de peso de ovejas en anestro postparto. Cada tiempo con asterisco difiere significativamente.....	72

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Frecuencia de secreción de LH en ovejas en anestro postparto por tipo de amamantamiento y aplicación de kisspeptina.....	53
Cuadro 2. Frecuencia de secreción de LH en ovejas en anestro postparto por aplicación de kisspeptina (Kp) y periodo de muestreo.....	53
Cuadro 3. Amplitud de pulsos de LH en ovejas en anestro postparto por tipo de amamantamiento y aplicación de kisspeptina.....	54
Cuadro 4. Caracterización del pico preovulatorio de ovejas en anestro postparto tratadas con kisspeptina (Kp), efecto macho (M) o amamantamiento controlado (R).....	70

ABREVIATURAS

A: amamantamiento continuo	KNDy: grupo neuronal que expresa Kp, NKB y Dyn
A15: núcleo dopaminérgico	Kp: kisspeptina
ARC: núcleo arcuato	Kp-10: Kp de 10 aminoácidos
ARNm: ácido ribonucleico mensajero	LH: hormona luteinizante
AVPV: núcleo anteroventral paraventricular.	M: efecto macho
Dyn: dinorfina	NKB: neuroquinina B
E₂: estradiol	NPY: neuropéptido Y.
eCG: gonadotropina coriónica equina	OVX: ovariectomizadas
EM: energía metabolizable	PC: proteína cruda
ERα: receptor de E ₂ alfa	PGFα_2: prostaglandina F α_2
ERβ: receptor de E ₂ beta	POA: área preóptica
FSH: hormona folículo estimulante	POE: péptidos opioides endógenos
GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas	R: amamantamiento controlado
GPR54: receptor de Kp	S: solución salina
hCG: gonadotropina coriónica humana	SNC: sistema nervioso central
i.v.: intravenosa	SOA: sistema olfatorio accesorio
Kiss1: gen de Kp	SOP: sistema olfatorio principal
Kiss1r: receptor de Kp	T: testosterona

INTRODUCCIÓN GENERAL

El anestro postparto es un problema de importancia en las ovejas de sistemas intensivos que se ubican en las latitudes tropicales y subtropicales. Esto se debe a que las ovejas de pelo, como las de la raza Pelibuey, tienen la capacidad para reproducirse a lo largo del año (Arroyo et al., 2007). Sin embargo, el anestro postparto limita el aprovechamiento de dicha capacidad. El conocimiento amplio del origen del problema y la exploración de soluciones ayudaría a implementar estrategias de manejo más efectivas que las actuales.

El anestro postparto es el periodo de tiempo que transcurre desde el parto hasta la primera ovulación y su duración puede afectarse por factores como el amamantamiento, la condición corporal, la estación del año y la involución uterina (Arroyo et al., 2009; Wright et al., 1989). La involución uterina deja de ser una limitante las primeras dos semanas postparto (Rubianes y Ungerfeld, 1993). La condición corporal influye en el comportamiento reproductivo de las ovejas, sin embargo, con una buena alimentación se puede revertir este problema. Finalmente, el amamantamiento es el problema a resolver después de haber controlado los otros factores.

El amamantamiento retrasa el restablecimiento de la actividad ovárica en ovejas Pelibuey (Camacho et al., 2008; Morales-Terán et al., 2011). En la etapa final de la preñez y primeras dos semanas del postparto, la FSH y LH en la hipófisis son bajas debido a la fuerte retroacción negativa de la progesterona y los estrógenos (Gallegos-Sánchez et al., 2009). Pero después de ello la secreción de FSH se normaliza y reinicia el reclutamiento y selección de folículos dependientes de esta hormona (Mandiki et al., 1990; Rubianes y Ungerfeld, 1993). Sin embargo, la secreción pulsátil de LH se encuentra reducida cuando los folículos alcanzan la etapa de preovulatorios (Clarke et al., 1984), por lo que el o los folículos dominantes se atresian. El amamantamiento reduce la frecuencia de secreción de LH (McNeilly, 2001) y como consecuencia inhibe la ovulación (Schirar et al., 1990) y también retrasa la aparición del primer estro postparto (Schirar et al., 1989).

El control del amamantamiento es una práctica de manejo que reduce los efectos del mismo; parece reducir el anestro postparto y mejorar el comportamiento reproductivo

en ovejas y otras especies, tales como los bovinos (Gallegos-Sánchez et al., 1990). Los estudios indican que el control del amamantamiento incrementa el número de ovejas que ovulan, se reduce el tiempo a la primera ovulación (Morales et al., 2004; Pérez-Hernández et al., 2009) y aumenta la tasa de gestación (Camacho et al., 2008).

El efecto macho es otra alternativa que se ha evaluado para inducir el retorno a la actividad reproductiva en ovejas en anestro estacional (Martin et al., 1986) o en anestro postparto (Salloum y Claus, 2005; Morales-Terán et al., 2011). El efecto macho, a través de las feromonas que produce (Fabre-Nys et al., 2015) aumenta la secreción pulsátil de LH en ovejas y como consecuencia ocurre la ovulación en unas horas o días después de la introducción del semental (Martin y Scaramuzzi, 1983; Cruz Espinoza, 2011). Las ovejas en anestro postparto sometidas al efecto macho empiezan a ovular entre las 3 a 4 semanas postparto (Cruz Espinoza, 2011; Montiel-Castelan, 2014).

A mediados de los 90 Lee et al. (1996) descubrieron el gen Kiss1. Éste codifica una proteína de 145 aminoácidos (preprohormona) que pertenece a la familia de las péptido-amidas RF y da origen a una hormona de 54 aminoácidos que fue llamada originalmente kisspeptina 54 o metastina, la cual puede ser dividida enzimáticamente para formar péptidos de 10, 13 y 14 aminoácidos que también llevan el mismo nombre (Kotani et al., 2001). La mutación del receptor de Kp llamado GPR54, en humanos y ratones, ocasiona hipogonadismo, bajos niveles de gonadotropinas e infertilidad (Dungan et al., 2006). Y además, su aplicación exógena por diferentes vías incrementa la secreción de GnRH/LH en ovejas (Caraty et al., 2007). También, en ratas amamantando, la expresión del ARNm de Kiss1 está suprimido, mientras que la aplicación de Kp exógena incrementa la secreción de LH (Yamada et al., 2007). Esta molécula podría estar también involucrada en los efectos del amamantamiento sobre el anestro postparto en ovejas Pelibuey.

REVISIÓN DE LITERATURA

El efecto del amamantamiento en el anestro postparto de ovejas

El anestro postparto es el periodo de tiempo que transcurre desde el parto hasta la primera ovulación y su duración puede ser variable e influida por factores como el amamantamiento, la condición corporal, la estación del año y la involución uterina,

entre otros. Respecto a la duración, Wright et al. (1989) reportaron que ninguna oveja en anestro postparto entró en celo antes del día 20 postparto, pero, el 10 % tuvieron ovulaciones silenciosas.

Causales del anestro postparto

En la etapa final de la preñez y principio del postparto, la FSH y LH en la hipófisis son bajas debido a la fuerte retroalimentación negativa de la progesterona y los estrógenos (Gallegos-Sánchez et al., 2009), asimismo, el estrés y dolor del parto causa la secreción alta de opioides, que se relacionan con la inhibición de secreción de gonadotropinas en el postparto (Smart et al., 1994). Esta baja concentración de LH en el postparto también se relaciona con los bajos depósitos de LH en la hipófisis, que posiblemente se deban a la baja secreción de GnRH o a la reducida sensibilidad de la hipófisis a GnRH (Jenkin et al., 1977) donde al parecer el nivel de receptores en la hipófisis es normal (Clarke et al., 1984). Estos depósitos se recuperan a medida que aumenta los días postparto, ya que, la aplicación de GnRH a ovejas induce una mayor secreción de LH en el día 20 postparto que el 5 (Newton y Edgerton, 1989). Los niveles de GnRH parece no ser el problema, ya que estos son similares a los de ovejas en anestro estacional, las cuales tienen niveles similares a ovejas cíclicas (Clarke et al., 1984). El efecto de la involución uterina parece ser de impacto hasta alrededor de las primeras 2 semanas postparto, que es cuando se ha alcanzado la involución uterina (Rubianes y Ungerfeld, 1993).

La ovulación ocurre hasta que la frecuencia de secreción de LH alcanza alrededor de un pulso cada hora, lo cual estimulará al máximo la producción de estradiol y éste último favorecerá el surgimiento del pico preovulatorio de LH (Gallegos-Sánchez et al., 2009). En el anestro postparto hay secreción de LH reducida debida al efecto inhibitorio del E₂ (Wright et al., 1989) y cuando los niveles de LH/FSH en hipófisis se han recuperado, la ovulación aún se encuentra bloqueada, y parece ser el amamantamiento el responsable (Acosta et al., 1983) si el postparto ocurre en la época reproductiva. Según Williams et al. (1996) existen tres fases en el reinicio de la actividad ovárica cíclica postparto: la primera inicia en el parto y va hasta las 2 o 4 semanas postparto e

involucra el restablecimiento de los niveles de LH en la hipófisis; la segunda fase va desde la 2ª a la 4ª semana postparto e involucra el incremento de la sensibilidad negativa del E₂ por el amamantamiento y la participación de los POE; y la tercera fase implica la reducción del efecto del amamantamiento sobre el eje reproductivo. En la siguiente parte de este capítulo se abordará sólo el efecto del amamantamiento en la longitud se abordará el efecto de amamantamiento en el anestro postparto de ovejas.

Efectos neuroendocrinos del amamantamiento durante el anestro postparto

El establecimiento de la relación madre-cría

El reconocimiento madre-cría inicia en los primeros minutos del parto, mientras la madre limpia a la cría de los restos de placenta y la estimula para consumir calostro. En vacas se ha observado que el contacto vaca-cría por un periodo de 24 h después del parto permite establecer la relación madre-cría de manera permanente (Viker et al., 1993). Este reconocimiento es necesario para que ocurra la inhibición de la secreción pulsátil de LH, ya que por ejemplo, el cambio de la cría propia por una sustituta, no mantiene la inhibición de secreción de LH (Williams et al., 1996). En vacas, una vez hecho el reconocimiento madre-cría, la inhibición de la LH se rompe hasta el destete, ya que inclusive el bloqueo del olfato o la vista la mantiene (Griffith y Williams, 1996). El efecto del amamantamiento es más complejo que la sola estimulación de la succión, ya que por ejemplo, la estimulación única de la glándula mamaria en vacas por medio de calor o electricidad no incrementa la inhibición de LH como ocurre con la presencia del becerro (Cutshaw et al., 1992).

El amamantamiento retrasa el restablecimiento de la actividad ovárica (Camacho et al., 2008; Morales-Terán et al., 2011) y el destete la adelanta (Salloum y Claus, 2005). En vacas, el destete incrementa la frecuencia de secreción de LH 48 h después del destete del ternero (Cutshaw et al., 1992). Sin embargo, también hay estudios que muestran que el periodo de anestro postparto no se ve afectado por el amamantamiento (Mandiki et al., 1990).

Efecto en el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas

Efecto en la FSH

Los niveles de FSH son similares en ovejas amamantando e inclusive en no gestantes (Mandiki et al., 1990). En estudios de dinámica folicular en ovejas postparto se ha encontrado que a partir del día 5 se pueden detectar folículos de entre 2 y 4 mm, y a las 2 semanas folículos preovulatorios, los cuales llegan a esta etapa principalmente por efecto de la FSH (Rubianes y Ungerfeld, 1993). Lo anterior indica que la FSH no limita la maduración folicular en el anestro postparto y que no es la responsable de la duración del anestro postparto (Clarke et al., 1984).

Efecto en LH

La secreción pulsátil de LH es baja durante la gestación y permanece así hasta los primeros días postparto, luego el amamantamiento mantiene la reducción de la frecuencia de secreción de GnRH/LH (Arroyo et al., 2009; Mandiki et al., 1990). Jenkin et al. (1977) evaluaron el efecto de GnRH en ovejas en anestro postparto lactando o sin amamantar y encontraron que el pico máximo de LH fue de 50 % comparado con ovejas cíclicas en las primeras 2 semanas postparto, sin embargo, a partir de la semana 3, el pico fue similar entre las ovejas sin amamantar y cíclicas, mientras que en las lactantes fue de 65 %, y no fue sino hasta la semana 8-10 que se igualó la respuesta (90 %) entre todos los grupos. Estos investigadores atribuyen la respuesta en parte a la baja concentración de LH en la hipófisis que fue de 40 % respecto a las cíclicas en la semana 1-2 y similar para la semana 8. Aparentemente entre los grupos postparto la diferencia la hizo la lactancia. En el estudio de Clarke et al. (1984) encontraron, sin embargo, que los niveles de LH en la hipófisis se restablecen en las primeras 2 semanas postparto en ovejas lactando. En vacas, el amamantamiento incrementa la sensibilidad del hipotálamo al efecto de retroalimentación negativa del E₂ y como consecuencia disminuye la frecuencia de secreción de GnRH/LH (Acosta et al., 1983).

En el anestro postparto de ovejas que amamantan, la frecuencia reducida de LH, más que la concentración o amplitud de un pulso, es la responsable de que no se dé el

suficiente estímulo para causar la ovulación (Clarke et al., 1984). La frecuencia de secreción de LH es afectada por el número de corderos que una oveja amamanta. Esta frecuencia es menor en ovejas que amamantan 2 cordero que uno ($p \leq 0.05$; Poindron et al., 1980).

Efecto del amamantamiento en E_2

Durante el amamantamiento, se incrementa la sensibilidad del hipotálamo al efecto de retroalimentación negativo del E_2 sobre la secreción de GnRH (Gallegos-Sánchez et al., 2009). También, hay evidencia que sugiere que hay menor nivel de estrógenos en sangre y menor crecimiento folicular en ovejas en anestro postparto que en aquellas en el anestro estacional (Clarke et al., 1984). Además, del día 1 al 3 del postparto, hay menor número de receptores E_2 en la hipófisis (Smart et al., 1994).

Ovulación

El pico preovulatorio y la ovulación no ocurre en ninguna oveja en el día 1 postparto como respuesta al estradiol, aún con la aplicación de Naloxone; posiblemente debido a la insuficiencia de LH en la hipófisis y no a la inhibición por los POE (Smart et al., 1994). Sin embargo, según estos investigadores, el pico preovulatorio ocurre, con el estímulo de 50 ug de E_2 , a partir del día 7, independientemente de si las ovejas lactan o no.

En ovejas de pelo amamantando, entre el 21 y 24 % ovulan por primera vez alrededor del día 25 postparto (Montiel-Castelan, 2014) mientras que en otro estudio se encontró que la primera ovulación ocurrió el día 53 ± 4 d (Cruz Espinoza, 2011). La determinación de la primera ovulación la realizaron por medio de progesterona. La primera ovulación postparto pronto se luteiniza, ya que existe pronta liberación de $PGF_{\alpha 2}$ desde el endometrio, debida presumiblemente a la alta secreción de oxitocina inducida por el amamantamiento (Yavas and Walton, 2000).

Los péptidos opioides endógenos

Los péptidos opioides endógenos (POE) se sintetizan por una de 3 familias de genes: proopiomelanocortina, proencefalina o prodinorfina, y uno o más de cada familia tiene

la capacidad de inhibir la secreción de LH (Malven, 1986). Los PEO tienen afinidad por al menos 5 receptores: μ , K , δ , σ , E (Cosgrove et al., 1993) y la aplicación de antagonistas específicos para cada receptor incrementa la secreción de LH en todos los casos, aunque parece ser que el μ tiene el efecto inhibitorio más alto (Dobek et al., 2013).

En las ratas, el amamantamiento incrementa la secreción de β -endorfina, por lo que es posible que los POE puedan inhibir la secreción de LH en especies domésticas durante el postparto (Newton et al., 1988). En ovejas, durante el amamantamiento se incrementa la secreción de β -endorfina al sistema porta hipotálamo-hipofisiario (Gordon et al., 1987). Por otra parte, Connor et al. (1990) observaron que la separación del becerro a los 30 días postparto, por 48 h, disminuye la concentración de β -endorfina en el hipotálamo. La administración de Naloxone (antagonista de opioides) al inicio del periodo postparto, incrementa la secreción pulsátil de LH, no obstante, se desconoce qué tipo específico de POE inhibe (Ahmadzadeh et al., 1998) posiblemente sea la β -endorfina y dinorfina tipo A (Malven, 1986). El efecto de los POE actúa hasta afectar a la GnRH, ya que la administración crónica de morfina en ratas reduce la secreción de GnRH en sistema porta (Malven, 1986).

En el postparto de ovejas amamantando, el Naloxone incrementa la secreción de LH (Lozano et al., 1998), sin embargo, sus resultados arrojaron que el efecto del Naloxone podría ser independiente del amamantamiento, ya que el destete no incrementó la secreción de LH en ese experimento (Newton et al., 1988) contrario a lo que ocurre en las vacas (Malven, 1986), sin embargo, los autores proponen que posiblemente se debió a que el destete por 3 d no fue suficiente para romper el efecto del amamantamiento y generar diferencias (Newton et al., 1998). En otro estudio (Dobek et al. (2013) encontraron que la aplicación de Naloxone incrementó la secreción de LH en todas las ovejas en el experimento, en el momento del amamantamiento o después de este. Los estudios indican que los POE están altamente relacionados con la regulación del efecto del amamantamiento en el anestro postparto.

La leptina

La leptina es un metabolito que se relaciona con el estatus energético en los animales, sobre todo con los depósitos de grasa (Tena-Sempere, 2015). En ratas los niveles bajos de leptina se relacionan con el amamantamiento intenso; sin embargo, esto se debe al balance energético, más que al estímulo del amamantamiento por sí mismo. La leptina parece indicar un bajo nivel energético aun cuando la rata lactando tiene buen nivel de reservas grasas, mientras que el destete aumenta rápidamente los niveles de leptina (Smith y Grove, 2002).

La leptina puede suprimir la síntesis y expresión de ARNm de NPY en el ARC a través de la expresión de receptores en las neuronas que lo producen, mientras que la supresión de la leptina en el amamantamiento incrementa el NPY, por lo que el amamantamiento incrementa la síntesis de NPY en el ARC. Lo importante de estas conexiones es que al parecer el NPY conecta con las neuronas productoras de GnRH y podría ser un regulador del efecto del amamantamiento en el anestro postparto (Smith y Grove, 2002).

Manejo del amamantamiento para reducir el anestro postparto

El manejo del amamantamiento, ya sea por destete temporal, amamantamiento controlado, o el destete total, reduce el estímulo negativo sobre la secreción de gonadotropinas y acorta el periodo de tiempo para que el reinicio de la actividad reproductiva en las ovejas ocurra.

El destete de los corderos a los 7 días postparto y su alimentación con sustituto de leche es una estrategia para reducir el anestro postparto. Con esta estrategia se ha llegado a que 28 % de las ovejas manifiesten estro durante los primeros 30 d postparto y que se reduzcan los días a la primera ovulación, además, se mejora el porcentaje de preñez (76 vs 28 %; $p \leq 0.05$) y prolificidad (1.9 vs 1.4; $p \leq 0.05$) en comparación con el amamantamiento continuo cuando se combina con la aplicación de progesterona y eCG (Camacho et al., 2008). Una desventaja del destete temprano es que hay

detrimento del desarrollo y sobrevivencia de los corderos (Pérez-Hernández et al., 2009).

El amamantamiento controlado consiste en mantener a las crías y las madres en corrales separados, sin contacto físico o visual, y amamantar a las crías por uno o varios periodos cortos de tiempo al día. La separación se realiza una vez que ha ocurrido el reconocimiento materno, el consumo de calostro y que la cría está en condiciones para consumir alimento sólido; generalmente entre los 7 y 10 d de edad. Existe la modalidad de amamantar por 30 min al día. Con este método se ha logrado que el 28 % de ovejas Pelibuey ovulen alrededor de los 30 d postparto contra ninguna con amamantamiento continuo (Ronquillo et al., 2008). También se mejoró la tasa de preñez (72 vs 28 %; $p \leq 0.001$) y la prolificidad (1.9 ± 0.2 vs 1.4 ± 0.2 ; $p \leq 0.05$) comparando con el amamantamiento continuo y combinando estos tratamientos con progesterona y eCG. En otro estudio se encontró que la ovulación a los primeros 56 d postparto (18.8 vs 25.0 %) fue similar entre ovejas con amamantamiento continuo y controlado, pero el amamantamiento controlado redujo los días a la primera ovulación (41.9 vs 52.6; $p \leq 0.05$; Pérez-Hernández et al., 2009).

La modalidad del amamantamiento controlado por 2 periodos de 30 min al día mejora también el comportamiento reproductivo postparto de las ovejas, con la ventaja de que el crecimiento de los corderos es menos afectado en comparación con el amamantamiento por 30 min al día. Al respecto, Morales et al. (2004) reportaron que bajo esta modalidad se incrementó el número de ovejas que ovularon de 70 a 88.8 % ($p \leq 0.05$) y redujo los días a la primera ovulación de 60.5 a 52.6 ($p \leq 0.05$) comprando con el amamantamiento continuo. En otro experimento, Morales-Terán et al. (2011) encontraron que se incrementó también la proporción de ovejas que ovularon, pero, los días a la primera ovulación no fueron diferentes (51.1 vs 56.7). Estos autores no detectaron diferencias en el peso de los corderos entre el amamantamiento restringido y el continuo, ya que los corderos alcanzaban a consumir suficiente leche; asimismo, al momento del destete no se causan los mismos niveles de estrés que se presentan en las madres y crías que amamantan continuamente. En otro experimento, sin embargo,

el peso de los corderos en amamantamiento restringido solo fue similar al continuo del nacimiento hasta el día 41 de edad, y de allí hasta el día 60, el peso de los corderos en amamantamiento continuo fueron superior por 1 kg ($p \leq 0.05$; Castillo-Maldonado et al., 2013).

Hay estudios como el de Mandiki et al. (1990) donde el amamantamiento fue por 15 min, 3 veces al día en ovejas Texel, pero no encontraron diferencias en los días al primer celo (40.4 ± 19.8 vs 44.6 ± 11.8 d; $p > 0.05$), y en la frecuencia de secreción de LH (2.5 vs 2.0 pulsos). Sin embargo, el anestro postparto fue mayor cuando las ovejas parieron en temporada de anestro estacional que en la época reproductiva (75.4 vs 42.5 d; $p \leq 0.05$). El peso de los corderos que se alimentaron 3 veces contra el amamantamiento *at libitum* no fue diferente ($p \leq 0.05$). Además, en este experimento, el número de corderos por oveja no afectó la duración del anestro postparto. Es posible que los resultados se deban a que la frecuencia de amamantamientos fue alta y suficiente para inhibir la secreción pulsátil de LH, además, el efecto negativo se reforzó cuando el anestro postparto coincidió con el estacional.

El efecto macho y su relación con la duración del anestro de ovejas

El efecto macho se descubrió cuando se detectó que la separación y reintroducción de sementales en ovejas en anestro estacional adelantaban la actividad reproductiva (Martin y Scaramuzzi, 1983). Actualmente se sabe que el efecto macho podría ser efectivo en cualquier etapa reproductiva, y en todas las partes del ciclo estral cuando las ovejas se encuentran en época reproductiva (Hawken et al., 2007). En ovejas en anestro estacional el efecto macho causa que se alargue la época reproductiva y se reduzca la de anestro (Rosa y Bryant, 2002). En el anestro postparto también es efectivo, sin embargo, la eficacia se reduce cuando coincide con el anestro estacional (Pearce y Oldham, 1988). En el anestro postparto durante la época reproductiva, el efecto macho es una buena alternativa para inducir el reinicio de la actividad reproductiva (Salloum y Claus, 2005).

El efecto macho se puede utilizar como una estrategia que se ajusta a la filosofía “Limpio, Verde y Ético”, que busca, entre otras cosas, no utilizar sustancias hormonales o químicas en los sistemas de producción (Martin et al., 2004).

Vías de estimulación

El efecto macho ocurre principalmente a través de la emisión de feromonas, pero también se ha descubierto que es importante el contacto físico del semental con la hembra, los estímulos visuales y las vocalizaciones. Por lo tanto, para que el efecto macho se maximice es necesaria la interacción de todas las vías de estimulación (Delgadillo et al., 2009).

El efecto de las feromonas

El efecto macho ocurre principalmente vía feromonas (Martin y Scaramuzzi, 1983). Knight y Lynch (1980) mostraron que untar cera de glándulas sebáceas o la exposición de lana de sementales a ovejas en anestro estacional, induce la ovulación, pero esto no ocurre cuando se usa orina. En otro experimento, la exposición a lana también indujo la ovulación (Knight et al., 1983). Se concluyó que las sustancias que ejercen el efecto macho se secretan por la piel y que se impregnan en la lana, al menos en ovinos.

No obstante que se han identificado compuestos de ácidos grasos mezclados, no se ha logrado aislar las feromonas o sustancias exactas responsables del efecto macho (Rosa y Bryant, 2002). Después de muchos ensayos sin resultados positivos, se ha llegado a proponer que tal sustancia podría ser derivada de la fermentación bacteriana de exudados de la piel que se impregnan en la lana (Hawken y Martin, 2012).

Una feromona se puede definir como una sustancia o pocas sustancias bien identificadas que inducen una respuesta programada no aprendida, específica, no sustituible, y casi estrictamente para una especie (Martin et al., 1986). En este sentido, el término feromona no se ajusta a las características de las sustancias que ejercen el efecto macho, ya que no se han identificado las sustancias exactas, no se sabe si son

específicas y parece ser que el aprendizaje está involucrado (Hawken y Martin, 2012; Martin et al., 1986).

Mecanismo involucrado

En las ovejas las feromonas parecen actuar por uno o ambos sistemas olfatorios: el sistema principal y/o el accesorio, los cuales proyectan conexiones neuronales hacia el hipotálamo (Martin y Scaramuzzi, 1983). El sistema olfatorio principal (SOP) recibe estímulos de la mucosa olfatoria y conecta con el SNC vía bulbos olfatorios principales, los cuales proyectan hacia la corteza olfatoria, y posteriormente a la amígdala y el fórnix para llegar hasta el POA (Martin et al., 1986). El sistema olfatorio accesorio (SOA) recibe información del órgano vomeronasal (órgano de Jacobson) que lleva impulsos al SNC a través de los bulbos olfatorios accesorios (Martin et al., 1986), luego el impulso cruza la amígdala, a la estría terminalis, el núcleo *Bed*, y finalmente al POA.

En ovejas el SOP es el más importante en la transmisión del efecto macho, ya que el daño del bulbo olfatorio accesorio no impide el efecto macho (Cohen-Tannoudji et al., 1989), pero la destrucción del SOP sí reduce la respuesta al efecto macho (76 vs 23 % de ovulaciones; $p \leq 0.05$; entre testigo y anósmicas), y el SOA no puede suplir esta función, por lo que se confirma la preponderancia del SOP en el control del efecto macho vía feromonas (Gelez y Fabre-Nys, 2004). También, la inactivación del núcleo cortical de la amígdala, que es la vía de transmisión de impulsos nerviosos del SOP, inactiva la respuesta de las ovejas al efecto macho (Hawken y Martin, 2012).

El SOP en ovejas parece estar implicado en las reacciones que implican aprendizaje o cognitivas (Cohen-Tannoudji et al., 1989), mientras que el accesorio en las reacciones rápidas; posiblemente sea la primera vía en el primer contacto hembra-macho y posteriormente ceda su lugar al SOP; este último es más evolucionado considerando las especies en las cuales es o no funcional (Gelez y Fabre-Nys, 2004). Por otra parte, el hipocampo también parece estar involucrado en el aprendizaje y las interacciones hembra-macho, posiblemente mediado por el incremento de LH y estradiol inducidos por el efecto macho (Hawken et al., 2009).

La forma específica por la cual el estímulo del efecto macho llega hasta las neuronas GnRH es aún desconocido, pero cabe la posibilidad de que las kisspeptinas estén involucradas, ya que estas se activan con la introducción de tal estímulo (Fabre-Nys et al., 2015). Las kisspeptinas, en conjunto con la dinorfina y la neuroquinina, en el ARC, median el efecto de las feromonas sobre la secreción de GnRH (Hawken y Martin, 2012). Una prueba de ello es que la aplicación de antagonistas a Kp una hora antes de la introducción del macho bloquea el incremento de la secreción de LH.

El contacto directo macho-hembra

La sola exposición de las ovejas a las feromonas del macho incrementa la secreción pulsátil de LH y la ovulación en un porcentaje de estas, sin embargo, el contacto directo hembra-macho es más efectivo, ya que convergen las feromonas, el contacto físico, visual y auditivo (Fabre-Nys et al., 2015). Con ello se estimula una mayor proporción de ovejas a ovular (95, 70, 8 %; $p \leq 0.01$) en comparación con sólo las feromonas o sin efecto, respectivamente (Pearce y Oldham, 1988).

La efectividad del efecto macho con contacto directo hembra-macho está altamente relacionada con la libido del macho (Rosa y Bryant, 2002), y la libido por su parte depende del nivel de testosterona, y la testosterona afecta la cantidad de feromonas producidas (Hawken y Martin, 2012). En el anestro estacional, los machos con libido alta (tratados con testosterona) inducen mayor proporción de ovulaciones que machos con baja libido (95 vs 78 %; $p \leq 0.02$; Perkins y Fitzgerald, 1994); lo mismo sucede cuando las ovejas además se encuentran lactando (30 vs 17 %; $p \leq 0.05$; efecto macho por 4 d), pero la respuesta es menor, y no se mejora con el destete por 24 h (24 vs 20 %; $p > 0.05$; Signoret et al., 1982). La mayor efectividad de los machos con libido alta se debe a que los eventos de cortejo son mayores que los de baja libido (Perkins y Fitzgerald, 1994), aunque también puede ser debido a la mayor producción de feromonas.

Una de las teorías de la efectividad del efecto macho en contacto directo con las hembras es que causa la ovulación debido al estrés que genera la el contacto, sin embargo Gelez y Fabre-Nys (2004) encontraron que el efecto de la introducción del

macho no es estrés, sino lo contrario. Hay menor proporción de ovejas que se acercan al macho con las orejas hacia atrás, menores bramidos y mayor número de ovejas que se mueven en dirección al macho en comparación con el uso de lana de oveja como estímulo ($p \leq 0.05$).

Los estímulos visuales

Las imágenes de machos proyectadas a ovejas anéstricas ejercen incremento de LH. Se ha logrado inducir actividad reproductiva por efecto macho en ovejas desprovistas de los bulbos olfatorios con la sola presencia del macho, mientras que el uso de la lana sola no lo logra; aunque en esto podría estar involucrada la experiencia de las hembras cuyo aprendizaje predispuso a la respuesta sexual (Martin et al., 1986). En el estudio realizado por Pearce y Oldham (1988) encontraron que el 45 % de ovejas que tuvieron contacto visual con macho vía una reja ovularon, comparado contra el 13 % en aquellas sin contacto ($p \leq 0.05$). Esto indica que los estímulos visuales en el efecto macho son complementario al efecto de las feromonas y contacto macho-hembra.

El efecto en el eje reproductivo

La frecuencia de LH

En las hembras ovinas el efecto macho incrementa la frecuencia y amplitud de los pulsos de secreción de LH en los primeros 10 min del contacto (Martin et al., 1980; Poindron et al., 1980). Esta respuesta es variable y puede ser baja (con cambio de frecuencia de secreción de LH pero sin ovular), media (cambio de frecuencia, alta amplitud y ovulación) y alta (con alta frecuencia, amplitud similar a animales con pico preovulatorio y ovulación; Martin et al., 1980). En un estudio con ovejas primerizas, por ejemplo, la frecuencia de secreción pulsátil de LH fue de 0.96 pulsos h^{-1} con efecto macho contra 0.33 pulsos h^{-1} en las testigo (Knights et al., 2002); además, el cambio de frecuencia lleva al cambio en la concentración de LH en sangre (Hawken et al., 2009). La frecuencia de secreción de LH se mantiene alta por al menos 12 h, pero la amplitud empieza a caer 2 h después (Martin y Scaramuzzi, 1983).

En un principio, la amplitud de los pulsos de secreción de LH, causados por el efecto macho, no es importante en la ovulación, ya que animales con frecuencia de LH alta

ovulan, en comparación con los que tienen baja frecuencia, indistintamente de la amplitud de los pulsos (Martin et al., 1986). En ese sentido, Knights et al. (2002) encontraron que ovejas con frecuencia de secreción de LH alta (7.7 ± 0.5 pulsos en 8 h) ovularon en 100 % de los casos, mientras aquellas con frecuencia baja no ovularon (2.7 ± 0.8 pulsos) aun con la amplitud de los pulsos de LH similar en ambos grupos (4.5 ng mL^{-1} ; $p > 0.05$).

El pico preovulatorio de LH

El pico preovulatorio de LH en ovejas en anestro estacional con el efecto macho puede ocurrir alrededor de las 30 h después del primer contacto con el macho (Martin y Scaramuzzi, 1983) cuando el estímulo producido es suficiente. Esto coincide con lo reportado por Oldham et al. (1979) quienes obtuvieron que el inicio del pico preovulatorio ocurrió a las 27 h de inicio del efecto macho. El pico preovulatorio con el efecto macho es resultado del estímulo de la producción de estradiol a nivel ovárico, ya que un pulso de LH es capaz de inducir un pulso de secreción de estradiol (Martin y Scaramuzzi, 1983). La presencia frecuente del macho es necesaria hasta lograr el pico preovulatorio, porque el retiro del estímulo antes de tiempo reduce nuevamente la frecuencia de secreción de LH (Martin et al., 1986).

La longitud del ciclo estral y presentación de estros

Aproximadamente la mitad de las ovejas que ovulan por primera vez con el efecto macho tienen un ciclo estral corto de aproximadamente 6 d (Lassoued et al., 2004). La siguiente ovulación, que también es sin manifestación de estro, ocurre aproximadamente a los 6 d después, y tiene una duración normal de 17 d, la tercera ovulación ocurre ya con manifestación de estro (Martin y Scaramuzzi, 1983). La otra mitad de las ovejas tienen el primer ciclo estral de longitud normal, y la primera manifestación de estro se observa 17 a 18 días después de la primera ovulación, en el segundo ciclo estral, unos 24 o 25 días después de la introducción del macho. Es posible que el porcentaje de ciclos cortos en un rebaño se vea afectado por la libido de los machos utilizados, Perkins y Fitzgerald (1994) reportaron que el porcentaje de celos

cortos fue de 18 y 40 % cuando el macho fue de libido alta contra baja, respectivamente.

La aplicación de una dosis de progesterona antes de la introducción del macho evita los ciclos cortos, pero sólo un tratamiento con progesterona por alrededor de 10 d antes del macho provoca un ciclo estral normal, con manifestación de estro en la primera ovulación (Martin et al., 1986). Aparentemente el efecto de la progesterona en la prevención de los ciclos cortos se debe a que retrasa el pico preovulatorio y da tiempo suficiente al eje reproductivo para prepararse para la ovulación (Martin y Scaramuzzi, 1983). Los ciclos cortos también podrían deberse a la formación de cuerpos lúteos con reducida capacidad para producir progesterona (Martin et al., 1986). En ese sentido, Cushwa et al. (1992) encontraron que el 82 % de ovejas que ovularon con efecto macho tuvieron $< 0.50 \text{ ng mL}^{-1}$ de progesterona; tal concentración se considera para diagnosticar ausencia de un CL, sin embargo, se confirmó la presencia de los mismos por laparoscopia.

En ovejas en anestro con 14 d postparto, el efecto macho induce la ovulación unos días después; sin embargo, la manifestación de estro ocurre entre 49 y 79 d postparto; a medida que avanzan los días postparto la velocidad de la respuesta manifestada en la ovulación incrementa, pero se reduce el intervalo entre la primera introducción del macho y el estro (Geytenbeek et al., 1984). En otro estudio, alrededor del 60 % de ovejas con efecto macho presentaron estro al día 40 postparto (Lassoued et al., 2004).

Ovulación

En los primeros estudios sobre el efecto macho en anestro estacional de ovejas se encontró que alrededor de la mitad ovulaban los primeros días post introducción (Martin et al., 1980; Martin y Scaramuzzi, 1983). Esto concuerda con lo encontrado por Oldham et al. (1979) donde el 48 % ovularon en las primeras 96 h de iniciado el efecto macho. Por su parte Knight et al. (1978) encontraron que entre el 39 y 70 % ovulaban entre las 65 y 72 h del inicio del efecto macho. Además, demostraron que la presencia de folículos grandes y pequeños no fue diferente respecto a las ovejas sin efecto macho,

por lo que coincide con que el anestro estacional no causa inactividad ovárica sino falta de ovulación por la supresión de la secreción pulsátil de LH.

En el anestro postparto de ovejas, el efecto macho también induce la ovulación, sin embargo la respuesta es más lenta, y es en función de los días postparto, como se muestra en el estudio de Geytenbeek et al. (1984). Ellos encontraron que el porcentaje de ovulación fue 0, 35, 52 y 73 para ovejas expuestas a efecto macho (diagnosticadas por laparoscopia 4 d después del contacto) con 14, 28, 35 y 45 d postparto, respectivamente. Aunque esto no concuerda con lo encontrado por Lassoued et al. (2004) quienes reportaron 75 % de ovulaciones al día 20 postparto con efecto macho de manera continua. En ovejas de pelo en anestro postparto y amamantando, el efecto macho indujo la ovulación del 100 % de las ovejas contra 83 % en las testigo; la primera ovulación se logró alrededor del día 35 o 53, respectivamente ($p \leq 0.01$; Cruz Espinoza, 2011). Mientras que en otro estudio se encontró un 64.8 vs 35.7 % de ovejas que ovularon, con 50 y 56 d a la primera ovulación, con o sin efecto macho, respectivamente ($p \leq 0.05$).

En general, la introducción del macho induce la ovulación en las primeras horas postintroducción (Martin y Scaramuzzi, 1983), pero hay casos donde el macho estimula de manera gradual durante varios días la maduración folicular y la posterior ovulación (Delgadillo et al., 2009). Para que ocurra la ovulación es necesaria la presencia continua del macho hasta que esta se dé; a mayor tiempo de contacto hembra-macho, mayor proporción de hembras que ovulan (Pearce y Oldham, 1988; Rosa y Bryant, 2002). La presencia del macho por 2 o 3 h induce el incremento transitorio de LH, pero no la ovulación, y ocurre el retorno al anestro 24 h después (Cohen-Tannoudji y Signoret, 1987), pero por 8 o 24 h induce la ovulación en al menos el 20 % de ovejas en anestro postparto, mientras que por 4 d la causa en el 50 %, y por 15 d lo lleva al 61 % (Signoret et al., 1982). Así mismo Knight et al. (1983) mostraron que con 2 d de estímulo se logró un 47 % de ovulaciones y 75 % con 5 d.

El incremento de secreción de LH debido al efecto macho es acompañado del aumento en la secreción de estradiol (Hawken et al., 2009). Cuando se introduce el macho,

existen ovejas con sólo folículos pequeños (< 4 mm), y por lo tanto el efecto macho no es efectivo en este caso, sino hasta que se induzca el crecimiento de los folículos a tamaño preovulatorio (Fabre-Nys et al., 2015).

Factores que influyen en la respuesta al efecto macho

Aislamiento previo y el cambio de machos

La necesidad del aislamiento previo macho-hembra para la respuesta al efecto macho (Martin et al., 1986) y la existencia de un periodo refractario a la reintroducción de los machos es debatible (Delgadillo et al., 2009). Es probable que el aislamiento previo de la hembra-macho no sea necesario para que ocurra la respuesta al efecto macho (Cushwa et al., 1992), tal como lo mostró el estudio de Lassoued et al. (2004) quienes encontraron que 100 % de ovejas en anestro postparto, con efecto macho desde el parto, ovularon 30 d antes que las ovejas sin macho. Por su parte, Cohen-Tannoudji y Signoret (1987) encontraron que la reintroducción de machos por 3 h a las 2 semanas, 5 d ó 1 d después del primer contacto, no afectó la secreción de LH.

El contacto continuo de ovejas con machos por largos periodos reduce el efecto macho, pero el cambio de macho reinicia el estímulo debido a la novedad (Rosa y Bryant, 2002). En el estudio de Hawken et al. (2009) encontraron que el efecto macho continuo no aumenta la frecuencia de secreción de LH (0.26 ± 0.04 pulsos de LH/ 6 h), sin embargo, basta con introducir machos nuevos al grupo de ovejas (sin necesidad de aislar por algún periodo de tiempo) para que la respuesta incremente (0.87 ± 0.06 pulsos de LH/ 6 h; $p \leq 0.05$). En un grupo de ovejas en anestro estacional que quedaron sin ovular después de 65 d de contacto con machos, el 90 % ovularon después de 4 d de contacto con machos nuevos (Pearce y Oldham, 1988). En contraste, en ovejas postparto lactando pre tratadas con progesterona, el porcentaje de estros fue mayor (84 vs 20 %; $p \leq 0.01$) cuando se mantuvieron aislados macho-hembra antes del efecto macho que con la presencia continua desde antes del parto (Wright et al., 1989). Los autores no encontraron una respuesta lógica. Sin embargo, en un trabajo posterior por los mismos autores y bajo circunstancias similares obtuvieron igual proporción de celos entre ovejas con aislamiento o sin este (Wright et al., 1990).

La introducción de machos nuevos parece mantenerse en la memoria de las hembras vía proliferación celular en el hipocampo, y regulada por la LH y E₂, y dictará la respuesta de las hembras en futuros contactos con los mismos machos (Hawken et al., 2009).

La raza en el anestro de las ovejas

La eficacia del efecto macho varía entre razas y dentro de razas o grupos de animales (Martin y Scaramuzzi, 1983; Pearce y Oldham, 1988). Las razas altamente estacionales sólo responden al efecto macho en los últimos días del periodo de anestro, mientras que las menos estacionales pueden responder aún en medio de la temporada de anestro (Martin et al., 1986). En la raza Merino, el efecto macho es efectivo siempre, sin embargo, en la Suffolk, este funcional sobre todo al final de la época reproductiva y al principio de esta (Martin et al., 2004). La raza Awassi, que se caracteriza por ser lechera y de alta habilidad materna, es una de las que se tienen reportes que indican que el efecto macho no induce la actividad reproductiva cuando se aplica en el anestro postparto, aun cuando las ovejas no están amamantando a sus crías (Hamadeh et al., 2001).

La experiencia con estímulos previos

El SOP proyecta hacia áreas responsables del análisis cognitivo de los estímulos que percibe el animal o de experiencias pasadas, antes de llegar al área que controla la secreción de LH y es posible que la experiencia podría estar involucrada en el efecto macho (Cohen-Tannoudji et al., 1989). Se ha comparado la respuesta al efecto macho entre ovejas con y sin experiencia previa con los machos y se encontró que en ovejas sin experiencia no se activó la secreción de LH, contrario a las ovejas experimentadas; por lo que la experiencia podría estar afectando el significado que las ovejas asignan al olor de los machos (Gelez y Fabre-Nys, 2004). Por el contrario, no se encontró efecto de la experiencia previa con machos en los perfiles de secreción de LH de ovejas jóvenes en anestro estacional; sólo en variables relacionadas con la capacidad de las experimentadas para interactuar con los machos, por lo que esta parece ser importante en las ovejas multíparas (Hawken et al., 2008).

El amamantamiento

Cuando se comparan ovejas en anestro postparto y anestro estacional, las primeras ovulan en menor proporción debido a la profundidad del anestro (Pearce y Oldham, 1988). Pero aun así, el efecto macho en ovejas en anestro postparto lactando, responden bien al efecto macho (84 vs 0 % de estros a los 27-44 d postparto con pre tratamiento de progesterona; $p \leq 0.01$; Wright et al., 1989) con separación previa hembra-macho con estimulación continua, pero con rotación de machos (Wright et al., 1990). Las ovejas lactando empiezan a ovular durante los primeros 3 d del inicio del efecto macho (Poindron et al., 1980).

Nutrición

La alimentación restringida reduce la expresión del estro de ovejas postparto (20-37 d), pre-tratadas con progesterona, con efecto macho en comparación con una alimentación óptima (Wright et al., 1990); probablemente debido a la reducción de la sensibilidad del hipotálamo al estradiol o a la baja producción del mismo, sin embargo, la proporción de ovejas que ovularon fue similar. Más aún, cuando el efecto macho se llevó a cabo de manera continua (sin periodo de aislamiento), la restricción alimenticia redujo tanto el % de ovulación como la expresión de estros (Wright et al., 1990). Por otro lado, un plan de nutrición en ovejas en anestro postparto que indujo una pérdida de peso del 12 % en 30 d no causó cambios en la frecuencia de secreción de LH en comparación con las bien alimentadas (Lozano et al., 1998).

La kisspeptina y su efecto en la reproducción de los ovinos

Anatomía de la kisspeptina

La kisspeptina

La búsqueda de genes inhibidores de la metástasis del cáncer llevó al descubrimiento del gen Kiss1 por (Lee et al., 1996). Según sus descubridores, el gen Kiss1 se expresa en tejidos con cáncer y también en los sanos. Este codifica una proteína de 145 aminoácidos (preprohormona) que pertenece a la familia de las péptido-amidas RF y da origen a una hormona de 54 aminoácidos que fue llamada originalmente kisspeptina 54 o metastina, la cual puede ser dividida enzimáticamente para formar péptidos de 10,

13, 14 aminoácidos que también llevan el mismo nombre (Kotani et al., 2001). Los últimos 10 aminoácidos de las Kp contienen la parte con el poder biológico (desde el aminoácido 112 al 121) llamada terminal C, que es responsable de la alta afinidad y activación de su receptor (Caraty et al., 2012; Kotani et al., 2001). La terminal C se mantiene prácticamente sin cambios entre las especies estudiadas hasta ahora (humanos: YNWNSFGLRF, ovinos: YNWNSFGLRY, bovinos: YNWNSFGLRY, pollos: YNWNSFGLGY; todas con la terminal NH₂; Caraty y Franceschini, 2009). La equivalencia en peso de la Kp-10 de humanos es 1µg=0.77 nmol (Ezzat Ahmed et al., 2009).

El receptor de las Kp es conocido como receptor 54 de proteína-G-acoplada o GPR54 (Kotani et al., 2001); también se le llama Kiss1r. Asimismo, se ha descubierto que la Kp puede actuar como agonista del receptor GPR147 (con efecto inhibitorio general de la actividad celular), el cual se expresa en un gran número de neuronas GnRH; pero, sus efectos aún están siendo estudiados (Beltramo et al., 2014).

Localización de las neuronas Kp

La localización de neuronas Kp se ha realizado principalmente por hibridación *in situ*, para detectar la expresión de ARNm de Kiss1, y por inmunohistoquímica, a través del método de fluorescencia o histoquímica para observar los péptidos Kp (Lehman et al., 2010b).

En ovejas se ha demostrado la existencia de grandes poblaciones de cuerpos celulares de Kp en el área preóptica (POA) y en el núcleo arcuato (ARC; Smith et al., 2007). A diferencia de los ratones, las ovejas aparentemente no tienen neuronas Kp en contacto directo con el tercer ventrículo; área densamente poblada por Kp en ratones y que corresponde al núcleo anteroventral periventricular (AVPV; Lehman et al., 2010b). La mayor concentración de células Kp es en el ARC, con aproximadamente 400, mientras que en el POA es de alrededor de 100 (Franceschini et al., 2006; Lehman et al., 2010b). En ratones es también en el ARC donde hay mayor concentración de neuronas inmunoreactivas a Kp (Clarkson y Herbison, 2006). Igualmente, se han demostrado gran número de proyecciones neuronales de Kp hacia la región interna y externa de la

eminencia media, y en aparente contacto con pequeños capilares sanguíneos (Franceschini et al., 2006) donde las proyecciones de las neuronas GnRH terminan en el sistema porta hipotálamo hipofisiario.

Contacto de neuronas Kp con GnRH

Parece ser, aunque no se ha demostrado completamente, que las neuronas Kp tienen sinapsis con las neuronas GnRH (Dungan et al., 2006; Lehman et al., 2010b). Por inmunofluorescencia se ha observado aposición de neuronas Kp con GnRH (Clarkson y Herbison, 2006). Aunado a ello, se ha demostrado la presencia del Kiss1r en neuronas GnRH del POA (Messenger et al., 2005). También, el ARC proyecta terminaciones nerviosas hacia el área interna de la eminencia media y al parecer estimula allí la secreción de GnRH (Jeremy T. Smith et al., 2011).

Regulación del estradiol en la kisspeptina y GnRH

Parece ser que los esteroides regulan la secreción de Kp a través de la expresión de los distintos receptores en dichas neuronas. El sentido de esta regulación depende de los niveles de los esteroides y de si el efecto ocurre a nivel POA o ARC (Smith et al., 2014). Es posible que la Kp sea intermediaria del efecto de retroalimentación negativa del E₂ en las neuronas GnRH en el ARC, ya que el incremento de este inhibe la actividad de las Kp, mientras que su disminución estimula a las neuronas Kp (Smith et al., 2006). En ratones, en el ARC el E₂ reduce el número de células que expresan ARNm Kiss1 y la cantidad de ARNm Kiss1 que expresa cada célula, mientras que en el AVPV ocurre lo opuesto (Smith et al., 2005a).

Receptores de E₂ en neuronas Kp

Se ha demostrado que los esteroides regulan la expresión del ARNm Kiss1 en los sitios de producción de Kp en el cerebro (Dungan et al., 2006). Las células que expresan ARNm ER α se pueden ubicar en la POA, ARC, AVPV, entre otras (Smith et al., 2005a). En ratones, en el AVPV y ARC casi la totalidad (98.7 % a 99.8 %) de las neuronas que expresan ARNm Kiss1, también expresan ARNm ER α (Smith et al., 2005a, 2005b). Por inmunofluorescencia se encontró que en ovejas el 93 % de neuronas Kp en el ARC expresan ER α , mientras que el 50 % de neuronas Kp lo expresan en el POA

(Franceschini et al., 2006). También, del 25 % al 30 % de las células que expresan ARNm Kiss1 lo hacen con ARNm ER β (Smith et al., 2005a). Sin embargo, parece ser que en la hembra el ER α regula la secreción de Kp en el ARC y AVPV, mientras que ER β juega un papel no crucial o hasta ahora no descubierto (Smith et al., 2006).

Acción diferenciada de los esteroides en las Kp en el ARC y POA

El E₂ en AVPV aumenta la secreción de Kp, mientras que en las neuronas del ARC inhibe la producción de Kp (Clarkson y Herbison, 2006; Smith et al., 2006). Los mecanismos moleculares por medio de los cuales el E₂ produce efectos opuestos en la expresión de Kiss1 en el ARC y AVPV son desconocidos (Caraty y Franceschini, 2009). En ovejas la concentración de E₂ (OVX o implante con E₂) no modifican el número de células que expresan ARNm de Kiss1 ni la cantidad de ARNm producido por célula, pero sí ocurre reducción de la cantidad de ARNm en el ARC; por su parte la OVX tiene efecto inverso en este núcleo, lo cual podría indicar que tanto el efecto positivo como negativo del E₂ se repercuten en el ARC; posiblemente en distintas regiones de este núcleo (Smith et al., 2007). Se sabe que el E₂ actúa en el área retroquiasmática lateral, que contiene el núcleo A15 (Thiery et al., 1989). El A15 contiene neuronas dopaminérgicas que son reguladas por el E₂ en función del fotoperiodo; además, las neuronas dopaminérgicas proyectan axones a las neuronas Kp del ARC que expresan receptores D2 (80 % de receptores D2 en época de anestro estacional; (Goodman et al., 2012), por lo que esta podría ser la forma en que el E₂ regula a la Kp y GnRH/LH, al menos durante el anestro estacional. También, las neuronas Kp del ARC muestran altos niveles de activación (expresión de fos; marcador de activación neuronal) al momento del pico preovulatorio, por lo que el ARC podría estar involucrado en la regulación de este (Smith et al., 2009). Una posible explicación de la doble acción del E₂ en esa área es que el efecto de retro acción negativo sea constante a través del tiempo y estados reproductivos, mientras que el positivo sea intermitente; es decir que mientras el estradiol a niveles bajos inhibe la secreción de Kp/GnRH/LH, el aumento repentino de este activa Kp/GnRH/LH y ocurre el pico preovulatorio (Smith et al., 2014).

El estímulo de la kisspeptina en el eje reproductivo

La mutación del receptor GPR54, en humanos y ratones, ocasiona hipogonadismo, baja concentración de gonadotropinas e infertilidad (Dungan et al., 2006). En estudios se encontró que la aplicación de Kp exógena en ratas con GPR54 normal, indujo el incremento de FSH y LH, mientras que esto no ocurrió en las ratas con disfunción del GPR54 (Messenger et al., 2005). Esto llevó a pensar que la funcionalidad de Kp/GPR54 es crucial para el mantenimiento normal de la actividad reproductiva (Dungan et al., 2006; Smith et al., 2006).

Forma de acción de la kisspeptina en la secreción de gonadotropinas

El efecto de la Kp sobre la secreción de gonadotropinas parece ocurrir a través de GnRH, ya que la aplicación de antagonistas de GnRH bloquea totalmente la secreción de gonadotropinas (Caraty et al., 2012; Smith et al., 2006). Además, el antagonista p234 de Kp de igual forma bloquea la secreción de LH y FSH, y evita el pico preovulatorio de LH en ratas (Pineda et al., 2010). La dependencia de la Kp en la GnRH en la secreción de gonadotropinas parece clara (Smith et al., 2006), sin embargo, hay estudios que muestran que la Kp induce la secreción de LH y FSH en cultivos celulares de hipófisis (Gutiérrez-Pascual et al., 2007; Suzuki et al., 2008), y aún más, que podrían estar actuando a nivel ovárico (Caraty et al., 2012).

La Kp aplicada vía periférica, aparentemente no cruza la barrera hematoencefálica, y entonces su efecto podría ocurrir en el ARC, el cual es accesible a las hormonas circulantes, pero también es posible que las dendritas de las células GnRH se prolonguen hasta afuera de la barrera hematoencefálica (Franceschini et al., 2006; Thomson et al., 2004). Además, existe la posibilidad de que la Kp vía periférica estimule directamente la secreción de gonadotropinas en la hipófisis (Suzuki et al., 2008).

Una vez que la Kp se une a su receptor, estimula la movilización de Ca^{2+} al interior y desde el interior de las neuronas GnRH como respuesta al estímulo; el Ca^{2+} intracelular liberado como respuesta a la Kp estimula la apertura de canales iónicos de la neurona GnRH y con ello la entrada no selectiva de cationes, que lleva a la despolarización de

la neurona (Beltramo et al., 2014); también ocurre la producción de fosfatidil inositol (Kotani et al., 2001).

Efecto de la Kp en la secreción de gonadotropinas

La Kp aplicada de manera central (intracerebroventricular) o periférica (vía sanguínea principalmente) estimula la secreción de GnRH, LH y FSH (Smith et al., 2006). En ovejas, esto ocurre dentro de los primeros 10 a 20 min (Caraty et al., 2007; Messenger et al., 2005). El origen (de humano, ovino, ratón, etc.) de la Kp o el tamaño de la molécula (Kp-10, Kp-54, etc.) no tienen efecto significativo en el estímulo que ejercen en la secreción de gonadotropinas (Caraty et al. 2007) por lo cual, se podría aplicar Kp de cualquier origen y longitud sin afectar los resultados.

Efecto en GnRH

La Kp induce la secreción de GnRH, ya que aplicada vía exógena estimula el incremento de GnRH con cada aplicación, y además, cada pico de secreción de GnRH estimula un pulso de LH y el incremento de FSH (Caraty et al., 2007). Cuando la Kp se aplica por infusión, el incremento de secreción de GnRH y LH también ocurre, sin embargo, la secreción de GnRH persiste por un tiempo después del final de la aplicación de Kp (Messenger et al., 2005).

Efecto en la LH

La Kp estimula la secreción de LH después de aplicada por vía *i.c.v.* o vía *i.v.* (Thompson et al., 2004; Caraty et al., 2012) por infusión continua o por inyecciones (Caraty et al., 2012). Independientemente del método de aplicación y de la dosis de Kp usada, el incremento de la secreción de LH ocurre en los primeros 10 a 15 min postaplicación (Messenger et al., 2005; Caraty et al., 2007).

La amplitud del incremento en la secreción de LH es dependiente de la dosis de Kp aplicada. En ese sentido, Caraty et al. (2007) determinaron que, en ovejas en anestro postparto, una dosis de 25 nmol indujo más de 2 ng mL⁻¹ de LH, mientras que la de 6.2 alcanzó 1.5 ng mL⁻¹, y la de 1.6 apenas alcanzó 0.5 ng mL⁻¹; cada dosis fue aplicada en

una sola inyección. También, cuando la Kp se aplica como infusión, una dosis de 15.6 ng/h indujo un pico medio máximo de 2.8 ng mL⁻¹ (Sébert et al., 2010).

La aplicación de una dosis de Kp por inyección induce el incremento de secreción de LH que alcanza un máximo, e inmediatamente empieza a caer. Esto podría deberse a la baja vida media de la Kp, que en el caso de la Kp-54 se reporta que es de aproximadamente 28 min, y podría ser menor en Kp de cadena más corta (Dhillon et al., 2005). La creación de análogos a Kp podría ser de gran ayuda en la solución del problema de la vida media de la Kp. El estímulo sobre la secreción de LH dura entre 2 y 3 h, y es dependiente de la dosis aplicada (Caraty et al., 2007; Redmond et al., 2011). En contraste, cuando la Kp se aplica por infusión continua o inyecciones repetidas, el estímulo de la secreción de LH se mantiene hasta el fin del tratamiento (Caraty et al., 2012), pero en el caso de las inyecciones repetidas, estas deben darse por lo menos cada hora (Redmond et al., 2011). A pesar de que la aplicación de Kp se haga por infusión o inyecciones repetidas, ocurre una caída en la amplitud de la respuesta (Caraty et al., 2007), posiblemente por sobre estimulación del sistema. La treonina kinasa 2 parece estar relacionada con la desensibilización del GPR54 al competir por el sitio de unión de la proteína G_q (segundo mensajero en la asociación Kp/GPR54) con GPR54 (Beltramo et al., 2014). También podría deberse a la retroalimentación negativa del E₂ al principio del estímulo de Kp, ya que la producción inicial de E₂ debida a Kp es baja (Sébert et al., 2010).

La Kp induce el cambio de la frecuencia de secreción de LH en ovejas. El estudio realizado por Redmond et al. (2011) da sustento a ello. Estos investigadores usaron como unidad experimental a ovejas prepúberes y les aplicaron cada hora, durante 24 h, 20 µg de Kp. El primer pulso de secreción de LH en ovejas con Kp ocurrió dentro de los 15 min post Kp. La frecuencia de LH fue superior en ovejas con Kp en comparación con las testigos (6.0±0.0 vs 3.0±0.7; pulsos/6 h). La amplitud de los pulsos fue también mayor en las ovejas con Kp (5.3±0.4 vs 3.1±0.4; en ng mL⁻¹).

A pesar de la reducción de la respuesta en la secreción de LH, el estímulo producido por Kp en GnRH/LH es suficiente para lograr activar el efecto de retroacción positivo

del estradiol y el pico preovulatorio de LH (Caraty et al., 2009). La aplicación de Kp por al menos 24 h y una dosis de alrededor de 20 µg por hora, estimula el pico preovulatorio de LH en alrededor del 80 % de las ovejas (Smith et al., 2014). El inicio del pico preovulatorio en ovejas en anestro estacional tratadas con Kp ha ocurrido entre 21 y 27 h del comienzo del tratamiento, y la máxima concentración de LH en pico preovulatorio ha ido de 40 a 60 ng mL⁻¹ (Caraty et al., 2007; Sébert et al., 2010). En ovejas prepúberes inicio del pico ha ocurrido a las 21±2 h, mientras que la máxima concentración de LH ha sido de 22±13 ng mL⁻¹ (Redmond et al., 2011).

El inicio del pico preovulatorio en ovejas tratadas con Kp en el anestro estacional o prepúberes es más rápido en comparación con un ciclo normal (20 vs 32 h), y podría deberse a acciones de la Kp a nivel hipófisis (Gutiérrez-Pascual et al., 2007) o en el ovario (Castellano et al., 2006), donde se ha demostrado la expresión de receptor a Kp y el Kiss1 (Caraty et al., 2012). Sin embargo, la reducción del tiempo del desarrollo de la fase folicular abre dudas sobre la calidad de los folículos ovulados y sus ovocitos o embriones (Caraty et al., 2012).

El pico preovulatorio debido a la acción de la Kp en GnRH/LH induce la ovulación. En ovejas en anestro postparto esta ha alcanzado el 80 % (Caraty et al., 2007), mientras que en ovejas prepúberes ha sido del 66 % (Redmond et al., 2011).

Efecto en la FSH

La Kp induce la secreción de FSH, pero a diferencia de la LH, el incremento es menor y se mantiene por más tiempo; lo cual pueda indicar que existe otro mecanismo paralelo de estimulación de la FSH, y podría ser el efecto directo en la hipófisis (Caraty et al., 2007). En el anestro estacional la Kp por infusión induce el incremento de FSH hasta en 30 % (Sébert et al., 2010).

Efecto en el E₂

El efecto de la Kp en la ovulación de ovejas en anestro postparto podría ocurrir a través de la activación del estímulo de retroalimentación positiva del estradiol (Caraty et al., 2012). Sébert et al. (2010) encontraron que la administración de Kp en ovejas en

anestro estacional indujo el aumento rápido y sostenido de E₂ en plasma a partir del inicio de la Kp en ovejas que posteriormente tuvieron pico preovulatorio y ovularon. Las medias de E₂ fueron 0.79±0.12, 2.05±0.18 y 4.26±0.47 ng mL⁻¹, antes de la Kp, a las 5 h, a las 10 h y la máxima concentración a las 18.7 h de iniciado el tratamiento, respectivamente. Este incremento de E₂ también ocurre en ovejas prepúberes tratadas con Kp (Redmond et al., 2011)

Acción de la Kp en la hipófisis

Es posible que la Kp actúe directamente en la hipófisis y estimule la secreción de LH y FSH a la par que la GnRH. Esto en parte porque se localizan terminaciones neuronales Kp en la zona externa de la EM de las ovejas, y además el receptor GPR54 se expresa en la hipófisis (Caraty et al., 2009). También, se ha demostrado la existencia de los genes de GPR54 y Kiss1 en células de la hipófisis cultivadas *in vitro* de ratas hembras y machos (Gutiérrez-Pascual et al., 2007).

Se han realizado ensayos para tratar de esclarecer el efecto directo de la Kp en la secreción de LH y FSH, sin embargo, hay contradicción en los resultados (Caraty et al., 2012). Por ejemplo, el tratamiento de células de la hipófisis anterior incubadas con Kp no incrementó la síntesis de LH y FSH (Thompson et al., 2004). Por otra parte, Matsui et al. (2004) reportaron que el *cetrotorelix* (antagonista de GnRH) bloquea la secreción de LH y FSH e indica que sin GnRH la Kp no estimula la secreción de gonadotropinas. Por otro lado, Gutiérrez-Pascual et al. (2007) encontraron que la incubación de células de la hipófisis con Kp sí induce la secreción de LH en ratones, tanto en hembras como en machos, y que en el cultivo de células GnRH con células de la hipófisis, la Kp potenció la respuesta en secreción de LH ($p \leq 0.05$). También, Suzuki et al. (2008) reportaron que la Kp incrementa la secreción de LH en la hipófisis de cerdos y bovinos machos entre 27 y 41 % ($p \leq 0.05$); sin embargo, parece ser que la Kp sola es menos potente que GnRH en la inducción de la secreción de LH de la hipófisis anterior. La Kp estimula la secreción de LH y FSH en cultivos celulares de hipófisis, sin embargo, en el estudio de Smith et al. (2008) con ovejas desconectadas entre el hipotálamo e hipófisis no hubo respuesta a la Kp i.v., además, muestrearon Kp en la circulación porta hipofisiaria y

encontraron bajos niveles de Kp que no fueron capaces de inducir efectos significativos.

Por otro lado, la GnRH y Kp podrían estar secretándose a un mismo tiempo en la circulación portal hipofisaria y actuar en la hipófisis anterior para potenciar la secreción de LH o sumar en la secreción de la misma de manera directa. También podría ser una prueba de que el cerebro controla la secreción de LH de la hipófisis por medio de otros péptidos, no sólo con la GnRH (Suzuki et al., 2008).

Acción de la Kp en el ovario

Es posible que la Kp también actúe directamente en el ovario durante la ovulación. La administración de eCG sola o con hCG incrementa el ARNm de KiSS-1 en el ovario antes de la ovulación (Castellano et al., 2006). Por otra parte, las células de la granulosa expresan el gen Kiss1 y GPR54, lo cual podría significar que la Kp actúa modulando la producción de esteroides (Caraty et al., 2012).

Vías y métodos de administración de kisspeptina

Vías de administración

Las vías de administración de Kp han sido principalmente tres: la intracerebroventricular, la intramuscular y la intravenosa, aunque también se ha aplicado vía subcutánea e intraperitoneal. Todas vías de administración mencionadas aumentan la secreción de LH, FSH y E₂, pero sólo por la intravenosa se ha logrado inducir el pico preovulatorio y la ovulación (Lehman et al., 2010b).

La vía intracerebroventricular consiste en colocar cánulas en el tercer ventrículo del cerebro. Se ha realizado en ovejas, ratas y ratones, entre otras especies (Messenger et al., 2005; Thomson et al., 2004). Una ventaja de esta vía es que se coloca la Kp en el área de acción y evita la inactivación que ocurre en el torrente sanguíneo vía los diferentes sistemas del cuerpo. Una desventaja es la necesidad de equipo altamente especializado para llevarla a cabo.

La vía de administración intramuscular hace el uso más práctico de la Kp (Ezzat Ahmed et al., 2009). Sin embargo, parece ser que podría ser menos efectiva que la i.v. debido, probablemente, a la inactivación de la Kp, ya que tarda más tiempo en llegar al órgano blanco.

La aplicación de Kp vía intravenosa es hasta ahora la más efectiva en la estimulación de la secreción de gonadotropinas, y tiene 3 variantes: una sola inyección, inyecciones repetidas en un intervalo de tiempo, o la infusión continua (Smith et al., 2014). Tiene la ventaja sobre la i.m. de que llega más rápido al sitio de acción y que es fácil de llevar a cabo, excepto en el caso de la infusión continua, donde se necesita equipo sofisticado.

Métodos de aplicación de kisspeptina

Administración por infusión

La administración de Kp por infusión se realiza por medio de bombas. Las bombas deben estar conectadas por un conducto hasta el catéter insertado en la vena yugular del animal que recibirá la Kp. Estas bombas tienen programada la dosis que se suministrará por unidad de tiempo y pueden trabajar continuamente por días. Se han hecho estudios que validan esta metodología y con los que se ha logrado incrementar la secreción de LH, FSH, E₂, y además inducir el pico preovulatorio y la ovulación en ovejas (Caraty et al., 2007). La infusión de Kp ejerce un estímulo continuo, a diferencia de las inyecciones.

Administración por inyecciones intermitentes

La administración de Kp por inyecciones intermitentes hace la aplicación de la Kp más práctica, ya que no se debe tener equipos sofisticados. Lo que se busca con este método es simular la secreción pulsátil de GnRH/LH, por lo cual la aplicación de la Kp se hace cada hora; además de buscar evitar la sobre estimulación que lleve a la desensibilización del GPR54 y la reducción de la respuesta (Redmond et al., 2011). Con este método se ha logrado inducir el pico preovulatorio de LH y la ovulación en ovejas.

El amamantamiento, el efecto macho y kisspeptina en el anestro postparto

El balance energético negativo debido a la lactancia no parece ser un prerrequisito para la reducción de Kp/GnRH/LH, ya que la aplicación de leptina o insulina no incrementa la expresión de Kiss1, NKB y la secreción de LH (Xu et al., 2009). Pero el estímulo del amamantamiento activa proyecciones de la médula ósea ventrolateral, y esta a su vez transmite el estímulo a las neuronas NPY presentes en el ARC, las cuales parecen conectar con las neuronas GnRH (Smith y Grove, 2002). También, activa áreas del hipotálamo, como el POA y el ARC, que están implicadas en la secreción de GnRH (Smith y Grove, 2002), y donde existe un mayor número de neuronas Kp que en otras áreas del hipotálamo (Smith et al., 2007). En ratas, el amamantamiento inhibe, al menos en parte, la expresión del gen Kiss1 y sus productos en el ARC, mientras que la aplicación de Kp i.c.v. incrementa la frecuencia de secreción de LH (Yamada et al., 2007). El amamantamiento también reduce la NKB, mientras que los niveles de Dyn permanecen sin cambios (Smith et al., 2010). Por ello, la inhibición de la Kp y NKB puede ser clave en la inhibición de la secreción pulsátil de GnRH/LH durante la lactancia, pero los mecanismos aún son desconocidos (Smith et al., 2010). En ovejas lactando es posible que un mecanismo parecido regule el anestro postparto. En este caso el estímulo del amamantamiento, transmitido ya sea por vía NPY o los POE, podría estar inhibiendo la secreción de Kp/GnRH/LH vía Dyn y ello causaría al anestro.

Las kisspeptinas y el efecto macho parecen también estar relacionados. En cabras, se han demostrado proyecciones neuronales desde la amígdala hasta el ARC; además, en ovejas, hay activación Fos en dicho núcleo con el uso del efecto macho (Jouhannau et al., 2013). Se ha encontrado que ovejas sometidas a efecto macho incrementan la expresión de Kiss1 ARNm y disminuye la de NKB en el ARC, mientras que la administración de un antagonista (P-271) de Kp bloquea completamente la respuesta al efecto macho (Bond et al., 2013). Las feromonas del macho, vía neuronas KNDy en el ARC, podrían estar regulando la secreción de GnRH (Hawken y Martin, 2012; Smith et al., 2014). La forma específica por la cual el estímulo del efecto macho llega hasta las neuronas GnRH es aún desconocido, pero cabe la posibilidad de que la Kp esté involucrada, debido a que se activa su secreción al momento del efecto macho

(Fabre-Nys et al., 2015). El efecto macho funciona muy bien en el anestro estacional (Martin y Scaramuzzi, 1983), sin embargo, la respuesta se reduce cuando las ovejas están lactando, aún en la época reproductiva (Pearce y Oldham, 1988). Las evidencias sugieren que el efecto macho estimula la secreción de Kp durante el anestro estacional, sin embargo, la menor respuesta de las ovejas lactando al efecto macho hace suponer que hay un agente inhibidor de la respuesta, que finalmente afectaría la secreción de Kp, GnRH y LH. Este agente inhibidor parece ser la lactancia misma.

La hipótesis KNDy

En general, casi todas las neuronas del ARC que producen Kp, también secretan dinorfina y neuroquinina (Clarke et al., 2009; Lehman et al., 2010). Las neuronas productoras de neuroquinina B (NKB; producto del gen TAC3) y la dinorfina (Dyn), comparten una misma distribución anatómica con la Kp; al igual que expresan ER α (Goubillon et al., 2000). La agrupación de neuronas NKB, Dyn y Kp en un mismo sitio es llamada KNDy, y juntas están siendo implicadas en control de la secreción de GnRH (Lehman et al., 2010). Las neuronas KNDy forman una red con proyecciones recíprocas, pero también tienen axones hacia la eminencia media y el POA (Jeremy T. Smith et al., 2011). Las neuronas KNDy expresan receptores para NKB (de nombre TACR3) y para Dyn, pero no para Kp (Smith et al., 2011); mientras que las neuronas GnRH no tienen receptores a NKB ni Dyn (Amstalden et al., 2009). En ovejas, las neuronas KNDy podrían asumir el rol de transmitir el efecto de retroacción positiva del E₂ y el pico preovulatorio de LH (Lehman et al., 2010). Así entonces la Kp quedaría como enlace entre las neuronas KNDy y las GnRH, con la NKB como agente iniciador de la secreción de Kp, y la Dyn como freno (Smith et al., 2014). Sin embargo, hay aún controversia en la veracidad de esta hipótesis.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El efecto del amamantamiento inicia en la glándula mamaria, e involucra también a la vista y el olfato (Cutshaw et al., 1992), y viaja por complejas redes neuronales hasta el cerebro. Se desconoce exactamente en qué centros cerebrales se expresa el efecto del amamantamiento, pero se especula que el área preóptica (POA) y el núcleo arcuato (ARC) podrían participar (Yamada et al., 2007). Esto se debe a que se activan durante el amamantamiento (activación de c-Fos) y además, son de los principales implicados en el control de la secreción de GnRH (Smith y Grove, 2002). Sin embargo, no está claro cómo inhibe el amamantamiento a las neuronas GnRH; si la inhibición es directa o indirecta, y de ser la última, qué intermediarios participan.

La Kp podría estar regulando la secreción de la GnRH/LH durante el anestro postparto. En el cerebro, la Kp se encuentra en grandes concentraciones en el POA y el ARC (Smith et al., 2007). Existen proyecciones neuronales Kp hacia las neuronas GnRH del POA (Clarkson y Herbison, 2006), y del ARC con dirección al área interna de la eminencia media, donde regulan la secreción de GnRH (Jeremy T. Smith et al., 2011). En ratas, el amamantamiento inhibe, al menos parcialmente, la expresión del gen Kiss1 y sus productos en el ARC, mientras que la aplicación de Kp i.c.v. incrementa la frecuencia de secreción y concentración de LH (Yamada et al., 2007). Además, de inhibir Kiss1, en amamantamiento también inhibe NKB (True et al., 2011). Existe también la posibilidad de que dinorfina inhiba Kp-NKB en las neuronas KNDy del ARC y como consecuencia a la secreción de GnRH, ya que la aplicación i.c.v. del antagonista *k* de opioides, que inhibe a dinorfina, incrementa la frecuencia de actividad multieléctrica neuronal (MUA) en el ARC (Wakabayashi et al., 2010). Además, las neuronas KNDy tienen ER α que son reguladas por el E₂ (Smith et al., 2006). La Kp regula la secreción de GnRH/LH durante el anestro estacional, la época reproductiva (Caraty et al., 2007) e inclusive en la pubertad de la oveja (Redmond et al., 2011). La dosis de 20 μ g h⁻¹ ha sido suficiente para incrementar la secreción de LH e inducir el pico preovulatorio en ovejas en anestro estacional (Sébert et al., 2010). Es posible que el amamantamiento inhiba, vía Kp, la secreción pulsátil de GnRH/LH y como consecuencia el pico preovulatorio y la ovulación en ovejas Pelibuey.

Los efectos sociosexuales son una alternativa para reducir el efecto del amamantamiento en el anestro postparto. Por su parte el amamantamiento controlado induce la ovulación en ovejas en anestro postparto (Morales et al., 2004; Pérez-Hernández et al., 2009). Esto ocurre, presumiblemente por la reducción de la sensibilidad del hipotálamo al efecto del amamantamiento (Acosta et al., 1983). El efecto macho es otra alternativa que influye en el retorno a la actividad reproductiva de ovejas en anestro postparto (Salloum y Claus, 2005; Morales-Terán et al., 2011). El macho, a través de las feromonas (Fabre-Nys et al., 2015) aumenta la secreción pulsátil de LH y como consecuencia puede inducir el pico preovulatorio y la ovulación en unas horas o días después de su aplicación (Martin y Scaramuzzi, 1983). Los estudios muestran una relación entre el efecto macho y la Kp ya que hay expresión de ARNm de Kiss1 en la amígdala de ratas, la cual forma parte de la ruta que sigue la señal del efecto macho (Cravo et al., 2011; Kim et al., 2011). Aunque el efecto macho y amamantamiento controlado pueden inducir con el tiempo la ovulación en parte de las ovejas, aún persiste un factor desconocido que evita que la totalidad regrese a la actividad reproductiva; este podría ser la supresión de la Kp.

Por lo anterior, los objetivos de esta investigación fueron:

- a) Determinar si el amamantamiento controlado y el efecto macho, como efectos simples o en interacción, mejoran el comportamiento reproductivo de ovejas en anestro postparto.
- b) Probar si la aplicación de Kp i.v. incrementa la secreción pulsátil de LH en ovejas en anestro postparto con amamantamiento continuo o controlado.
- c) Evaluar el efecto de la aplicación de Kp con efecto macho o amamantamiento controlado, en la inducción del pico preovulatorio y la concentración de LH en ovejas en anestro postparto.

Las hipótesis fueron:

- a) El comportamiento reproductivo será mejor en ovejas anéstricas postparto con efecto macho más amamantamiento controlado que con ambos efectos independientes, o respecto al amamantamiento continuo.
- b) La Kp incrementará en mayor magnitud la secreción pulsátil de LH en ovejas anéstricas postparto con amamantamiento continuo que con controlado.
- c) La Kp incrementará en mayor magnitud la incidencia de pico preovulatorio y la concentración de LH en ovejas anéstricas postparto con amamantamiento continuo que con controlado o efecto macho.

CAPÍTULO I. INDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD REPRODUCTIVA DE OVEJAS EN ANESTRO POSTPARTO CON EFECTO MACHO Y CONTROL DEL AMAMANTAMIENTO

1.1. Resumen

El amamantamiento es un factor causal preponderante del anestro postparto en ovejas. Por ello, el objetivo de este estudio fue determinar si el amamantamiento controlado y el efecto macho, como efectos simples o en interacción, mejoran el comportamiento reproductivo de ovejas en anestro postparto. Se incluyeron en el estudio 60 ovejas con 1.4 ± 0.15 d de paridas y amamantando a sus crías. El día 7 postparto se formaron 4 grupos: amamantamiento continuo (A; n=15), A más efecto macho (AM; n=15), amamantamiento controlado (R; n=15), R más efecto macho (RM; n=15). El amamantamiento controlado se llevó a cabo 2 veces al día por 30 min. El efecto macho fue con un semental entero, directo en el corral, 2 veces al día por 30 min. A partir del día 35 postparto se empezó a revisar la incidencia de estros en todos los grupos y toda hembra detectada en estro se empadró con monta natural. El destete se realizó al día 63 postparto. El diagnóstico de gestación se hizo con ultrasonografía al día 60 después del empadre. Se pesaron ovejas y crías cada semana, desde el parto hasta el destete. La interacción del tipo de amamantamiento y efecto macho no fue significativa ($p > 0.05$), sí los efectos simples ($p \leq 0.05$). El efecto macho redujo el tiempo al primer estro en 7 días ($p \leq 0.001$), incrementó 47 % las gestaciones ($p \leq 0.030$) y aumentó la fecundidad de 0.7 a 1.4 ($p \leq 0.002$). El amamantamiento controlado redujo los días al primer estro en 3 ($p \leq 0.016$). Se concluye que el efecto macho y el amamantamiento controlado, como efectos simples, mejoran el comportamiento reproductivo de ovejas en anestro postparto.

Palabras claves: *lactancia, reproducción, oveja, carnero*

1.2. Introducción

El parto induce en la oveja cambios fisiológicos que favorecen la sobrevivencia del recién nacido. Uno de estos cambios es el anestro. En este no influye la FSH, ya que continúa el reclutamiento y selección de folículos dependientes de esta hormona

(Mandiki et al., 1990; Rubianes y Ungerfeld, 1993). La LH es la causa del anestro debido a que la frecuencia se encuentra reducida cuando los folículos alcanzan la etapa de preovulatorios (Clarke et al., 1984), por lo que el folículo se atresia. Dos a tres semanas después del parto, cuando ha ocurrido la involución uterina (Rubianes y Ungerefeld, 1993) y la recuperación del estrés postparto, el amamantamiento mantiene la inhibición sobre la secreción pulsátil de LH y la ovulación (Morales et al., 2004).

El amamantamiento reduce la frecuencia de secreción de LH (McNeilly, 2001) y como consecuencia inhibe la ovulación y retrasa la aparición del primer estro postparto (Schirar et al., 1990). El efecto del amamantamiento inicia en la glándula mamaria, es ampliado por la vista y el olfato en la interacción madre-cría (Cutshaw et al., 1992), y viaja por redes neuronales desconocidas hasta el cerebro; posiblemente al área preóptica (POA) y el núcleo arcuato (ARC; Smith y Grove, 2002). En un estudio se encontró que más del 90 % de ovejas sin cría se mantuvieron ovulando, mientras solo el 20 % ovularon si estaban amamantando (Morales et al., 2004). El control del amamantamiento, parece reducir el anestro postparto y el mejorar el comportamiento reproductivo en ovejas y otras especies como los bovinos (Gallegos-Sánchez et al., 1990). Varios estudios indican que incrementa el número de ovejas que ovulan, se reduce el tiempo a la primera ovulación (Morales et al., 2004; Pérez-Hernández et al., 2009) y aumenta la incidencia de gestaciones (Camacho et al., 2008). Sin embargo, algunas ovejas quedan sin retornar a la actividad reproductiva (Montiel-Castelan, 2014).

El efecto macho es otra alternativa para inducir el retorno a la actividad reproductiva en ovejas en anestro estacional (Martin et al., 1986) o en anestro postparto (Salloum y Claus, 2005; Morales-Terán et al., 2011). El efecto, a través de las feromonas que produce (Fabre-Nys et al., 2015) aumenta la secreción pulsátil de LH y como consecuencia ocurre la ovulación en horas o días (Martin y Scaramuzzi, 1983).

Las ovejas en anestro postparto con efecto macho empiezan a ovular entre las 3 a 4 semanas postparto (Cruz Espinoza, 2011; Montiel-Castelan, 2014). Las investigaciones indican que el efecto macho y amamantamiento controlado pueden mejorar la actividad reproductiva de ovejas postparto, sin embargo aún hay variabilidad en los resultados, por ejemplo la primera ovulación puede variar de 65 % al 100 % (Cruz Espinoza, 2011;

Morales-Terán et al., 2011). Esta variabilidad crea la necesidad de continuar la investigación del tema. Considerando lo anterior, el objetivo de este experimento fue determinar si el amamantamiento controlado y el efecto macho, como efectos simples o en interacción, mejoran el comportamiento reproductivo de ovejas en anestro postparto.

1.3. Materiales y métodos

1.3.1. Localización del experimento

El experimento se realizó en la época reproductiva (noviembre-diciembre) para la oveja en esta latitud. El sitio fue el Laboratorio de Reproducción de Ovinos y Caprinos (LaROCa) del Colegio de Postgraduados, ubicado en Montecillo, Texcoco, estado de México. Se localiza entre 98°53' O y 19°29' N, a una altitud de 2240 m. El clima es templado subhúmedo con lluvias en verano Cb (wo)(w)(i)g, precipitación de 636.5 mm y temperatura media anual de 15.2° C (García, 2004).

1.3.2. Animales y alimentación

Se utilizaron 60 ovejas Pelibuey, multíparas, con 1.4 ± 0.15 d de paridas y amamantando a sus crías (1.4 crías/oveja). El peso de las ovejas fue 49.80 ± 0.82 kg y se alimentaron con heno de avena ($2 \text{ kg oveja}^{-1} \text{ d}^{-1}$) más concentrado ($500 \text{ g oveja}^{-1} \text{ d}^{-1}$) con 15.2 % de proteína cruda (PC) y 2.5 Mcal EM kg^{-1} . Los corderos fueron amamantados y consumieron alimento iniciador a libre acceso con 20 % de PC y 3.0 Mcal EM kg^{-1} de iniciador. Las ovejas y corderos se alojaron en estabulación.

1.3.3. Tratamientos

El día 7 postparto se formaron al azar 4 grupos: amamantamiento continuo (A; n=15), A más efecto macho (AM; n=15), amamantamiento controlado (R; n=15), RS más efecto macho (RM; n=15). En los grupos con amamantamiento continuo, madres y crías permanecieron las 24 h del día juntas. En los grupos con amamantamiento controlado, las madres y las crías se separaron; para el amamantamiento se llevaba a las ovejas al corral de las crías (8:00 y 15:00 h, por 30 min en cada ocasión). El efecto macho se llevó a cabo con un semental entero con mandil, 2 veces al día (8:30 y 15:30 h). El semental se cambió cada día para evitar que las ovejas se acostumbraran al macho. Se utilizaron 8 sementales durante el periodo de estudio. Los tratamientos se aplicaron

desde el día 1 hasta el 63 postparto al destete. A partir del día 35 del experimento y hasta el día 63, toda hembra detectada en celo recibió monta natural.

1.3.4. Toma de muestras

Desde el parto y hasta el día 63, se pesaron las ovejas y las crías semanalmente para evaluar el cambio de peso. Desde al día 7 postparto y hasta el 63, en los grupos con efecto macho, y del 35 al 63, en aquellos sin efecto macho, se registró la ocurrencia de estros. El diagnóstico de gestación se realizó el día 45 después del empadre, mediante ultrasonografía. Al momento del parto se contabilizó el número de crías nacidas para calcular la fecundidad y prolificidad.

1.3.5. Análisis estadístico

Para determinar el comportamiento reproductivo se comparó la incidencia de estros, el tiempo al primer estro, la gestación, fecundidad y prolificidad. También se comparó el peso de ovejas y crías cada semana de pesaje. La incidencia de estros se definió como el número de ovejas de cada tratamiento que entraron en estro por primera vez entre el total de ovejas de cada tratamiento. El tiempo al primer estro fue el tiempo transcurrido entre el parto y el primer estro. La gestación se definió como el número de ovejas gestantes entre el total de cada tratamiento. Fecundidad fue el número de crías nacidas entre el número de ovejas de cada tratamiento. La prolificidad fue el número de crías nacidas entre el número de ovejas paridas de cada tratamiento.

Los datos de peso de ovejas y crías se analizaron con el procedimiento MIXED del SAS. La fecundidad y prolificidad se analizaron con el procedimiento GLM del SAS (SAS 9.0, 2002; SAS Institute; Cary, NC, USA). La comparación de las medias se hizo con la prueba de Tukey. La incidencia de estros y la gestación se comparó con regresión logística, con el procedimiento Logistic del SAS (SAS 9.0, 2002; SAS Institute; Cary, NC, USA).

1.4. Resultados

1.4.1. Incidencia de estros

La incidencia de estros fue similar en todos los tratamientos ($p > 0.05$). Esta no fue diferente entre ovejas con amamantamiento continuo y el controlado (66.7 % vs 80.0

%; $p > 0.05$), y con o sin efecto macho (53.3 % vs 93.3 %; $p > 0.05$; Figura 1.I). Tampoco hubo interacción entre el factor tipo de amamantamiento y efecto macho ($p > 0.05$). Antes del día 35 postparto, sólo 1 de 15 ovejas del RM entró en estro, pero ninguna en los demás tratamientos.

1.4.2. Tiempo al primer estro

El tiempo desde el parto hasta el primer estro fue diferente en los factores estudiados ($p \leq 0.05$). Este difirió entre el amamantamiento continuo y controlado ($p \leq 0.016$), y con o

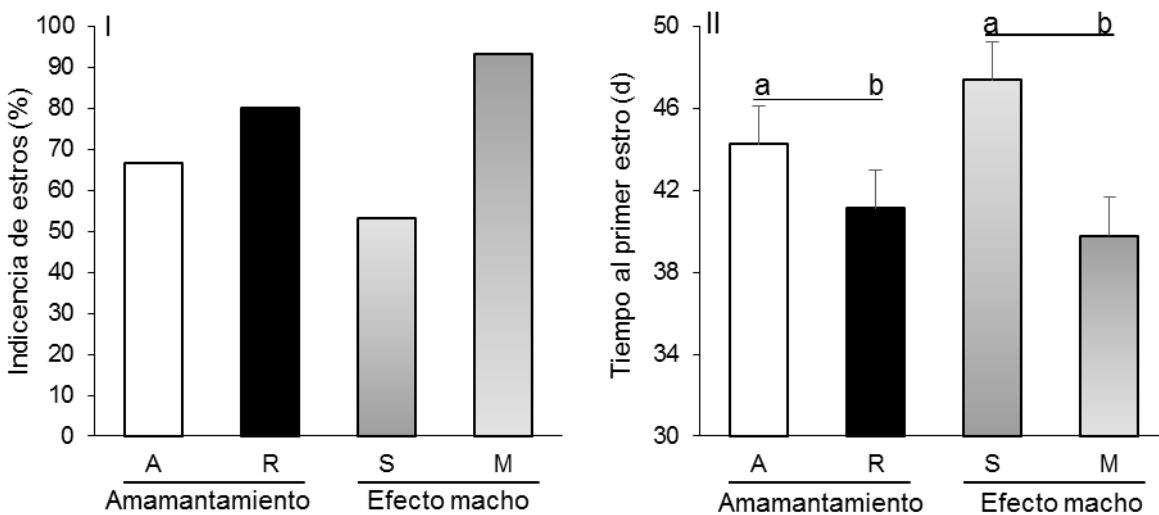


Figura 1. Efectos simples de los factores amamantamiento y efecto macho en la incidencia de estros (I) y tiempo al primer estro (II) de ovejas en anestro postparto. A= continuo; R= controlado; S= sin; M= con. Dentro de factor, columna con diferente letra es significativa ($p \leq 0.05$).

sin efecto macho ($p \leq 0.001$; Figura 1.II). Sin embargo, la interacción entre el tipo de amamantamiento y el efecto macho no fue significativa ($p > 0.05$).

1.4.3. Gestación

La gestación incrementó en ovejas que recibieron efecto macho de 43.3 % a 90.0 % ($p \leq 0.030$). Sin embargo, no hubo efecto del tipo de amamantamiento ($p > 0.05$; Figura 3.I), ni de la interacción entre este y el efecto macho (Figura 2; $p > 0.05$).

1.4.4. Fecundidad y prolificidad

La fecundidad incrementó con el efecto macho ($p \leq 0.002$). Por otro lado, no hubo efecto del tipo de amamantamiento, aunque existió tendencia (0.87 ± 0.15 vs 1.27 ± 0.18 ; $p = 0.076$; Figura 3.II). No hubo efecto de interacción entre el tipo de amamantamiento y el efecto macho en la fecundidad ($p > 0.05$).

La prolificidad fue similar entre el amamantamiento continuo o controlado (1.44 ± 0.14 vs 1.73 ± 0.15 ; $p > 0.05$), sin o con efecto macho (1.62 ± 0.17 vs 1.59 ± 0.13 ; $p > 0.05$) o la interacción entre tipo de amamantamiento y efecto macho ($p > 0.05$).

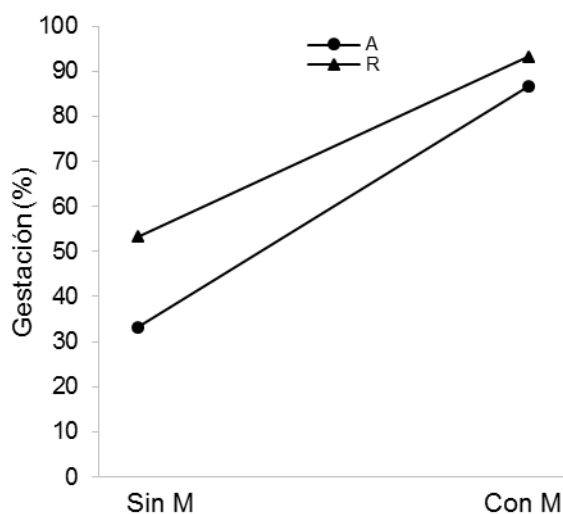


Figura 2. Interacción entre el tipo de amamantamiento y efecto macho en la gestación de ovejas en anestro postparto ($p > 0.05$). A= amamantamiento continuo; R= amamantamiento controlado; M= efecto macho.

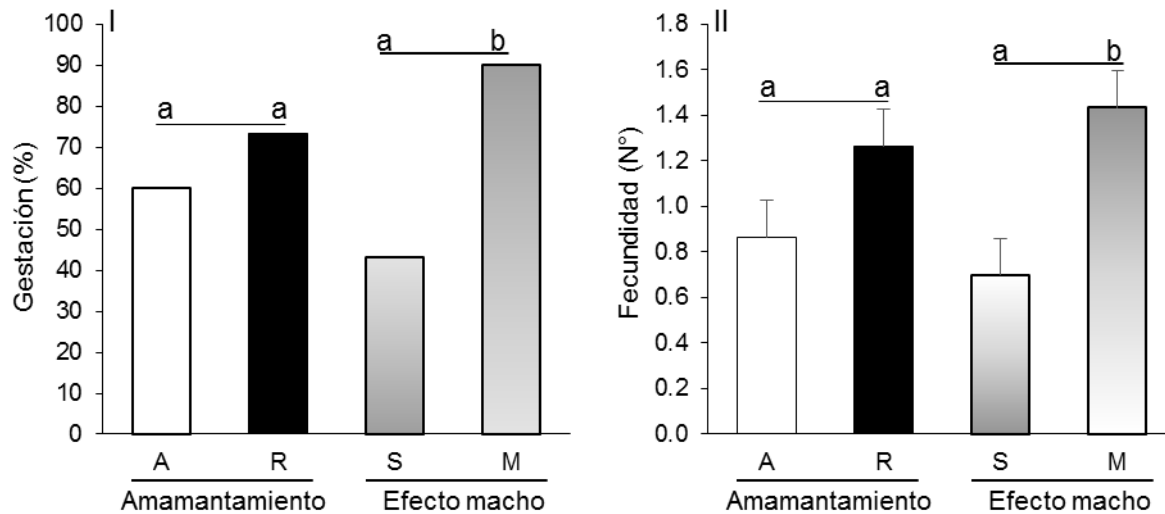


Figura 3. Efectos simples de los factores amamantamiento y efecto macho en la gestación (I) y fecundidad (II) de ovejas en anestro postparto. A= continuo; R= controlado; S= sin; M= con. Dentro de factor, columna con diferente letra es significativa ($p \leq 0.05$).

1.4.5. Cambio de peso de las ovejas

El peso de las ovejas en el tiempo del experimento varió en función de los tratamientos (Figura 4B; $p \leq 0.024$), pero este no fue diferente entre tratamientos cuando se comparó dentro de una misma semana ($p > 0.05$). El peso de las ovejas disminuyó en el tiempo (Figura 4A; $p \leq 0.001$). Los factores simples tipo de amamantamiento ($p > 0.05$), efecto macho ($p > 0.05$), o la interacción de ambos no fue significativa ($p > 0.05$).

1.4.6. Cambio de peso de las crías

El peso de las crías aumentó en el tiempo debido a los tratamientos (Figura 5A; $p \leq 0.023$), pero en una misma semana, el peso de las crías entre tratamientos fue similar ($p > 0.05$). El peso de las crías aumentó significativamente en cada semana de pesaje (Figura 5B; $p \leq 0.0001$). El efecto simple del tipo de amamantamiento ($p > 0.05$) o efecto macho ($p > 0.05$), y la interacción de ambos factores ($p > 0.05$), no influyeron en el peso de las crías.

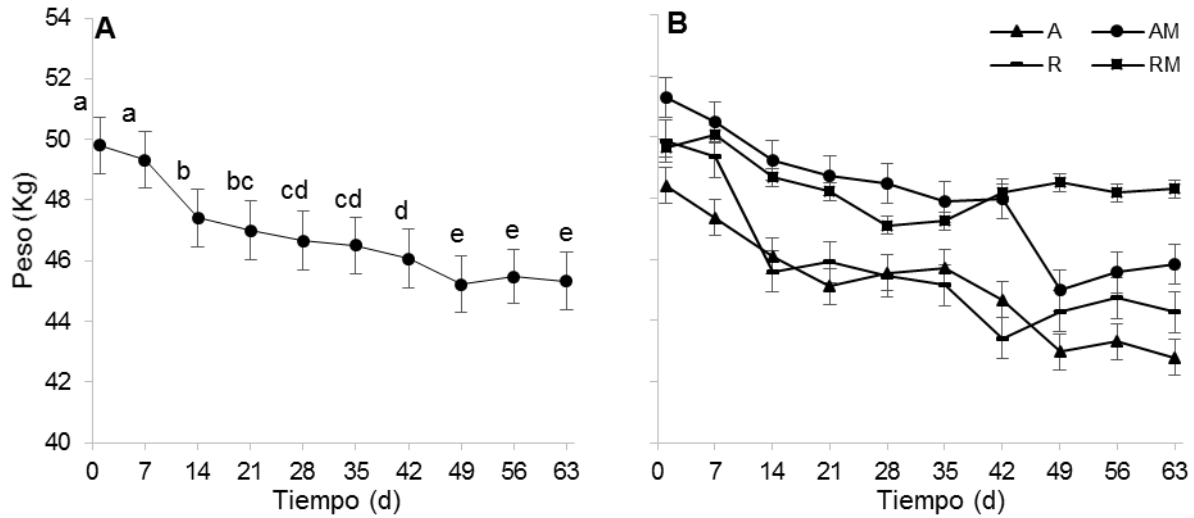


Figura 4. Cambio de peso de ovejas, desde el parto al día 63 postparto, con amamantamiento continuo (A), A más efecto macho (AM), amamantamiento controlado (R) o R más efecto macho (RM). **A** presenta el efecto del tiempo ($p \leq .0001$); **B** muestra la interacción entre A, AM, R y RM.

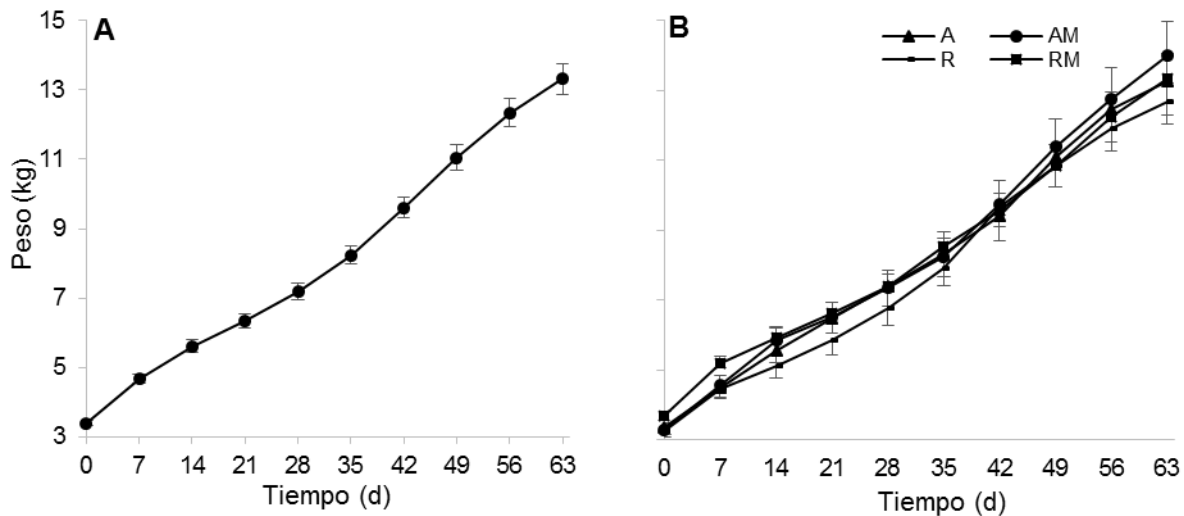


Figura 5. Cambio de peso de crías, desde el nacimiento hasta el día 63 de edad, de ovejas con amamantamiento continuo (A), A más efecto macho (AM), amamantamiento controlado (R) o R más efecto macho (RM). **A**: es el efecto del tiempo ($p \leq .0001$); **B**: interacción entre A, AM, R y RM en el tiempo ($p \leq .05$).

1.5. Discusión

El comportamiento reproductivo de ovejas en anestro postparto mejoró por el factor efecto macho y el amamantamiento controlado. Sin embargo, no hubo efecto de interacción.

El efecto macho mejoró la mayoría de las variables estudiadas. El tiempo al primer estro se redujo 8 d. En un estudio similar se encontró este mismo efecto (Cruz-Espinoza, 2011). De igual manera, pero en ovejas de lana, obtuvieron resultados similares (Lassoued et al., 2004). También, el efecto macho duplicó el porcentaje de ovejas gestantes (90 %). Este valor es superior al de otros estudios que reportan de 63 % a 68 % de gestación (Cruz Espinoza, 2011; Morales-Terán et al., 2011). A pesar de que el inicio de los estros fue al día 40, es posible que el hecho haya favorecido la salud uterina y hormonal, y en consecuencia la gestación. Por ejemplo, Schirar et al., (1989) encontraron que antes del día 20 postparto, el 38 % de las ovejas tuvieron fase lútea de longitud normal, mientras que alcanzó 74 % si la ovulación ocurría después ($p \leq 0.02$). También se debe destacar que a partir del día 42 la pérdida de peso en las ovejas del estudio fue reducida (Figura 4A). Otro indicador favorecido por el efecto macho fue la fecundidad que mejoró 100 %. Ello está relacionado con el incremento del número de ovejas gestantes. La fecundidad en este estudio fue mayor a la reportada por Cruz-Espinoza (2011) con 1.10.

El efecto macho no mejoró la incidencia de estros, aunque hubo ligera tendencia ($p > 0.05$). Existe la posibilidad de que el efecto macho indujera la ovulación, pero no la presentación de estros (Martin y Scaramuzzi, 1983; Lassoued et al., 2004). Al menos la mitad de las ovejas en anestro ovulan y no manifiestan estro hasta una tercera ovulación, que es cuando el eje reproductivo ha estado bajo la influencia de progesterona (Martin y Scaramuzzi, 1983). Similar a nuestro estudio, Morales-Terán et al. (2011) no encontraron diferencias en la incidencia de estros con el efecto macho. La prolificidad tampoco mejoró con el efecto macho. Los resultados de este experimento coinciden con otros (Cruz-Espinoza, 2011). Parece ser que esta variable está influida por la raza y se puede mejorar con selección o con el uso de hormonas como la eCG (Camacho et al., 2008).

El amamantamiento controlado influyó menos en el comportamiento reproductivo que el efecto macho. A pesar de ello, el control del amamantamiento redujo el tiempo al primer estro en 5 d respecto al amamantamiento continuo ($p \leq 0.05$). El retraso del primer estro postparto es una consecuencia del amamantamiento, el cual reduce la frecuencia de secreción de LH, que es necesaria en la última parte del desarrollo folicular (Schirar et al., 1989). El paso previo a la primera ovulación es el incremento paulatino de la frecuencia y la amplitud de los pulsos de secreción de LH (Schirar et al., 1990), sin embargo, para que se manifieste el estro es necesaria la exposición previa a progesterona (Martin et al., 1986). Además, la duración del ciclo estral debe ser de aproximadamente 17 d (Schirar et al., 1989). El amamantamiento controlado también tendió a incrementar la fecundidad ($p \leq 0.076$); esta incrementó 0.4 crías. Otros investigadores tampoco encontraron diferencias en este indicador (Castillo-Maldonado et al., 2013).

Contrario a lo esperado, el control del amamantamiento no mejoró la incidencia de estros, pero aun así fue razonablemente alta (80 %). Este resultado fue similar a lo reportado por Castillo-Maldonado et al. (2013) quienes encontraron 100 % de estros en cada tratamiento ($p > 0.05$), pero adicionalmente aplicaron un protocolo de sincronización de estros con progesterona. Sin embargo, los resultados del presente estudio contrastan con los de Camacho et al. (2008) quienes obtuvieron 28 % *versus* 0 % con amamantamiento controlado o continuo, respectivamente ($p \leq 0.05$), además, con la sincronización de estros con progesterona la diferencia fue mayor (92 % vs 52 %; $p \leq 0.05$). También contrasta con lo obtenido por otros investigadores (Herrera-Corredor, 2008). No hubo efecto del amamantamiento controlado en el número de ovejas gestantes. Castillo-Maldonado et al. (2013) al igual que en este estudio, no encontraron diferencias en gestación. No obstante, Camacho et al. (2008) sí encontraron efecto del control del amamantamiento, aunque emplearon tratamientos hormonales. Los estros en nuestro estudio se concentraron entre el día 40 y 44 postparto y aparentemente hay relación entre el tiempo del empadre postparto y la gestación. Schirar et al. (1989) mencionaron que ovejas con amamantamiento continuo son más fáciles de gestar al día 50 que aquellas sin cría al día 24. Posiblemente el empadre después del día 40, en nuestro estudio, facilitó la gestación, independientemente del tipo de amamantamiento.

El amamantamiento controlado no cambió la prolificidad. Esto coincide con Castillo-Maldonado et al. (2013) pero contrasta con otro estudio donde la prolificidad incrementó de 1.4 a 1.9 (Camacho et al., 2008) pero además aplicaron eCG, que se sabe que incrementa la tasa ovulatoria.

El peso de las ovejas disminuyó con los días postparto (Figura 2A). Este cambio fue significativo a partir de la segunda semana y hasta la séptima ($p \leq 0.05$), y a partir de entonces el peso se mantuvo ($p > 0.05$). No obstante, cuando se analiza el peso por semana, no hay diferencia entre tratamientos ($p > 0.05$; Figura 2B). Esto significa que la caída de peso de las ovejas en el estudio fue similar y el efecto de este en el comportamiento reproductivo, si existió, fue equivalente para cada tratamiento. Sin embargo, en otro estudio encontraron que las ovejas con amamantamiento continuo perdieron más peso que aquellas con controlado; según los autores, esto se debió a que las primeras produjeron más leche causado por la mayor frecuencia de amamantamiento (Pérez-Hernández et al., 2009). No es claro hasta qué punto la pérdida de peso es en detrimento del comportamiento reproductivo. Según Lozano et al. (1998) la pérdida del 12 % del P.V. no disminuyó la frecuencia de secreción de LH en ovejas en anestro postparto. En nuestro estudio las ovejas perdieron 9 % del peso y el porcentaje de gestación fue 67 %, mientras que Cruz-Espinoza (2011) obtuvo 62 % con una pérdida de peso del 7 %.

El peso similar entre los grupos de ovejas también se manifestó en ganancia de peso de las crías (Figura 3A y 3B). El amamantamiento controlado y el efecto macho no cambiaron la tendencia de peso de las crías ($p > 0.05$). Esto concuerda con los resultados de otros estudios similares (Morales-Terán et al., 2011; Morales et al., 2004). El cuidado para que se establezca la relación madre-cría es crucial en la sobrevivencia del recién nacido (Nowak et al., 2000). La atención al nacimiento, la correcta alimentación y el abasto de agua limpia igualan la diferencia en frecuencia de amamantamiento y la respuesta en la ganancia de peso entre crías con amamantamiento controlado y continuo.

De acuerdo con los resultados de este y otros estudios, el amamantamiento controlado y el efecto macho mejoran el comportamiento reproductivo de ovejas en anestro

postparto. Sin embargo, 10 % de ovejas con efecto macho y 27 % con amamantamiento controlado no se gestaron antes de los 63 días postparto, mientras que 7 y 20 % no entraron en estro. Esto muestra que el amamantamiento inhibe el retorno a la actividad reproductiva a nivel tal que el efecto macho y el amamantamiento controlado no son suficientes para iniciar la reproducción en la totalidad de las ovejas. El efecto macho actúa vía feromonas (Knight y Lynch, 1980) y luego la señal llega a la corteza olfatoria, posteriormente a la amígdala, al fórnix y llega hasta el POA (Martin et al., 1986). Se desconoce cómo estimula el efecto macho a las neuronas GnRH, pero cabe la posibilidad de que la Kp estén involucradas, ya que se activan con el efecto macho (Hawken y Martin, 2012; Fabre-Nys et al., 2015). La misma Kp podría estar involucrada en la inhibición del amamantamiento en el comportamiento reproductivo. En ratas, el amamantamiento inhibe la expresión del gen Kiss1, mientras que la aplicación de Kp i.c.v. incrementa la frecuencia de secreción de LH (Yamada et al., 2007). Además, la Kp incrementa la secreción de GnRH/LH durante el anestro estacional (Caraty et al., 2007). Es posible que el amamantamiento inhiba la secreción normal de Kp y que el efecto macho y el amamantamiento controlado no logren restaurarla totalmente, pero esto aún se debe investigar.

1.6. Conclusiones

El efecto macho y el amamantamiento controlado mejoraron el comportamiento reproductivo de ovejas en anestro postparto de manera independiente, sin embargo, la combinación de ambos no fue importante.

CAPÍTULO II. LA KISSPEPTINA Y SU EFECTO EN LA SECRECIÓN PULSÁTIL DE HORMONA LUTEINIZANTE (LH) DURANTE EL ANESTRO POSTPARTO EN OVEJAS PELIBUEY AMAMANTANDO

2.1. Resumen

El objetivo de este estudio fue probar si la aplicación de kisspeptina (Kp) i.v. incrementa la secreción pulsátil de LH en ovejas Pelibuey durante el anestro postparto. Diez días después del parto, se formaron dos grupos de ovejas: (1) ovejas con amamantamiento continuo (n=8), donde las crías permanecieron con las madres todo el tiempo; (2) ovejas con amamantamiento controlado, las madres amamantaban a las crías dos veces al día durante 30 min (n=8). En el día 19 postparto, a cada oveja se le colocó un catéter en ambas venas yugulares, posteriormente cada oveja se alojó en una jaula de manera individual, tenían acceso al agua y al alimento. En el día 20, a las 14:00, el 50% de las ovejas de cada grupo recibió 120 µg de Kp, diluida en 3 mL de solución salina y aplicada por infusión continua durante 6 h, mientras que el otro 50% sólo recibió solución salina. Se tomaron muestras sanguíneas (4 mL) cada 15 min, desde las 8:00 hasta las 20:00, para determinar la frecuencia de secreción de LH. No hubo interacción entre el efecto de Kp y el tipo de amamantamiento, en relación a la frecuencia de secreción de LH ($p>0.05$). La frecuencia de secreción de LH antes de la administración de la Kp fue similar (1.50 ± 0.40 ; $p>0.05$) y se incrementó hasta 3.50 ± 0.43 pulsos/6h con la aplicación de Kp ($p\leq 0.0140$). La concentración de LH (ng mL^{-1}) fue superior en ovejas que recibieron Kp (1.113 ± 0.14) vs aquellas que no la recibieron (0.724 ± 0.07 ; $p\leq 0.04$) y se encontró que la frecuencia de LH fue mayor en ovejas con amamantamiento controlado (2.44 ± 0.29 ; 1.69 ± 0.29 ; $p\leq 0.04$). La aplicación exógena de Kp incrementa la secreción pulsátil de LH en ovejas amamantando.

Palabras claves: kisspeptina; LH; amamantamiento controlado; anestro; oveja

2.2. Introducción

La duración del anestro postparto en las ovejas está influido principalmente por el amamantamiento (Morales-Terán et al., 2011) inhibe la frecuencia de secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y hormona luteinizante (LH) y como

consecuencia, inhibe la ovulación (Clarke et al., 1984; McNeilly, 2001), la secreción de FSH no se afecta por el amamantamiento (Mandiki et al., 1990). El efecto del amamantamiento se inicia con el estímulo a la glándula mamaria e involucra a la vista y al olfato (Cutshaw et al., 1992) viaja por redes neuronales hasta llegar al sistema nervioso central (SNC). Se desconoce en qué núcleos cerebrales se expresa el efecto del amamantamiento, se piensa que puede ser en el área preóptica (POA) y en el núcleo arcuato (ARC; Yamada et al., 2007), ya que estos se activan (existe ARNm de c-fos) durante el amamantamiento y están implicados en el control de la secreción pulsátil de GnRH (Smith and Grove, 2002). No es clara la vía que utiliza el amamantamiento para inhibir la secreción pulsátil de GnRH; no se sabe si es una vía directa o indirecta y cuáles serían los núcleos neuronales intermediarios que participarían. Se sabe que el estradiol (E₂) inhibe la secreción pulsátil de GnRH/LH durante el anestro y parece mediar el efecto del amamantamiento, ya que en su ausencia se incrementa la secreción pulsátil de LH y reduce el efecto negativo del amamantamiento (Wright et al., 1981). También se sabe que el efecto del E₂ en las neuronas productoras de GnRH es indirecto, ya que estas no presentan receptores para E₂ tipo alfa (ER α ; Herbison and Pape, 2001). El descubrimiento de las kisspeptinas y algunas de sus funciones las coloca como candidatas para regular el efecto del E₂ y el amamantamiento en las neuronas productoras de GnRH.

La kisspeptina (Kp) regula la secreción de GnRH/LH durante el anestro estacional, la época reproductiva (Caraty et al., 2007) y la pubertad de la oveja (Redmond et al., 2011). Dosis de 20 μ g⁻¹ h⁻¹ han sido suficientes para incrementar la secreción pulsátil de LH e inducir el pico preovulatorio en ovejas durante el anestro estacional (Sébert et al., 2010). La Kp se encuentra en grandes concentraciones en el POA y el ARC (Smith et al., 2007). Existen proyecciones neuronales Kp hacia las neuronas GnRH del POA (Clarkson and Herbison, 2006), y del ARC con dirección al área interna de la eminencia media, donde regulan la secreción de GnRH (J. T. Smith et al., 2011).

En ratas, el amamantamiento inhibe, al menos parcialmente, la expresión del gen Kiss1 en el ARC y la aplicación de Kp en el tercer ventrículo (i.c.v.) incrementa la frecuencia de secreción y concentración de LH (Yamada et al., 2007). En ovejas, el amamantamiento controlado es una estrategia que reduce la duración del anestro

postparto, incrementa el número de ovejas que ovulan y reduce los días a la primera ovulación, en comparación con el amamantamiento continuo (Camacho et al., 2008; Pérez-Hernández et al., 2009). El mayor número de ovejas que ovulan con amamantamiento controlado, implica un incremento en la secreción pulsátil de GnRH/LH. Sin embargo, de 12 a 33 % de ovejas no ovulan (Morales-Terán et al., 2011; Castillo-Maldonado et al., 2013), debido posiblemente a que el incremento en la frecuencia de secreción de GnRH/LH no es suficiente para provocar la ovulación y que la Kp esté parcialmente inhibida. El objetivo de este estudio fue determinar si la aplicación exógena de Kp vía sanguínea (i.v.) incrementa la secreción pulsátil de LH en ovejas Pelibuey amamantando.

2.3. Materiales y métodos

2.3.1. Localización del experimento

El experimento se realizó durante los meses de agosto-septiembre, que corresponden con la época reproductiva para la oveja. Este se llevó a cabo en el Laboratorio de Reproducción de Ovinos y Caprinos (LaROCa) del Colegio de Postgraduados, Texcoco, estado de México, 98°53' O y 19°29' N, a una altitud de 2240 m. El clima es templado subhúmedo con lluvias en verano Cb (wo)(w)(i)g, precipitación de 636.5 mm y temperatura media anual de 15.2° C (García, 2004).

2.3.2. Animales y alimentación

El estudio se llevó a cabo bajo los criterios de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 sobre especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio (SAGARPA, 2001), además, se respetaron las regulaciones para el uso y cuidado de animales de investigación emitido por el Consejo General Académico del Colegio de Postgraduados en México (Colpos, 2016). Se utilizaron 16 ovejas Pelibuey, multíparas, con 10 días de paridas y amamantando a una cría. El peso de las ovejas fue 54.2±1.5 kg y se alimentaron con heno de avena (2 kg oveja⁻¹ d⁻¹) más concentrado (500 g oveja⁻¹ d⁻¹) con 15.2 % de PC y 2.5 Mcal de EM kg⁻¹. Los corderos fueron amamantados y consumieron alimento iniciador a libre acceso. Las ovejas y corderos se alojaron en estabulación.

2.3.3. *Tratamientos*

Se utilizaron cuatro tratamientos: amamantamiento continuo con solución salina (AS, n=4); amamantamiento continuo con Kp (AKp, n=4); amamantamiento controlado con solución salina (RS, n=4); y amamantamiento controlado con Kp (RKp, n=4). El día 10 postparto los tipos de amamantamiento continuo (A) y controlado (R) fueron asignados aleatoriamente a las ovejas. En A, madres y crías permanecieron las 24 h del día en un mismo corral. En R, las madres y las crías se separaron, y el amamantamiento ocurría a las 8:00 y 15:00 h, por 30 min en cada ocasión, para lo cual las madres se llevaban al corral de las crías.

El día 19 postparto, la aplicación de 120 µg de Kp (Sébert et al., 2010) o de 3 mL de solución salina (S) se asignó aleatoriamente a las ovejas de cada tipo de amamantamiento; para la aplicación se colocó un catéter (1.1 mm de diámetro interno; BD Insyte, BD Vialon Material) en cada vena yugular. Al finalizar, las ovejas se alojaron en jaulas individuales, con acceso a agua, alimento y espacio suficiente para echarse. En A, las crías tuvieron acceso libre a la jaula de la madre, mientras que en R se llevaron con su respectiva madre, en cada periodo de amamantamiento. El día 20 postparto a las 14:00, inició la aplicación de Kp o S, utilizando una bomba de infusión constante (NE-300, New Era Pump Systems), conectada al catéter derecho por una manguera plástica (1.2 m de longitud y 2 mm de diámetro interno). La duración de la aplicación fue de 6 h, con una tasa de 500 µL h⁻¹ y 20 µg h⁻¹ de Kp (Caraty et al., 2007). Se utilizó Kp-10 bovina (YNWNSFGLRY; Phoenix Pharmaceuticals, Inc., USA).

2.3.4. *Toma de muestras*

Se registró el peso vivo de las ovejas al momento del parto, al día 10, al 17 y al 24 postparto para usarlo como variable explicativa. El día 20 postparto se tomaron muestras sanguíneas cada 15 min, en dos periodos: antes de aplicar Kp o S, de 8:00 a 14:00 h y después del inicio de la aplicación, de 14:00 a 20:00 h. El muestreo se realizó en cada oveja mediante el catéter izquierdo. El volumen de sangre por muestra fue de 4 mL y se colocó en un tubo sin anticoagulante. Inmediatamente después, las muestras se centrifugaron a 693 g durante 15 min (2500 rpm en centrifuga Solbat C-600) y el

siero sanguíneo obtenido se almacenó a -20 °C. Posteriormente, se llevó a radioinmunoanálisis para determinar la concentración de LH.

2.3.5. Determinación de LH

La determinación de LH se hizo por el método descrito por Arrieta et al. (2006). Se utilizó la hormona luteinizante ovina (oLH-1-2), del *National Institute of Arthritis, Diabetes and Digestive and Kidney Disease*, como marcador en el radioinmunoanálisis. La sensibilidad del ensayo fue de 0.03 ng mL⁻¹. El coeficiente de variación intra-ensayo e inter-ensayo fueron de 2.6 y 6.3 %, respectivamente.

2.3.6. Análisis estadístico

Las variables de respuesta fueron el peso vivo de la oveja, la frecuencia de secreción pulsátil, la amplitud de los pulsos y la concentración de LH; también se determinó la respuesta integral de secreción de LH por medio del área bajo la curva (AUC). Un pulso de LH se determinó como aquel que excedió dos desviaciones estándar (SD) a la medición anterior, aunque dos pulsos de LH consecutivos fueron considerados como uno sólo; la amplitud del pulso se determinó como la diferencia entre el valor inicial de LH y el máximo del pulso (Gordon et al., 1987). Se calculó la AUC por el método del trapecio y la unidad de tiempo fue un minuto. El análisis de peso vivo de las ovejas se realizó con el PROC MIXED (SAS 9.0; SAS Institute; Cary, NC, USA). El efecto de la Kp y el tipo de amamantamiento en las variables relacionadas con la secreción de LH se analizó utilizando periodos (antes y después) por medio del PROC MIXED. La comparación de las medias se hizo con la prueba de Tukey.

2.4. Resultados

2.4.1. Frecuencia de secreción de LH

No se encontró efecto de interacción de amamantamiento x Kp x periodo con el tipo de amamantamiento y el periodo de muestreo en la frecuencia de secreción de LH ($p > 0.05$, Cuadro 1); tampoco se encontraron efectos de la interacción amamantamiento x Kp y tipo de amamantamiento, y amamantamiento x periodo de muestreo ($p > 0.05$). Sin embargo, el efecto principal del amamantamiento controlado incrementó la frecuencia de secreción de LH ($p \leq 0.026$).

Cuadro 1. Frecuencia de secreción de LH en ovejas en anestro postparto por tipo de amamantamiento y aplicación de kisspeptina (Kp).

<i>Amamantamiento</i>	<i>n</i>	<i>Solución salina(S)</i>		<i>Kisspeptina</i>		<i>E. principal</i>
		Antes	Después	Antes	Después	
Continuo	4	1.00±0.41	1.25±0.25	1.50±0.29	3.50±0.65	1.81±0.32 ^a
Controlado	4	2.25±0.48	2.25±0.25	1.75±0.25	4.25±0.75	2.63±0.33 ^b

S: 3 mL de solución salina por 6 h; Kp: 120 µg de Kp en 3 mL de S por 6 h; antes: 6 h de muestreo cada 15 min antes del inicio de S o Kp; después: 6 h de muestreo cada 15 min a partir del inicio S o Kp. ^{a, b}: Letras distintas indican diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$). Antes y después son los dos periodos de muestreo del experimento en cada tratamiento.

La frecuencia de secreción de LH cambió con la aplicación de la Kp (Cuadro 2; Figura 6). La Kp incrementó la frecuencia de secreción de LH en comparación con la solución salina ($p \leq 0.006$). Hubo interacción entre el factor Kp y el periodo de muestreo ($p \leq 0.007$), ya que la frecuencia, antes del inicio de la aplicación de la solución salina o Kp, fue similar ($p > 0.05$), pero incrementó con la Kp respecto a la encontrada antes ($p \leq 0.002$) y comparando con la encontrada después, en el tratamiento con solución salina ($p \leq 0.003$). La mitad de las ovejas que recibieron Kp tuvieron al menos 5 pulsos 6 h^{-1} .

Cuadro 2. Frecuencia de secreción de LH en ovejas en anestro postparto por aplicación de kisspeptina (Kp) y periodo de muestreo.

	<i>Periodo^z</i>		<i>E. principal</i>
	Antes	Después	
<i>Solución salina (S)</i>	1.63±0.38 ^{ae}	1.75±0.25 ^{ae}	1.69±0.22 ^e
<i>Kisspeptina</i>	1.63±0.18 ^{ce}	3.88±0.48 ^{df}	2.75±0.38 ^f
<i>E. principal</i>	1.63±0.20 ^a	2.81±0.38 ^b	

S: 3 mL de solución salina por 6 h; Kp: 120 µg de Kp en 3 mL de S por 6 h; antes: 6 h de muestreo cada 15 min antes del inicio de S o Kp; después: 6 h de muestreo cada 15 min a partir del inicio S o Kp. ^z Por fila (a, b; $p \leq 0.05$ o c, d; $p \leq 0.01$), o columna (e, f; $p \leq 0.05$) letras distintas indican diferencias estadísticas.

2.4.2. Amplitud de los pulsos de secreción de LH

La Kp, el tipo de amamantamiento, el periodo de muestreo o cualquiera de las interacciones de los factores evaluados no afectaron la amplitud de los pulsos de secreción de LH ($p > 0.05$, Cuadro 3). La amplitud media fue 2.92 ± 0.20 ng mL⁻¹.

Cuadro 3. Amplitud de pulsos de LH en ovejas en anestro postparto por tipo de amamantamiento y aplicación de kisspeptina (Kp).

<i>Amamantamiento</i>	<i>Solución salina(S)</i>		<i>Kisspeptina</i>		E. principal
	Antes	Después	Antes	Después	
Continuo	3.54±0.74	2.98±0.42	2.57±0.37	2.77±0.46	2.96±0.25
Controlado	2.69±0.62	2.39±0.57	3.37±0.49	3.39±0.47	2.95±0.29
E. principal	2.90±0.30		3.02±0.24		

S: 3 mL de solución salina por 6 h; Kp: 120 µg de Kp en 3 mL de S por 6 h; antes: 6 h de muestreo cada 15 min antes del inicio de S o Kp; después: 6 h de muestreo cada 15 min a partir del inicio S o Kp. ^{a, b}: Letras distintas indican diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$).

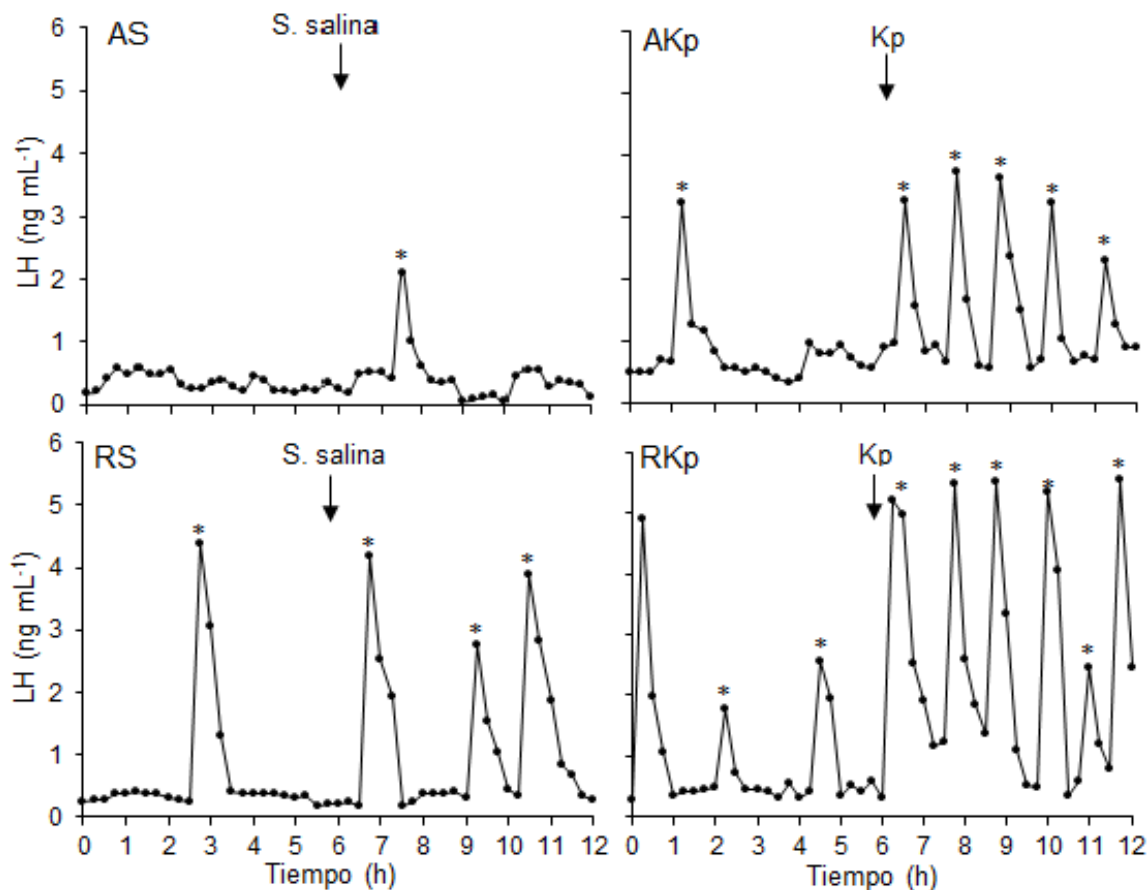


Figura 6. Secreción de LH de una oveja, elegida al azar, en anestro postparto con amamantamiento continuo y solución salina (3 mL; AS), amamantamiento continuo y 120 µg de kisspeptina (3 mL; AKp), amamantamiento controlado y solución salina (3 mL; RS), amamantamiento controlado y 120 µg de kisspeptina (3 mL; RKp). La flecha indica el inicio del tratamiento; los asteriscos a los pulsos detectados.

2.4.3. Área bajo la curva

La AUC fue mayor en ovejas con Kp ($p \leq 0.048$; Figura 7A), y menor antes vs después de la aplicación ($p \leq 0.013$). La AUC se afectó por la interacción del factor Kp y periodo de muestreo ($p \leq 0.010$; Figura 7B), debido a que fue similar antes y después, sin Kp ($p > 0.05$), pero altamente significativa con Kp ($p \leq 0.006$).

El tipo de amamantamiento o la interacción de tipo de amamantamiento y Kp, tipo de amamantamiento y periodo, o la triple interacción de tipo de amamantamiento, Kp y periodo no afectaron la UAC ($p > 0.05$).

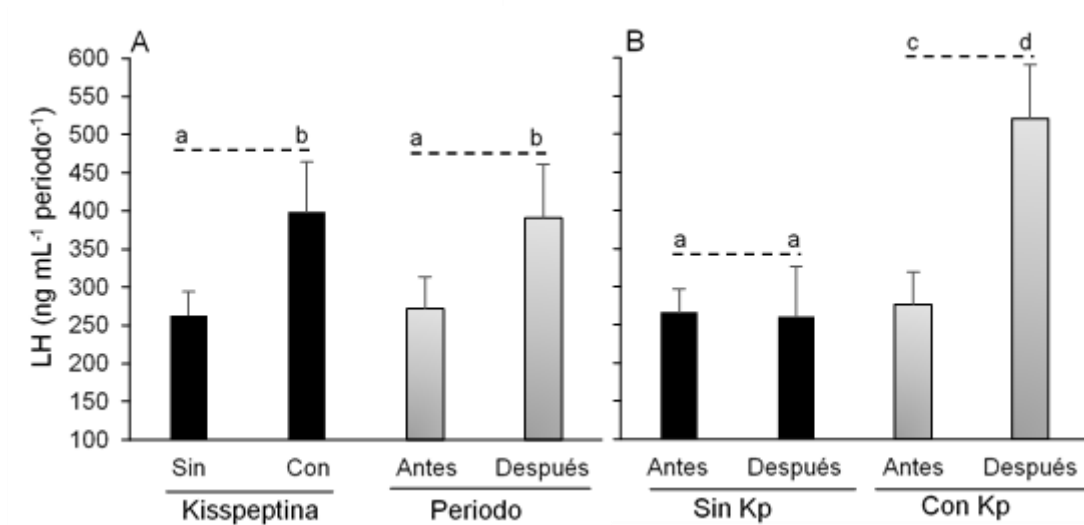


Figura 7. Respuesta integral de secreción de LH (UAC) por efecto de la aplicación de kissseptina (Kp) a ovejas en anestro postparto. A, interacción Kp x periodo; B, efecto global de Kp x periodo. Sin Kp: 3 mL de solución salina por 6 h; Con Kp: 120 µg de Kp en 3 mL de S por 6 h; antes: 6 h de muestreo cada 15 min antes del inicio de S o Kp; después: 6 h de muestreo cada 15 min a partir del inicio S o Kp. Barras con diferente letra (a, b: $p \leq 0.05$; c, d: $p \leq 0.01$) son estadísticamente diferentes.

2.4.4. Concentración de LH

La concentración de LH fue superior en ovejas que recibieron Kp (1.113 ± 0.14 vs 0.724 ± 0.07 ng mL⁻¹; $p \leq 0.04$), sin embargo, esta no fue diferente entre el amamantamiento controlado y el continuo (1.014 ± 0.13 vs 0.823 ± 0.11 ng mL⁻¹; $p > 0.05$). No hubo efecto de interacción de Kp y tipo de amamantamiento en la concentración de LH ($p > 0.05$).

2.4.5. Peso de las ovejas

El peso de las ovejas sólo fue diferente en el tiempo de cada pesaje ($p \leq 0.010$; Figura 8). No se afectó el peso por el tipo de amamantamiento ($p > 0.05$) y la Kp ($p > 0.05$), la interacción entre ambos factores ($p > 0.05$), o la triple interacción entre el tipo de amamantamiento, la Kp y el tiempo ($p > 0.05$).

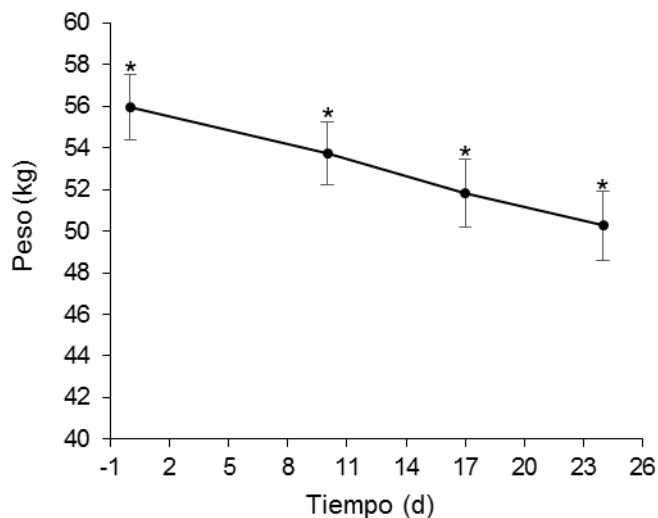


Figura 8. Cambio de peso de ovejas en anestro postparto tratadas con kisspeptina y amamantamiento controlado o continuo ($p \leq 0.010$).

2.5. Discusión

Los resultados muestran que la aplicación de Kp i.v. en ovejas en anestro postparto puede incrementar la secreción pulsátil de LH. Este efecto no fue influido por el amamantamiento controlado. Por otra parte, el amamantamiento controlado aumentó la secreción pulsátil de LH en comparación con el continuo.

La frecuencia de secreción pulsátil de LH, antes de la aplicación de la Kp, fue similar entre grupos ($p > 0.05$; Cuadro 1). Además, esta frecuencia fue baja ($0.25 \text{ pulsos h}^{-1}$; $1.5 \text{ pulsos } 6 \text{ h}^{-1}$), en comparación con la reportada como necesaria en la etapa de desarrollo de folículos preovulatorios con 1 h^{-1} (Wright et al., 1981). Por otro lado, la frecuencia encontrada en este estudio coincide con la de otros estudios en ovejas que amamantan (0.17 a 0.33 h^{-1} ; Clarke et al., 1984; Mandiki et al., 1990). Sin embargo, fue mayor a la que se observa en ovejas durante el anestro estacional (0.08 h^{-1} ; Gallegos-Sanchez et al., 1998). La baja frecuencia de LH en este estudio no permitiría el desarrollo folicular final y sería causa de anestro, tal como se plantea en otros estudios (Clarke et al., 1984; McNeilly, 2001). Durante la lactancia el E2 inhibe la frecuencia de secreción de la LH en ausencia de progesterona. Se ha encontrado que en ovejas ovariectomizadas (OVX) más un implante de E2 durante el anestro postparto, la

frecuencia de secreción de LH se incrementa (de 0.06 a 0.53 h⁻¹) 60 h después del retiro del implante de E2 (Wright et al., 1981); en ratas lactando ocurre algo similar (Yamada et al., 2012). La acción de E2 a nivel de neuronas productoras de GnRH (Herbison and Pape, 2001), parece ocurrir vía neuronas KNDy (Kp, neuroquinina B y dinorfina; Lehman et al., 2010) ubicadas en el ARC, ya que la Kp expresa ER α , y el ARC se ha relacionado como sitio de acción del E2 (Smith et al., 2006). Actualmente, se desconoce la interacción neuronal que el estímulo del amamantamiento afecta para inhibir la secreción pulsátil de GnRH/LH. Se sabe que el estímulo inicial es en la glándula mamaria e involucra a la vista y al olfato (Cutshaw et al., 1992), viaja por complejas redes neuronales hasta el sistema nervioso central y es posible que la inhibición ocurra en el ARC, ya que en ratas se ha demostrado que el amamantamiento inhibe la expresión de ARNm para Kp en este núcleo (Yamada et al., 2007), también inhibe a la NKB, la cual estimula la secreción de Kp (True et al., 2011). Otra posibilidad es que el amamantamiento incremente la expresión de dinorfina en las KNDy del ARC y como consecuencia inhiba la secreción de Kp-NKB, se ha observado que aplicaciones i.c.v. del antagonista de opioides *k* incrementa la frecuencia de MUA en el ARC (Wakabayashi et al., 2010), y aplicado en el ARC, incrementa la frecuencia de LH (Goodman et al., 2013). En resumen, la secreción pulsátil de LH disminuye durante el amamantamiento, en ovejas en anestro postparto podría deberse, al efecto inhibitorio del E2 y del amamantamiento a nivel neuronas KNDy en el ARC. Esto debido a que las neuronas KNDy expresan ER α y el amamantamiento inhibe la expresión de ARNm para Kp y NKB, además podría promover la expresión de dinorfina; todo ello contribuiría a la inhibición de Kp y como consecuencia provocaría una disminución en la frecuencia de secreción de GnRH/LH.

La frecuencia de secreción pulsátil de LH incrementó 1.3 veces más que la inicial, con la aplicación de Kp ($p \leq 0.006$), y una vez más que el grupo testigo, después de la aplicación de la solución salina ($p \leq 0.014$). Además, la mitad de las ovejas que manifestaron cambios en la frecuencia de LH por la aplicación de Kp (al menos 0.83 h⁻¹). No se encontraron datos donde se haya evaluado la secreción pulsátil de LH en ovejas en anestro postparto estimuladas con Kp. En ovejas prepúberes, la aplicación de una dosis similar de Kp cambió la frecuencia de secreción de LH de 0.5 h⁻¹ a 1 h⁻¹

(Redmond et al., 2011); la misma tendencia ocurrió en ratas amamantando (Yamada et al., 2007). El incremento promedio de la frecuencia de LH en nuestro estudio fue de 0.25 h^{-1} a 0.58 h^{-1} y difiere considerablemente. A pesar de que este incremento es bajo respecto a otros estudios, dos pulsos podrían ser de alta relevancia biológica, ya que acrecienta 130 % el aporte de LH a los folículos, pero además, al menos en la mitad de las ovejas tratadas aumentaron la secreción de LH 230 %. La aplicación de Kp estimula la secreción de GnRH (Caraty et al., 2007) mientras que, la aplicación del antagonista p234 de Kp inhibe la secreción de LH y el pico preovulatorio en ratas (Pineda et al., 2010). La aplicación de Kp también incrementa la secreción de E2 en ovejas en anestro estacional; un estudio mostró que el E2 aumentó de 0.79 ± 0.12 a $4.26 \pm 0.47 \text{ ng mL}^{-1}$ con 18 h de aplicación continua de Kp (Sébert et al., 2010). La acción directa de Kp en hipófisis en la secreción de LH es controversial (Caraty et al., 2012). No hay una explicación lógica para menor respuesta a la aplicación de Kp, ya que el peso inicial y el número de crías amamantadas por oveja fueron similares. Aunque el balance energético negativo podría afectar la secreción de LH (Smith and Grove, 2002), no sería factor en este estudio, ya que los datos de peso de las ovejas de los distintos tratamientos fueron similares. Aun así, cabe la posibilidad que, en unas ovejas, la pérdida de 10 % del P.V. pudiera ser suficiente para inhibir la secreción pulsátil de GnRH/LH junto con el amamantamiento y reducir la respuesta a la aplicación de Kp.

La amplitud de los pulsos de LH no cambió por la aplicación de Kp en ovejas en anestro postparto (media= 2.96 ng mL^{-1} ; $p > 0.05$). Este resultado contrasta con la respuesta en ovejas prepúberes, en las cuales la Kp aumentó la amplitud de los pulsos de 3.1 a 5.3 ng mL^{-1} ($p \leq 0.05$; Redmond et al., 2011). Sin embargo, parece que el incremento de la amplitud es más importante para el pico preovulatorio que en la fase folicular (Martin et al., 1987) esto porque al parecer no cambia a lo largo del ciclo estral (Clarke et al., 1987). En ese sentido, Knights et al. (2002) encontraron que, en ovejas con frecuencia de secreción de LH alta (0.96 h^{-1}) y otro con baja (0.33 h^{-1}), pero con amplitud similar (4.5 ng mL^{-1} ; $p > 0.05$), las primeras ovularon 100 %, mientras en el segundo grupo ninguna ovuló.

El análisis de la AUC confirma el incremento de LH en la circulación sanguínea por efecto de la aplicación de Kp (Figura 7). La UAC, antes de la aplicación de Kp fue

similar ($p>0.05$), pero incrementó 88 % con la infusión de Kp ($p\leq 0.006$) y 100 % comparando con el grupo de solución salina ($p\leq 0.019$). La concentración de LH en plasma fue mayor en ovejas que recibieron Kp en comparación con las que se les aplicó solución salina ($p\leq 0.04$). En ovejas en anestro estacional, la concentración de LH cambió de 0.33 a 2.83 ng mL⁻¹ durante las primeras 5 h de la infusión de Kp, con dosis similar a la utilizada en nuestro estudio (Sébert et al., 2010). En ratas lactando la concentración de LH varió de <1 ng mL⁻¹ a ~2 ng mL⁻¹ (Yamada et al., 2007).

El amamantamiento controlado incrementa la secreción pulsátil de LH por sí mismo, ya que induce la ovulación en ovejas postparto (Camacho et al., 2008), y se esperaba, en este estudio, que la aplicación de Kp aumentara la frecuencia de LH en menor grado que en amamantamiento continuo. Sin embargo, el tipo de amamantamiento no influyó en el estímulo de la Kp sobre la secreción pulsátil de LH ($p>0.05$). Esto significa que el cambio de la frecuencia debido a la Kp fue similar en ovejas con amamantamiento continuo o controlado. El cambio de la frecuencia de LH en ovejas con amamantamiento continuo fue casi dos veces más (1.125 vs 0.625 pulsos) que en aquellas con amamantamiento controlado ($p>0.05$).

El amamantamiento controlado incrementó 44 % la secreción pulsátil de LH en ovejas en anestro postparto, en comparación con el amamantamiento continuo. Este incremento es pequeño si se recuerda que se requiere de ~1 h⁻¹ en los folículos preovulatorios (Wright et al., 1981). No obstante, Mandiki et al. (1990) no encontraron diferencia en la secreción pulsátil de LH en el día 18 postparto, entre ovejas con amamantamiento continuo o controlado (0.33 vs 0.42 h⁻¹; $p>0.05$), sin embargo, el amamantamiento controlado ocurría tres veces al día y esto pudo reducir el efecto del control del amamantamiento. El efecto del amamantamiento controlado se evalúa, más frecuentemente, tomando como referencia la ovulación. En ovejas Pelibuey, el control del amamantamiento incrementa el porcentaje de ovulación de 35 a 57 %, los primeros 60 d postparto, amantando dos veces al día (Morales-Terán et al., 2011). La disminución de la frecuencia de amamantamiento a dos veces diarias, podría estar reduciendo el efecto inhibitorio del amamantamiento en la expresión de Kp en el ARC, como aparentemente ocurre en la rata (True et al., 2011), lo cual incrementaría la

secreción de Kp y con ello la secreción pulsátil de GnRH/LH necesaria para la ovulación.

El peso de las ovejas en este estudio fue similar entre todos los grupos (Figura 3). Es posible pensar que este no influyó en los cambios de secreción pulsátil de LH debidos a Kp o tipo de amamantamiento, y el impacto fue similar para todos los tratamientos. El cambio de peso, del momento del parto al fin del experimento (día 24), fue del 10 % del peso vivo. El efecto de la caída en el P.V. de las ovejas parece no afectar la capacidad reproductiva; según Lozano et al. (1998), la pérdida de 12 % del P.V. no disminuye la frecuencia de secreción de LH en ovejas en anestro postparto.

2.6. Conclusiones

En conclusión, la aplicación de kisspeptina i.v. incrementa la secreción pulsátil de LH de manera similar, en ovejas Pelibuey en anestro postparto, con amamantamiento continuo o controlado.

CAPÍTULO III. PICO PREEVULATORIO DE LH EN OVEJAS ANÉSTRICAS POSTPARTO CON KISSPEPTINA Y EFECTOS SOCIOSEXUALES

3.1. Resumen

El objetivo de esta investigación fue evaluar la aplicación de kisspeptina con efecto macho o amamantamiento controlado, en la inducción del pico preovulatorio y la concentración de LH de ovejas en anestro postparto. Se utilizaron 40 ovejas Pelibuey, múltiparas, con 10 días de paridas y amamantando a una cría. El día 10 postparto se formaron 4 grupos de ovejas: amamantamiento continuo (*A*; n=8); *A* con efecto macho (*AM*; n=12); amamantamiento controlado (*R*; n=8); *R* con efecto macho (*RM*; n=12). El día 19, a cada oveja le fue colocado un catéter en cada vena yugular. Al finalizar, las ovejas se colocaron en jaulas individuales, con acceso a agua, alimento y espacio para echarse. Cada grupo de ovejas se dividió en 2 para aplicarles 12 mL de solución salina (*S*) o 12 mL de *S* más 480 µg de *Kp* en 24 h por infusión continua. Las combinaciones de tratamiento finales fueron: *A* más *S* (*AS*; n=4); *A* más *Kp* (*AKp*; n=4); *AM* más *S* (*AMS*; n=6); *AM* más *Kp* (*AMKp*; n=6); *R* más *S* (*RS*; n=4); *R* más *Kp*; (*RKp*; n=4); *RM* más *S* (*RMS*; n=6); *RM* más *Kp* (*RMKp*; n=6). El día 10 a las 14:00 h se inició la aplicación de la *S* y *Kp* mediante una bomba de infusión constante conectada al catéter derecho por una manguera plástica. La tasa de aplicación fue 500 µL h⁻¹ y 20 µg h⁻¹ de *Kp*. Se utilizó *Kp*-10 bovina (YNWNSFGLRY). Los días 20 y 21 del experimento se tomaron muestras sanguíneas para medir LH cada 2 h, desde 6 h antes de la infusión hasta 6 h después del final de la misma. El 65 % de las ovejas con *Kp* tuvieron pico preovulatorio, y de estas 50 % incluyó efecto macho. Hubo efecto simple del factor (*Kp* $p \leq 0.0005$) y la interacción *Kp*-efecto macho ($p \leq 0.002$). La interacción *Kp*-efecto macho-amamantamiento controlado no fue significativa ($p = 0.0629$), pero en el tratamiento *RMKp* hubo el 100 % de ovejas con pico preovulatorio. La concentración de LH incrementó con la aplicación de *Kp* y también con el efecto macho. Hubo triple interacción entre *Kp*-efecto macho-amamantamiento controlado en la concentración de LH ($p \leq 0.0011$). Se puede concluir que la *Kp* induce el pico preovulatorio de LH en ovejas en anestro postparto, la incidencia incrementa con el efecto macho, pero no con el amamantamiento controlado; esta misma tendencia ocurre con la concentración de LH.

Palabras claves: kisspeptina, LH, efecto macho, amamantamiento controlado, postparto.

3.2. Introducción

El amamantamiento atrasa el reinicio de la actividad reproductiva postparto de las ovejas (McNeilly, 2001). Este suprime la secreción pulsátil de LH, la cual es necesaria en el crecimiento del folículo preovulatorio, el pico preovulatorio y la ovulación (Acosta et al., 1983; Clarke et al., 1984). El estímulo del amamantamiento se transmite desde la glándula mamaria, por vías desconocidas, hasta el hipotálamo (Cutshaw et al., 1992) y posiblemente llega al núcleo arcuato (ARC) a inhibir a las neuronas GnRH (Yamada et al., 2007). Esto porque el ARC se activa durante el amamantamiento (hay síntesis de c-fos) y además, se ha propuesto como el sitio desde donde se regula la secreción de GnRH (Smith y Grove, 2002). Sin embargo, se desconoce cómo inhibe a las neuronas GnRH. Se sabe que los péptidos opioides participan, al parecer como intermediarios, en la inhibición de la secreción de LH durante el amamantamiento (Cosgrove et al., 1993; Lozano et al., 1998). Por otra parte, la Kp, molécula codificada del gen Kiss1 y sintetizada por tejidos como el cerebral (Kotani et al., 2001; Lehman et al., 2010), parece tener las características para ser intermediaria del efecto del amamantamiento.

La mayor concentración de cuerpos neuronales Kp se encuentra en el área preóptica (POA) y el ARC (Smith et al., 2007). Estos emiten axones hacia los cuerpos neuronales GnRH del POA (Clarkson y Herbison, 2006), además, el ARC envía axones a la eminencia media, donde podrían estar regulando la secreción de GnRH al sistema porta (Jeremy T. Smith et al., 2011). En ratas, el amamantamiento inhibe la expresión del gen Kiss1 en el ARC (Yamada et al., 2007), además inhibe a la neuroquinina B (NKB). La NKB, según la teoría KNDy (Lehman et al., 2010a), estimula la secreción de Kp (True et al., 2011). Por otro lado, la dinorfina (Dyn) se inhibe con el antagonista *k* de opioides e incrementa la frecuencia de actividad multieléctrica neuronal (MUA) en el ARC, y se asocia con la supresión de Kp-NKB del ARC y la secreción de GnRH/LH (Wakabayashi et al., 2010). Cabe la posibilidad de que el amamantamiento utilice esta misma vía para suprimir la secreción de LH, es decir que la señal llegue las neuronas Dyn y esta suprima a NKB-Kp. En ratas, el amamantamiento inhibe la secreción pulsátil

de LH, mientras que la aplicación de Kp i.c.v. la restaura (Yamada et al., 2007). En ovejas, la aplicación de Kp estimula la secreción de GnRH/LH durante el anestro estacional, la época reproductiva (Caraty et al., 2007) e inclusive en la pubertad (Redmond et al., 2011). En relación con esta evidencia, es posible que la aplicación de Kp pueda restaurar la secreción de GnRH/LH, y al igual que en el anestro estacional, induzca el pico preovulatorio en anestro postparto.

Los efectos sociosexuales son una alternativa para reducir el efecto del amamantamiento en el anestro postparto. Por su parte, el amamantamiento controlado induce la ovulación en ovejas en anestro postparto (Morales et al., 2004; Pérez-Hernández et al., 2009). Esto ocurre, presumiblemente por la reducción de la sensibilidad del hipotálamo al efecto del amamantamiento (Acosta et al., 1983). El efecto macho es una técnica que influye en el retorno a la actividad reproductiva de ovejas en anestro postparto (Salloum y Claus, 2005; Morales-Terán et al., 2011). El macho, a través de las feromonas (Fabre-Nys et al., 2015), aumenta la secreción pulsátil de LH, y como consecuencia, puede inducir el pico preovulatorio y la ovulación en unas horas o días después de su aplicación (Martin y Scaramuzzi, 1983). Sin embargo, a pesar de que el efecto macho y amamantamiento controlado pueden inducir con el tiempo la ovulación en la mayoría de las ovejas, aún persiste un factor desconocido que bloquea la secreción de GnRH/LH (Morales-Terán et al., 2011).

El pico preovulatorio en las ovejas es la combinación de aumento de frecuencia de secreción de LH y de la amplitud de los pulsos (Martin et al., 1987), y es la baja frecuencia la responsable de que el pico no ocurra en ovejas amamantando. El efecto macho incrementa la frecuencia de LH y finalmente induce el pico preovulatorio y la ovulación después de varios días (Martin y Scaramuzzi, 1983; Delgadillo et al., 2009). Hay expresión de ARNm de Kiss1 en la amígdala de ratas, la cual forma parte de la ruta que sigue la señal del efecto macho; se especula que existe relación entre el efecto macho y la Kp en la secreción de GnRH/LH (Cravo et al., 2011; Kim et al., 2011). La aplicación de 20 $\mu\text{g h}^{-1}$ de Kp vía sanguínea ha inducido el pico preovulatorio en ovejas en anestro estacional (Caraty et al., 2007; Sébert et al., 2010). Por ello, en este estudio se evaluó el efecto de la aplicación de Kp con efecto macho o amamantamiento

controlado, en la inducción del pico preovulatorio y la concentración de LH en ovejas en anestro postparto.

3.3. Materiales y métodos

3.3.1. Localización del experimento

El experimento se realizó en el mes de agosto, que corresponde a la época reproductiva de la oveja. El sitio fue el Laboratorio de Reproducción de Ovinos y Caprinos del Colegio de Postgraduados, ubicado en Montecillo, Texcoco, estado de México. Se localiza entre 98°53'O y 19°29'N, a una altitud de 2240 m. El clima es templado subhúmedo con lluvias en verano Cb (wo)(w)(i)g, precipitación de 636.5 mm y temperatura media anual de 15.2° C (García, 2004).

3.3.2. Animales y alimentación

Se utilizaron 40 ovejas Pelibuey, multíparas, con 10 días de paridas (día 1 del experimento) y amamantando a una cría. El peso de las ovejas fue 53.8±0.8 kg y se alimentaron con heno de avena (2 kg oveja⁻¹ d⁻¹) más concentrado (500 g oveja⁻¹ d⁻¹) con 15.2 % de PC y 2.5 Mcal de EM kg⁻¹. Los corderos fueron amamantados y consumieron alimento iniciador a libre acceso. Las ovejas y corderos se alojaron en estabulación.

3.3.3. Tratamientos

El día 1 del experimento se formaron 4 grupos de ovejas: amamantamiento continuo (A; n=8); A con efecto macho (AM; n=12); amamantamiento controlado (R; n=8); R con efecto macho (RM; n=12). En el amamantamiento continuo, madres y crías permanecieron juntas. En el amamantamiento controlado, las madres y las crías se separaron, y el amamantamiento ocurría 2 veces al día (8:00 y 15:00 h, por 30 min en cada ocasión). El efecto macho se aplicó con sementales enteros con mandil 2 veces al día (8:30 y 15:30 h). Los 4 sementales utilizados se rotaron a diario en cada grupo de ovejas.

El día 9 del experimento, a cada oveja le fue colocado un catéter (1.1 mm de diámetro interno; BD Insyte, BD Vialon Material) en cada vena yugular. Al finalizar, las ovejas se colocaron en jaulas individuales, con acceso a agua, alimento y espacio suficiente para

echarse. En los grupos *A* y *AM*, las crías tuvieron acceso ilimitado a la jaula de la madre, mientras que las del *R* y *RM* se llevaron a la jaula para mamar. Los 4 grupos se dividieron en 2 para aplicarles 12 mL de solución salina (S) o 12 mL de S más 480 µg de Kp por 24 h, mediante infusión continua. Esta dosis y periodo han sido aplicadas para inducir con éxito el pico preovulatorio en ovejas en anestro estacional (Sébert *et al.*, 2010). Las combinaciones de tratamiento finales fueron: *A* más S (*AS*; n=4); *A* más Kp (*AKp*; n=4); *AM* más S (*AMS*; n=6); *AM* más Kp (*AMKp*; n=6); *R* más S (*RS*; n=4); *R* más Kp; (*RKp*; n=4); *RM* más S (*RMS*; n=6); *RM* más Kp (*RMKp*; n=6). El día 10, a las 14:00, se inició la aplicación de la S y Kp mediante una bomba de infusión constante (NE-300, New Era Pump Systems) conectada al catéter derecho por una manguera plástica (1.2 m de longitud y 2 mm de diámetro interno). La tasa de aplicación fue 500 µL h⁻¹ y 20 µg h⁻¹ de Kp (Caraty *et al.*, 2007). Se utilizó Kp-10 bovina (YNWNSFGLRY; Phoenix Pharmaceuticals, Inc., USA). La Kp se aplicó el día 20 postparto para esperar a que el efecto del amamantamiento controlado y el efecto macho se establecieran. A las 14:00 del día 10, se expusieron las ovejas por última vez al efecto macho. Para ello el macho se acercó a las jaulas de las ovejas.

3.3.4. Toma de muestras

Las ovejas se pesaron al parto y a los 10, 17 y 24 d postparto para dar seguimiento a sus pesos vivos. El día 10 del experimento se tomaron muestras sanguíneas cada 2 h, desde 6 h antes del inicio de la infusión hasta 6 h después del final de la misma (día 11). Se obtuvieron 4 mL de sangre por muestra desde el catéter izquierdo y se colocó en un tubo sin anticoagulante. Inmediatamente después, la muestra se centrifugó a 693 g durante 15 min; el suero sanguíneo obtenido se almacenó a -20 °C. Posteriormente, este se analizó por radioinmunoanálisis para determinar la concentración de LH.

3.3.5. Determinación de LH

La determinación de LH se hizo por un método previamente descrito (Arrieta *et al.*, 2006). Se utilizó la hormona luteinizante ovina (oLH-1-2), del *National Institute of Arthritis, Diabetes and Digestive and Kidney Disease*, como marcador en el radioinmunoanálisis. La sensibilidad del ensayo fue de 0.03 ng mL⁻¹. El coeficiente de variación intra-ensayo e inter-ensayo fueron de 2.6 y 6.3 %, respectivamente.

3.3.6. Análisis estadístico

Se evaluó la concentración de LH, la incidencia, el pico máximo y el tiempo de inicio del pico preovulatorio, y el cambio de peso de las ovejas. La concentración de LH se comparó con muestras de 6 h antes del inicio de la infusión (periodo 1) y 6 h a partir del inicio de la misma (periodo 2). El pico preovulatorio fue el incremento en la concentración de LH superior en 2 veces a la concentración basal, en 2 muestreos consecutivos y que excediera 10 ng mL^{-1} al menos en una muestra; el inicio del pico preovulatorio fue cuando en una primera muestra la concentración de LH superó los 10 ng mL^{-1} o en la primera de las 2 muestras que superaran el doble de la concentración basal; el pico máximo del pico preovulatorio fue el valor máximo de LH en el pico preovulatorio (Caraty et al., 2007). La concentración y el peso se analizaron con el procedimiento Mixed del SAS. La comparación de las medias se hizo con la prueba de Tukey. La incidencia del pico preovulatorio se comparó con el procedimiento Genmod del SAS para distribución binomial (SAS 9.0; SAS Institute; Cary, NC, USA).

3.4. Resultados

3.4.1. Concentración de LH

La concentración de LH en el periodo 1 fue similar entre todos los grupos (Figura 9. I y II; $p > 0.05$). Esta se mantuvo sin cambios significativos en las 6 horas de muestreo, dentro de cada tratamiento ($p > 0.05$). La concentración de LH en el periodo 2 cambió con la aplicación de Kp y el efecto macho. En los tratamientos con S (Figura 9.I), RMS fue superior a AS ($p \leq 0.001$), pero similar a los demás tratamientos ($p > 0.05$); AS, RS y AMS fueron similares ($p > 0.05$). Por tiempo de muestreo, AMS y RMS incrementaron la concentración de LH del tiempo 0 al 2 y 4 ($p \leq 0.001$), pero volvió a niveles del periodo 1 en la hora 6 ($p > 0.05$). Estos niveles de LH fueron diferentes a AS en el tiempo 2 y 4 ($p \leq 0.01$), además, RMS fue mayor a RS en el tiempo 2 ($p \leq 0.006$). En los tratamientos con Kp (Figura 9.II), la concentración de LH de RMKp en el periodo difirió respecto a los demás tratamientos ($p \leq 0.001$), mientras que entre estos últimos no hubo diferencia ($p > 0.05$). La concentración de LH por tiempo de muestreo cambió significativamente respecto al tiempo 0 en todos los tratamientos con Kp y se mantuvo alta durante las 6 h de la comparación ($p \leq 0.001$). La concentración de LH fue en el periodo 2 en RMS fue

menor que RMKp ($p \leq 0.001$) e igual a AKp, RKp y AMKp ($p > 0.05$); mientras que AMS fue igual a AKp e inferior a RKp, AMKp y RMKp ($p \leq 0.01$). Por último, AS y RS fueron inferiores a todos los tratamientos con Kp ($p \leq 0.01$), excepto RS que fue similar a AKp ($p > 0.05$).

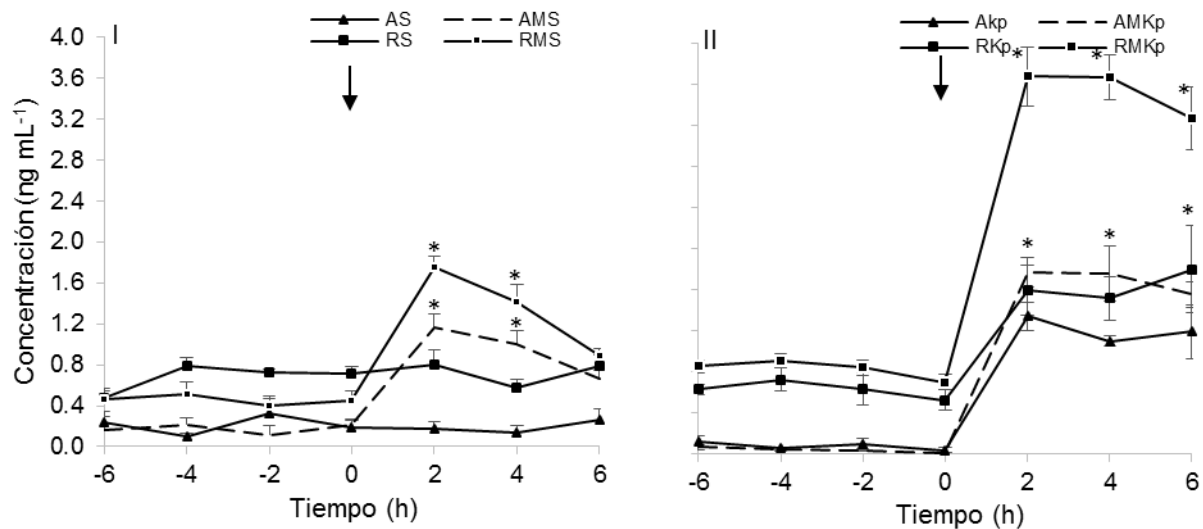


Figura 9. Concentración de LH de ovejas en anestro postparto tratadas con kisspeptina (Kp), efecto macho (M) y amamantamiento controlado (R). A=amamantamiento continuo; S= solución salina. La flecha indica el inicio del M o Kp. I muestra los tratamientos con S; II presenta los tratamientos con Kp. Tiempos de muestreo con el símbolo * son diferentes ($p \leq 0.001$).

3.4.2. Caracterización del pico preovulatorio

Todos los tratamientos con Kp tuvieron ovejas con pico preovulatorio de LH (Cuadro 4; Figura 11). Hubo interacción entre el factor Kp y efecto macho ($p \leq 0.002$; Figura 10). Las ovejas con efecto macho y sin Kp no mostraron pico preovulatorio; en aquellas con solo Kp hubo 38 % de incidencia, mientras que la Kp con efecto macho causó el pico preovulatorio en 83 % de las ovejas. También hubo efecto simple de Kp en el pico preovulatorio de LH (con Kp: 65 %; sin Kp: 0 %; $p \leq 0.0005$).

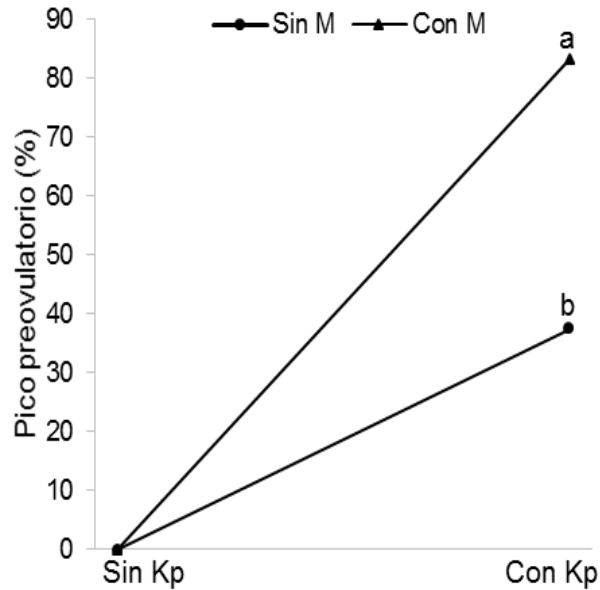


Figura 10. Kisspeptina (Kp) x efecto macho (M) en la incidencia de pico preovulatorio en ovejas anéstricas postparto. a, b son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.0018$).

No hubo efecto simple del tipo de amamantamiento ($p > 0.05$) o efecto macho ($p > 0.05$) en la incidencia de pico preovulatorio de LH. Tampoco existió interacción del tipo de amamantamiento y la Kp ($p > 0.05$), ni la triple interacción entre tipo de amamantamiento, el efecto macho y la Kp ($p > 0.05$).

El tiempo de inicio del pico preovulatorio fue similar entre los grupos (Cuadro 4; Figura 11; $p > 0.05$). El pico máximo de LH del pico preovulatorio varió por oveja de 13.6 a 53.6 ng mL^{-1} , con una media de $31.1 \pm 3.8 \text{ ng mL}^{-1}$, pero no fue diferente entre tratamientos (Cuadro 4; Figura 11; $p > 0.05$).

Cuadro 4. Caracterización del pico preovulatorio de ovejas en anestro postparto tratadas con kisspeptina (Kp), efecto macho (M) o amamantamiento controlado (R).

Tratamiento ¹	Incidencia ²	Tiempo de Inicio (h)	Pico máximo (ng mL ⁻¹)
AKp	1/4	26.0±0.0	36.2±0.0
RKp	2/4	27.0±3.0	44.1±7.4
AMKp	4/6	28.5±4.3	22.6±5.0
RMKp	6/6	25.7±3.2	31.6±6.3
AS	0/4	-	0.2±0.1
RS	0/4	-	0.7±0.1
AMS	0/6	-	0.3±0.1
RMS	0/6	-	0.7±0.1

¹A: amamantamiento continuo; S: solución salina. ²Número de ovejas con pico preovulatorio entre número de ovejas en tratamiento.

La Figura 11 muestra los perfiles de LH y la incidencia de pico preovulatorio de ovejas que solo recibieron Kp, amamantamiento controlado y efecto macho. El grupo de ovejas con el tratamiento RMKp mostró 100 % de incidencia de pico preovulatorio ($p>0.05$).

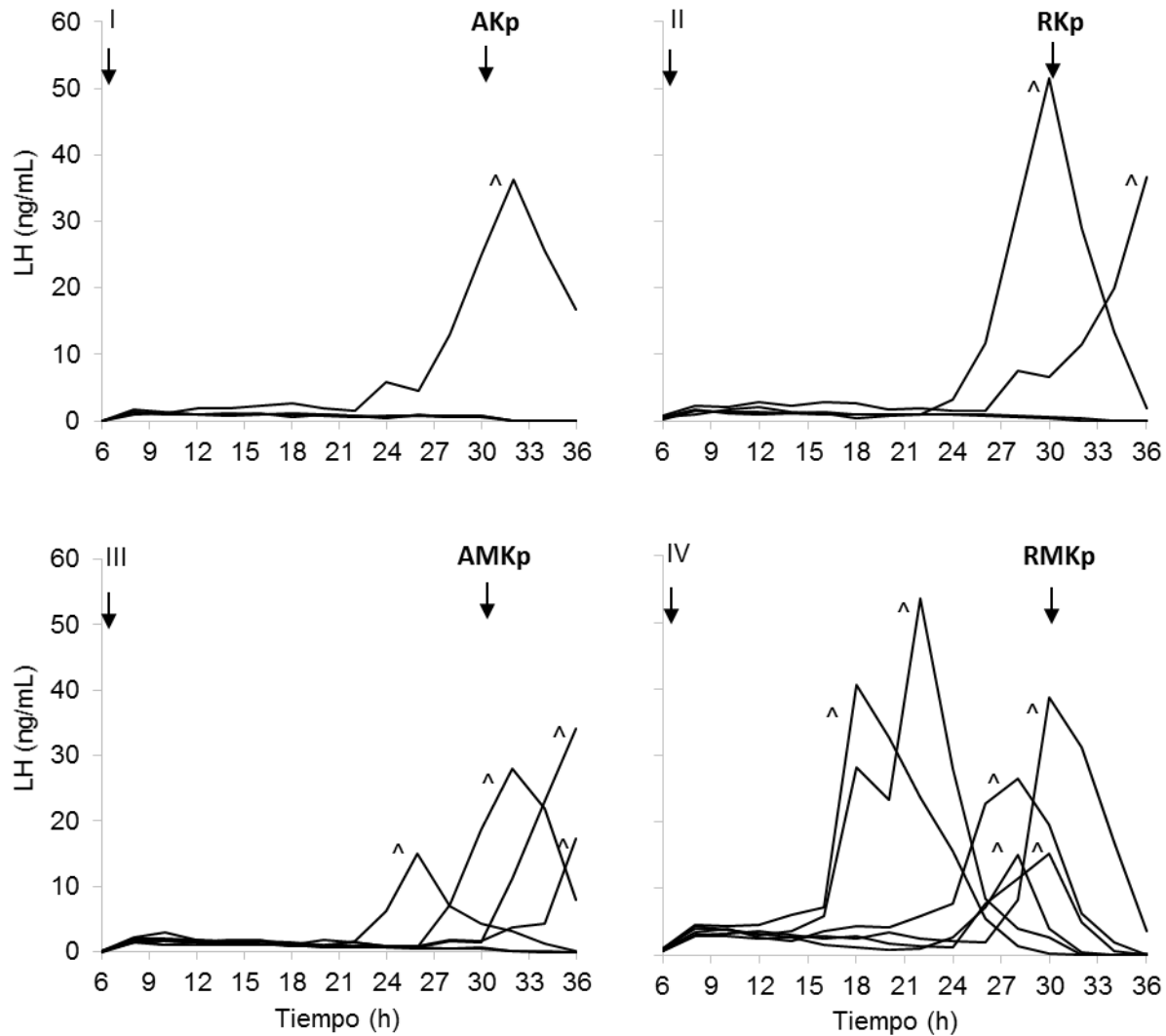


Figura 11. Pico preovulatorio de LH en ovejas en anestro postparto tratadas con kisspeptina (Kp), efecto macho (M), amamantamiento controlado (R). A: amamantamiento continuo. Las flechas indican el inicio y el final de la aplicación de la Kp. ^ indica la ocurrencia de un pico preovulatorio de LH.

3.4.3. Peso de las ovejas

El peso de las ovejas disminuyó significativamente en todos los tiempos de pesaje, desde el día del parto hasta el 24, cuando finalizó el experimento (Figura 12; $p \leq 0.001$). Contrario a ello, no hubo diferencia en el peso en el tiempo entre ninguno de los tratamientos evaluados ($p > 0.05$) y tampoco interacciones significativas ($p > 0.05$).

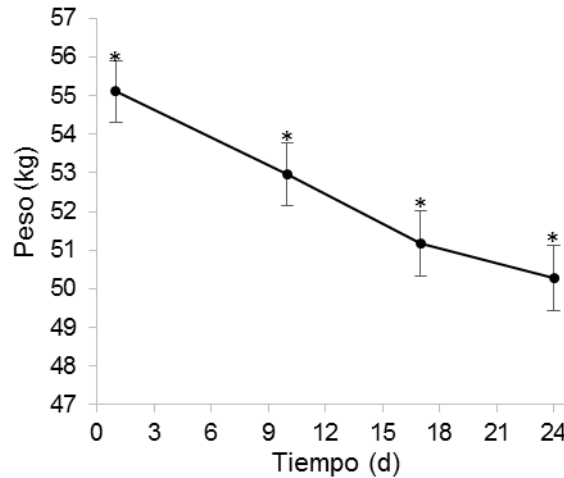


Figura 12. Cambio de peso de ovejas en anestro postparto. Cada tiempo con asterisco difiere significativamente ($p \leq 0.001$).

3.5. *Discusión*

La hipótesis de este estudio fue que la Kp induciría el pico preovulatorio, y además el amamantamiento controlado y el efecto macho incrementarían la incidencia del mismo en ovejas en anestro postparto. Previo al pico preovulatorio se esperaba el efecto de los factores estudiados en el aumento de la concentración de LH. Los resultados indican que la aplicación de Kp induce el pico preovulatorio de LH en ovejas en anestro postparto y que el efecto macho incrementó la incidencia, pero no el amamantamiento controlado. La concentración aumentó debido a la Kp e incrementó más por efecto del amamantamiento controlado y el efecto macho.

La Kp induce el pico preovulatorio en ovejas en anestro postparto, en las cuales el amamantamiento suprime la secreción pulsátil de GnRH/LH y, por ende, la maduración folicular y el pico preovulatorio. La incidencia del pico preovulatorio en los tratamientos con Kp varió de 25 % a 100 % (Cuadro 4). En contraste, ninguna oveja sin Kp exhibió pico preovulatorio ($p \leq 0.0005$). No se encontraron reportes similares en la literatura. En ovejas Ile de France en anestro estacional y sin crías, una dosis de Kp similar (12.6 nmol/h) a la de este estudio indujo el pico preovulatorio en 4 de 5 ovejas tratadas (80 %; Caraty et al., 2007). En otro trabajo, también en anestro estacional, se obtuvieron resultados equivalentes (75 % de pico preovulatorio; Sébert, et al., 2010). En nuestro experimento, 13 de 20 ovejas con Kp (65 %) mostraron pico preovulatorio. Esta

respuesta indica que la Kp es capaz de reducir los efectos negativos del amamantamiento sobre la secreción de GnRH/LH e inducir el pico preovulatorio. La razón podría ser la capacidad de Kp exógena para estimular la secreción de GnRH/LH de manera directa en las terminaciones neuronales GnRH (Caraty et al., 2007; Hameed et al., 2011; Yamada et al., 2007) y esquivar el bloqueo superior del amamantamiento sobre la misma Kp y GnRH. Como sustento se tiene que hasta el 90 % de las neuronas GnRH del POA en las ovejas expresan GPR54 (Jeremy T. Smith et al., 2011), pero, aparentemente, el estímulo de la secreción de GnRH podría ser a nivel de las terminaciones de las neuronas GnRH en la eminencia media (Franceschini et al., 2006; Tassigny et al., 2008). En ratas, el amamantamiento inhibe la expresión de ARNm de Kiss1 en el ARC y la aplicación de Kp incrementa la secreción de LH (Yamada et al., 2007). Debido a que la Kp no supera la barrera hematoencefálica, el estímulo sobre las neuronas GnRH podría ocurrir en proyecciones de dendritas fuera de la barrera (Thomson et al., 2004), y también se ha descubierto un subgrupo de neuronas GnRH en la parte rostral del POA que poseen ramificaciones dendríticas complejas y llenan el OVLT, y además son susceptibles de ser estimuladas por Kp (Herde et al., 2011).

Se desconoce cómo el amamantamiento inhibe la secreción de GnRH/LH, pero podría ocurrir a nivel del ARC. Existe un grupo de neuronas en ese núcleo hipotalámico que coexpresan Kp, NKB y Dyn, y además, están interconectadas y se regulan mutuamente (neuronas KNDy; Lehman et al., 2010a). Hay una teoría que propone a NKB como la iniciadora del estímulo que activa la secreción de Kp y como consecuencia la liberación de GnRH; al mismo tiempo se activa la Dyn para inhibir a la NKB y en consecuencia a Kp hasta que la inhibición se rompe e inicia un nuevo estímulo (Goodman et al., 2013). En función a ello se podría especular que el amamantamiento inhibe la secreción de GnRH al estimular a la Dyn y en consecuencia bloquea la secreción de NKB y Kp. Primero, hay síntesis de C-Fos durante el amamantamiento en el ARC y evidencia actividad de este centro que regula la secreción de GnRH (Smith y Grove, 2002). Segundo, la administración de Naloxone (antagonista de opioides) en ovejas en anestro postparto, incrementa la secreción pulsátil de LH (Ahmadzadeh et al., 1998; Newton et al., 1988), y en este grupo de opioides está la Dyn; además, la aplicación de Dyn en cabras bloquea la ocurrencia de MUA en el ARC, mientras que la administración del

antagonista *norbinaltorphimine* la estimula (Wakabayashi et al., 2010). Debido a que la Kp exógena no utiliza esa vía es que puede estimular la secreción de GnRH. Los niveles bajo de E₂ parecen suprimir, en ratas amamantando, la expresión de Kp en el ARC (Yamada et al., 2012). La aplicación de Kp causa la inmediata secreción de E₂ y el crecimiento folicular (Sébert et al., 2010), mismo que es requisito para que ocurra el pico preovulatorio. La falla en el aumento del E₂ debido a variaciones individuales en la respuesta a la Kp podría explicar la ausencia de pico preovulatorio en animales tratados (Caraty et al., 2007).

El efecto macho incrementó la incidencia de pico preovulatorio en combinación con la Kp en ovejas anéstricas postparto (Figura 2). En esta interacción, la respuesta con la Kp y efecto macho fue 45 % superior respecto a la Kp sin efecto macho. El grupo de ovejas con sólo efecto macho no mostró pico preovulatorio en el periodo de muestreo (AM). El pico preovulatorio de LH en ovejas en anestro estacional con el efecto macho, puede empezar a ocurrir alrededor de las 30 h después del primer contacto con el macho (Martin y Scaramuzzi, 1983); sin embargo, la presencia frecuente del semental es necesaria hasta lograr el pico preovulatorio en la mayoría de las ovejas, ya que el retiro del carnero antes de tiempo provoca que las ovejas reduzcan la secreción de LH (Martin et al., 1986). Por otra parte, en ovejas en anestro postparto no se encontraron estudios donde se haya evaluado la incidencia de pico preovulatorio, pero sí de ovulación y ello permite relacionar los eventos. El efecto macho actúa más lentamente en el postparto (Geytenbeek et al., 1984). Ellos encontraron que el porcentaje de ovulación fue 0, 35, 52 y 73 para ovejas expuestas a efecto macho con 14, 28, 35 y 45 d postparto, respectivamente. El efecto macho duró 10 d (del 10 al 20 postparto) y podemos esperar que parte de las ovejas ovularan antes de la infusión. Según nuestros resultados, en al menos 17 % de las ovejas pudo haber ocurrido la ovulación, ya que no respondieron con pico preovulatorio a la aplicación de Kp, pero sí con aumento en la concentración de LH.

El aumento de la incidencia del pico preovulatorio derivado de la combinación del efecto macho y la aplicación de Kp parece deberse a que actúa estimulando la secreción de la misma Kp. Hay neuronas de la amígdala que expresan Kiss1 en función del estímulo de estrógenos (Kim et al., 2011). Se ha encontrado que ovejas sometidas

a efecto macho incrementan la expresión de ARNm de Kiss1, mientras la administración de un antagonista (P-271) de Kp bloquea completamente la respuesta al efecto macho (Bond et al., 2013). Por ello se ha propuesto que el efecto macho actúa vía feromonas a nivel neuronas KNDy en el ARC, para estimular la secreción de Kp y luego de GnRH/LH (Hawken y Martin, 2012; Smith et al., 2014). En nuestro experimento, el estímulo directo de la Kp sobre GnRH aunado al del efecto macho sobre las neuronas KNDy pudo ser la causa de la mayor incidencia de pico preovulatorio.

La incidencia mayor de pico preovulatorio del estudio se obtuvo cuando se combinó la Kp con el amamantamiento controlado y el efecto macho, pero esta interacción se aproximó a la significativa ($p \leq 0.062$). La unión de los 3 factores (RMKp) causó que 100 % de las ovejas tuviera pico preovulatorio, sin embargo, la sola inclusión del efecto macho y la Kp indujo apenas 17 % menos picos.

En la Figura 11 se puede notar que el inicio del pico preovulatorio a las 20.5 ± 1.9 h después del inicio de la aplicación de Kp, y varió desde 8 a 30 h; sin embargo, estas diferencias no fueron significativas entre los tratamientos ($p > 0.05$). Sébert et al. (2010) reportaron que de manera similar, el inicio del pico preovulatorio en el anestro estacional de ovejas tratadas con Kp fue a las 21.3 ± 2.67 h. También, en otro estudio en ovejas prepúberes con Kp el inicio del pico fue a 21 ± 2.3 h (Redmond et al., 2011).

Los tratamientos no afectaron el pico máximo de LH del pico preovulatorio ($p > 0.05$). Sin embargo, fue baja (31.1 ± 3.8 ng mL⁻¹) respecto al pico preovulatorio medio de la etapa reproductiva (> 50 ng mL⁻¹; Martin et al., 1987). La concentración máxima también fue baja respecto de aquella en ovejas con Kp en anestro estacional (60.4 ± 10.0 ng mL⁻¹; Sébert et al., 2010). En contraste, esta fue superior de 22 ± 13 ng mL⁻¹ reportados en ovejas prepúberes tratadas con Kp (Redmond et al., 2011).

La aplicación de Kp incrementó la concentración de LH en sangre en ovejas en anestro postparto. Este incremento fue mayor cuando se combinó Kp con amamantamiento controlado y efecto macho (RMKp; Figura 1.II). La diferencia era esperada, ya que se combinaron 3 estímulos positivos. También se esperaba que la concentración de LH fuera menor en AKp respecto al resto de los tratamientos con Kp, debido a que el único

efecto positivo era la Kp, sin embargo fue solo diferente a RMKp. La similitud entre AKp, RKp y AMKp muestra que tanto el amamantamiento controlado como el efecto macho no mejoraron la concentración de LH, y fue la Kp quien la aumentó en este periodo. El efecto del amamantamiento en la concentración de LH se ha evaluado en ratas (Yamada et al., 2007). Estos autores encontraron que el gen Kiss1 es suprimido a nivel ARC por el amamantamiento y la aplicación de Kp incrementa la concentración de LH. La concentración de LH en sangre es reflejo de la secreción pulsátil. En este sentido, en un estudio realizado en laboratorio donde se llevó a cabo el presente trabajo se encontró que el amamantamiento controlado incrementa la secreción pulsátil de LH en ovejas en anestro postparto ($p \leq 0.04$; datos no publicados).

La introducción del efecto macho, en los tratamientos sin Kp, incrementó la concentración de LH tanto en ovejas con amamantamiento continuo como controlado (Figura 9.1). El aumento fue significativo las primeras 4 h del muestreo ($p \leq 0.001$). Contrario a lo esperado, el AM no fue diferente al RM ($p > 0.05$), por lo que el aumento de concentración de LH se puede deber sólo al efecto macho y no al amamantamiento controlado. La concentración de LH aumenta debido a que el efecto macho estimula la secreción pulsátil de GnRH/LH (Fabre-Nys et al., 2015; Hawken et al., 2007). La Kp parece ser la vía por la cual el efecto macho actúa (Smith et al., 2014). En nuestro estudio la Kp aumentó la concentración de LH y cuando se introdujo el efecto macho esta aumentó aún más. La vida media de la Kp-10 es de aproximadamente 4 min y esto influye en el tiempo del estímulo (Jayasena et al., 2011). Se han estado desarrollando análogos de Kp que aumentan la duración del estímulo y practicidad de la aplicación de la misma (Decourt et al., 2016).

La Kp, el efecto macho o el amamantamiento controlado no influyeron en el peso de las ovejas. Este disminuyó 9 % en el tiempo, desde el parto hasta el fin del experimento el día 24 postparto (Figura 4). Sin embargo, esta disminución fue similar entre los distintos tratamientos ($p > 0.05$); el peso no afectó las diferencias encontradas por efecto de los tratamientos sobre el pico preovulatorio y la concentración de LH en ovejas en anestro postparto.

3.6. Conclusiones

Se concluye que la Kp puede inducir el pico preovulatorio en ovejas anéstricas postparto, mientras el efecto macho incrementa la incidencia del mismo, y el amamantamiento controlado no tuvo efecto. La concentración de LH incrementa con la adición de Kp y mejora con la combinación del efecto macho y el amamantamiento controlado.

DISCUSIÓN GENERAL

El primer objetivo del estudio fue determinar si el amamantamiento controlado y el efecto macho, como efectos simples o en interacción, mejoran el comportamiento reproductivo de ovejas en anestro postparto. Los resultados mostraron que el efecto macho redujo el tiempo al primer estro en 8 d respecto a ovejas sin este (48 d). En un estudio parecido, se encontró que el primer estro ocurrió alrededor del día 35 postparto (Cruz Espinoza, 2011). En otro estudio encontraron que el tiempo al primer celo fue al día 40 postparto (Lassoued et al., 2004). El efecto macho duplicó el porcentaje de ovejas gestantes (90 %). Este valor es superior al de otros estudios que reportan de 63 % a 68 % de gestación (Cruz Espinoza, 2011; Morales-Terán et al., 2011). La fecundidad que mejoró en 100 % con el efecto macho. La fecundidad en este estudio fue mayor a la reportada por Cruz-Espinoza (2011) con 1.10. Sin embargo, la incidencia de estros y la prolificidad no se afectaron por el efecto macho. Por su parte, el amamantamiento controlado influyó menos en el comportamiento reproductivo. Un efecto positivo fue que redujo el tiempo al primer estro en 5 d respecto al amamantamiento continuo ($p \leq 0.05$), y también tendió a incrementar la fecundidad ($p = 0.076$; 0.4 crías más). Otros investigadores tampoco encontraron diferencias en este indicador (Castillo-Maldonado et al., 2013).

Aunque el amamantamiento controlado y el efecto macho mejoraron el comportamiento reproductivo de ovejas en anestro postparto, 10 % de ovejas con efecto macho y 27 % con amamantamiento controlado no se gestaron antes de 63 d postparto, mientras que 7 % y 20 %, respectivamente, no entraron en celo. Esto muestra que el amamantamiento inhibe el retorno a la actividad reproductiva a nivel tal que el efecto macho y el amamantamiento controlado no son suficientes para iniciar la reproducción en la totalidad de las ovejas.

El segundo objetivo fue probar si la aplicación de Kp i.v. incrementa la secreción pulsátil de LH en ovejas en anestro postparto con amamantamiento continuo, y si el aumento es mayor con amamantamiento controlado. La hipótesis fue que el amamantamiento inhibe la secreción de Kp y en consecuencia a la secreción pulsátil de GnRH/LH, y la aplicación de Kp incrementaría a tales hormonas, además, el amamantamiento controlado mejoraría la respuesta a la Kp. Los resultados mostraron que la frecuencia

de secreción pulsátil de LH incrementó 1.3 veces más que antes de la aplicación ($p \leq 0.006$), y 1.0 veces más que el grupo con solución salina ($p \leq 0.014$). La mitad de las ovejas que cambiaron la frecuencia de LH por la aplicación de Kp tuvieron al menos 0.83 h^{-1} . No se encontraron estudios donde se haya evaluado la secreción pulsátil de LH en ovejas en anestro postparto estimuladas con Kp. En ovejas prepúberes, la aplicación de una dosis similar de Kp cambió la frecuencia de secreción de LH de 0.5/h a 1/h (Redmond et al., 2011); la misma tendencia ocurrió en ratas amamantando (Yamada et al., 2007). La amplitud de los pulsos de secreción de LH no cambió por la aplicación de Kp en ovejas en anestro postparto (media=2.96 ng mL⁻¹; $p > 0.05$). El tipo de amamantamiento no influyó en el estímulo de la Kp sobre la secreción pulsátil de LH ($p > 0.05$). Esto significa que el cambio de la frecuencia debido a la Kp fue similar en ovejas con amamantamiento continuo o controlado.

El tercer objetivo fue evaluar el efecto de la aplicación de Kp con efecto macho o amamantamiento controlado, en la inducción del pico preovulatorio y la concentración de LH en ovejas en anestro postparto. El resultado más importante de este experimento fue que la Kp es capaz de inducir el pico preovulatorio con el estímulo por 24 h. La incidencia del pico preovulatorio en los tratamientos con Kp varió de 25 % a 100 %. En contraste, ninguna oveja sin Kp exhibió pico preovulatorio ($p \leq 0.0005$). En ovejas Ile de France en anestro estacional y sin crías, una dosis de Kp similar (12.6 nmol/h) a la de este estudio indujo el pico preovulatorio en 4 de 5 ovejas tratadas (80 %; Caraty et al., 2007). El efecto macho incrementó la incidencia de pico preovulatorio en combinación con la Kp sin este efecto, en ovejas anéstricas postparto. En esta interacción, la respuesta con la Kp y efecto macho fue 45 % superior respecto a la Kp sin efecto macho. El grupo de ovejas con sólo efecto macho no mostró pico preovulatorio en el periodo de muestreo (AM). El aumento de la incidencia del pico preovulatorio derivado de la combinación del efecto macho y la aplicación de Kp parece deberse a que actúa estimulando la secreción de la misma Kp. Se ha encontrado que ovejas sometidas a efecto macho incrementan la expresión de ARNm de Kiss1, mientras la administración de un antagonista (P-271) de Kp bloquea completamente la respuesta al efecto macho (Bond et al., 2013). La incidencia mayor de pico preovulatorio se obtuvo cuando se combinó la Kp con el amamantamiento controlado y

el efecto macho, pero esta interacción sólo tendió a significativa ($p=0.062$). La combinación de los 3 factores (RMKp) causó que 100 % de las ovejas tuviera pico preovulatorio, sin embargo, la sola inclusión del efecto macho y la Kp indujo apenas 17 % menos picos.

CONCLUSIONES GENERALES

Del objetivo uno se concluye que el efecto macho y el amamantamiento controlado mejoran el comportamiento reproductivo de ovejas en anestro postparto de manera separada, sin embargo, la combinación de ambos no fue importante.

De la evaluación de la Kp y el amamantamiento controlado en la secreción pulsátil de LH se concluye que la aplicación de kisspeptina i.v. incrementa la secreción pulsátil de LH de manera similar en ovejas con amamantamiento continuo o controlado, en anestro postparto.

En el tercer objetivo se concluye que la Kp puede inducir el pico preovulatorio en ovejas anéstricas postparto, mientras el efecto macho incrementa la incidencia del mismo, y el amamantamiento controlado no tuvo efecto. La concentración de LH incrementa con la adición de Kp y mejora con la combinación del efecto macho y el amamantamiento controlado.

LITERATURA CITADA

- Acosta, B., Tarnavsky, G.K., Platt, T.E., Hamernik, D.L., Brown, J.L., Schoenemann, H.M., Reeves, J.J., 1983. Nursing enhances the negative effect of estrogen on LH release in the cow. *J. Anim. Sci.* 57, 1530–1536.
- Ahmadzadeh, A., Barnes, M.A., Pearson, R.E., 1998. Effect of naloxone on serum luteinizing hormone concentration in anovulatory Holstein cows during the early postpartum period. *Domest. Anim. Endocrinol.* 15, 177–81.
- Amstalden, M., Coolen, L.M., Hemmerle, A.M., Billings, H.J., Connors, J.M., Goodman, R.L., Lehman, M.N., 2009. Neurokinin 3 Receptor Immunoreactivity in the Septal Region, Preoptic Area and Hypothalamus of the Female Sheep: Colocalisation in Neurokinin B Cells of the Arcuate Nucleus but not in Gonadotrophin-Releasing Hormone Neurones. *J. Neuroendocrinol.* 22, 1–12. doi:10.1111/j.1365-2826.2009.01930.x
- Arrieta, E.A., Porrás, A.A., Murcia, C.A., Rojas, S.A., 2006. Ovine serum and pituitary isoforms of luteinising hormone during the luteal phase. *Reprod. Fertil. Dev.* 18, 485–495.
- Arroyo, J., Magaña-Sevilla, H., Camacho-Escobar, M.A., 2009. Regulación neuroendocrina del anestro posparto en la oveja. *Trop. Subtrop. Agroecosystems* 10, 301–312.
- Arroyo, L.J., Gallegos-Sánchez, J., Villa-Godoy, A., Berruecos, J.M., Perera, G., Valencia, J., 2007. Reproductive activity of Pelibuey and Suffolk ewes at 19° north latitude. *Anim. Reprod. Sci.* 102, 24–30. doi:10.1016/j.anireprosci.2006.09.025
- Beltramo, M., Dardente, H., Cayla, X., Caraty, A., 2014. Cellular mechanisms and integrative timing of neuroendocrine control of GnRH secretion by kisspeptin. *Mol. Cell. Endocrinol.* 382, 387–399. doi:10.1016/j.mce.2013.10.015
- Bond, J.P. De, Li, Q., Millar, R.P., Clarke, I.J., Smith, J.T., 2013. Kisspeptin Signaling Is Required for the Luteinizing Hormone Response in Anestrous Ewes following the Introduction of Males. *PLoS One* 8, 1–11. doi:10.1371/journal.pone.0057972
- Camacho, R.J.C., Pró Martínez, A., Becerril Pérez, C.M., Figueroa Sandoval, B., Martín, G.B., Valencia, J., Gallegos Sánchez, J., 2008. Prevention of suckling improves postpartum reproductive responses to hormone treatments in Pelibuey ewes. *Anim. Reprod. Sci.* 107, 85–93. doi:10.1016/j.anireprosci.2007.06.021
- Caraty, A., Decourt, C., Briant, C., Beltramo, M., 2012. Kisspeptins and the reproductive axis: Potential applications to manage reproduction in farm animals. *Domest. Anim. Endocrinol.* 43, 95–102. doi:10.1016/j.domaniend.2012.03.002
- Caraty, A., Franceschini, I., 2009. Kisspeptina – nuevo elemento en el control de la reproducción: aspectos básicos y aplicaciones potenciales para un mejor control de la fertilidad en hembras, in: *V Curso Internacional de Fisiología de La Reproducción En Rumiantes*. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México, pp. 149–163.
- Caraty, A., Smith, J.T., Lomet, D., Ben Saïd, S., Morrissey, A., Cognie, J., Doughton, B.,

- Baril, G., Briant, C., Clarke, I.J., 2007. Kisspeptin synchronizes preovulatory surges in cyclical ewes and causes ovulation in seasonally acyclic ewes. *Endocrinology* 148, 5258–5267. doi:10.1210/en.2007-0554
- Castellano, J.M., Gaytan, M., Roa, J., Vigo, E., Navarro, V.M., Bellido, C., Dieguez, C., Aguilar, E., Sánchez-Criado, J.E., Pellicer, A., Pinilla, L., Gaytan, F., Tena-Sempere, M., 2006. Expression of KiSS-1 in rat ovary: Putative local regulator of ovulation? *Endocrinology* 147, 4852–4862. doi:10.1210/en.2006-0117
- Castillo-Maldonado, P.P., Vaquera-Huerta, H., Tarango-Arambula, L.A., Pérez-Hernández, P., Herrera-Corredor, A.C., Gallegos-Sánchez, J., 2013. Restablecimiento de la actividad reproductiva posparto en ovejas de pelo. *Arch. Zootec.* 62, 419–428. doi:10.4321/S0004-05922013000300010
- Clarke, I.J., Smith, J.T., Caraty, A., Goodman, R.L., Lehman, M.N., 2009. Kisspeptin and seasonality in sheep. *Peptides* 30, 154–163. doi:10.1016/j.peptides.2008.08.022
- Clarke, I.J., Thomas, G.B., Yao, B., Cummins, J.T., 1987. GnRH secretion throughout the ovine estrous cycle. *Neuroendocrinology* 46, 82–88.
- Clarke, I.J., Wright, P.J., Chamley, W.A., Burman, K., 1984. Differences in the reproductive endocrine status of ewes in the early post-partum period and during seasonal anoestrus. *J. Reprod. Fer* 70, 591–597.
- Clarkson, J., Herbison, A.E., 2006. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 147, 5817–5825. doi:10.1210/en.2006-0787
- Cohen-Tannoudji, J., Lavenet, C., Locatelli, A., Tillet, T., Signoret, J.P., 1989. Non-involvement of the accessory olfactory system in the LH response of anoestrous ewes to male odour. *J. Reprod. Fert.* 86, 135–144.
- Cohen-Tannoudji, J., Signoret, J.P., 1987. Effect of Short Exposure to the Ram on later Reactivity of Anoestrous Ewes to the Male Effect. *Anim. Reprod. Sci.* 13, 263–268.
- Colpos, 2016. Reglamento para el uso y cuidado de animales destinados a la investigación en el Colegio de Postgraduados [WWW Document]. URL www.colpos.mx
- Connor, H.C., Houghton, P.L., Lemenager, R.P., Malven, P. V, Parfet, J.R., Moss, G.E., 1990. Effect of dietary energy, body condition and calf removal on pituitary gonadotropins, gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and hypothalamic opioids in beef cows. *Domest. Anim. Endocrinol.* 7, 403–411.
- Cosgrove, J.R., de Rensis, F., Foxcroft, G.R., 1993. Opioidergic pathways in animal reproduction: Their role and effects of their pharmacological control. *Anim. Reprod. Sci.* 33, 373–392. doi:10.1016/0378-4320(93)90124-A
- Cravo, R.M., Margatho, L.O., Osborne-Lawrence, S., Donato, J., Atkin, S., Bookout, A.L., 2011. Characterization of Kiss1 neurons using transgenic mouse models. *Neuroscience* 173, 37–56.

- Cruz Espinoza, F., 2011. Efecto macho y su relación con el anestro postparto en la oveja Pelibuey amamantando. Colegio de Postgraduados.
- Cushwa, W.T., Bradford, G.E., Stabenfeldt, G.H., Berger, Y.M., Dally, M.R., 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, 1195–1200.
- Cutshaw, J.L., Hunter, J.F., Williams, G.L., 1992. Effects of transcutaneous thermal and electrical stimulation of the teat on pituitary luteinizing hormone, prolactin and oxytocin secretion in ovariectomized, estradiol-treated beef cows following acute weaning. *Theriogenology* 37, 915–934.
- Decourt, C., Robert, V., Anger, K., Galibert, M., Madinier, J., Liu, X., Dardente, H., Lomet, D., Delmas, A.F., Caraty, A., Herbison, A.E., Anderson, G.M., Aucagne, V., Beltramo, M., 2016. A synthetic kisspeptin analog that triggers ovulation and advances puberty. *Nat. Publ. Gr.* 1–10. doi:10.1038/srep26908
- Delgadillo, J.A., Gelez, H., Ungerfeld, R., Hawken, P.A.R., Martin, G.B., 2009. The “male effect” in sheep and goats-Revisiting the dogmas. *Behav. Brain Res.* 200, 304–314. doi:10.1016/j.bbr.2009.02.004
- Dobek, E., Górski, K., Romanowicz, K., Misztal, T., 2013. Different types of opioid receptors involved in the suppression of LH secretion in lactating sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 141, 62–67. doi:10.1016/j.anireprosci.2013.07.006
- Dungan, H.M., Clifton, D.K., Steiner, R.A., 2006. Minireview: Kisspeptin neurons as central processors in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 147, 1154–1158. doi:10.1210/en.2005-1282
- Ezzat Ahmed, A., Saito, H., Sawada, T., Yaegashi, T., Yamashita, T., Hirata, T.-I., Sawai, K., Hashizume, T., 2009. Characteristics of the Stimulatory Effect of Kisspeptin-10 on the Secretion of Luteinizing Hormone, Follicle-Stimulating Hormone and Growth Hormone in Prepubertal Male and Female Cattle. *J. Reprod. Dev.* 55, 650–654. doi:10.1262/jrd.20255
- Fabre-Nys, C., Kendrick, K.M., Scaramuzzi, R.J., 2015. The “ ram effect ”: new insights into neural modulation of the gonadotropic axis by male odors and socio-sexual interactions. *Front. Neurosci.* 9, 1–16. doi:10.3389/fnins.2015.00111
- Franceschini, I., Lomet, D., Cateau, M., Delsol, G., Tillet, Y., Caraty, A., 2006. Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha. *Neurosci. Lett.* 401, 225–230. doi:10.1016/j.neulet.2006.03.039
- Gallegos-Sánchez, J., Herrera-Corredor, C.A., Tejada-Sartorius, O., Morales-Terán, G., Hernández-Marín, J.A., Pérez-Hernández, P., 2009. Innovaciones en el manejo del anestro postparto para mejorar la eficiencia reproductiva de las ovejas. *Memorias V Curso Internacional*, in: *Memorias V Curso Internacional. Fisiología de La Reproducción En Rumiantes*. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México, pp. 233–246.
- Gallegos-Sánchez, J., López-Loyo, R., Pulido, A., Zárate, G., García-Winder, M., 1990.

- Effect of delaying suckling on reproductive performance and milk production in *Bos taurus* x *Bos indicus* cows, in: Joint IFS-SIPAR Seminar on Animal Reproduction. p. Tomo 1.
- Gallegos-Sanchez, J., Malpoux, B., Thiery, J.C., 1998. Control of pulsatile LH secretion during seasonal anoestrus in the ewe. *Reprod. Nutr. Dev.* 38, 3–15. doi:10.1051/rnd:19980101
- García, E., 2004. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen, 5a edición. ed. Ed. México, México.
- 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. doi:10.1016/j.yhbeh.2004.05.002
- Geytenbeek, P.E., Oldham, C.-M., Gray, S.J., 1984. The induction of ovulation in the post-partum ewe. *Anim. Prod. Aust.* 15, 353–356.
- Goodman, R.L., Hileman, S.M., Nestor, C.C., Porter, K.L., Connors, J.M., Hardy, S.L., Millar, R.P., Cernea, M., Coolen, L.M., Lehman, M.N., 2013. Kisspeptin, Neurokinin B, and Dynorphin Act in the Arcuate Nucleus to Control Activity of the GnRH Pulse Generator in Ewes. *Endocrinology* 154, 4259–4269. doi:10.1210/en.2013-1331
- Goodman, R.L., Maltby, M.J., Millar, R.P., Hileman, S.M., Nestor, C.C., Whited, B., Tseng, A.S., Coolen, L.M., Lehman, M.N., 2012. Evidence That Dopamine Acts via Kisspeptin to Hold GnRH Pulse Frequency in Check in Anestrous Ewes. *Endocrinology* 153, 5918–5927. doi:10.1210/en.2012-1611
- Gordon, K., Renfree, M.B., Short, R. V., Clarke, I.J., 1987. Hypothalamo-pituitary portal blood concentrations of β -endorphin during suckling in the ewe. *J. Reprod. Fert.* 79, 397–408.
- Goubillon, M., Forsdike, R.A., Robinson, J.E., Ciofi, P., Caraty, A., Herbison, A.E., 2000. Identification of Neurokinin B-Expressing Neurons as an Highly Estrogen-Receptive, Sexually Dimorphic Cell Group in the Ovine Arcuate Nucleus. *Endocrinology* 141, 4218–4225.
- Griffith, M.K., Williams, G.L., 1996. Roles of maternal vision and olfaction in suckling-mediated inhibition of luteinizing hormone secretion, expression of maternal selectivity, and lactational performance of beef cows. *Biol. Reprod.* 54, 761–8. doi:10.1095/biolreprod54.4.761
- Gutiérrez-Pascual, E., Martínez-fuentes, A.J., Pinilla, L., Tena-Sempere, M., Malagón, M.M., Castaño, J.P., 2007. Direct pituitary effects of kisspeptin: Activation of gonadotrophs and somatotrophs and stimulation of luteinising hormone and growth hormone secretion. *J. Neuroendocrinol.* 19, 521–530. doi:10.1111/j.1365-2826.2007.01558.x
- Hamadeh, S.K., Said, M.A., Tami, F., Barbour, E.K., 2001. Weaning and the ram-effect on fertility, serum luteinizing hormone and prolactin levels in spring rebreeding of postpartum Awassi ewes. *Small Rumin. Res.* 41, 191–194.
- Hameed, S., Jayasena, C.N., Dhillo, W.S., 2011. Kisspeptin and fertility. *J. Endocrinol.*

208, 97–105. doi:10.1677/JOE-10-0265

- Hawken, P.A.R., Beard, A.P., Esmaili, T., Kadokawa, H., Evans, A.C.O., Blache, D., Martin, G.B., 2007. The introduction of rams induces an increase in pulsatile LH secretion in cyclic ewes during the breeding season. *Theriogenology* 68, 56–66. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.03.023
- Hawken, P.A.R., Evans, A.C.O., Beard, A.P., 2008. 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. doi:10.1016/j.anireprosci.2007.06.031
- Hawken, P.A.R., Martin, G.B., 2012. Sociosexual stimuli and gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone secretion in sheep and goats. *Domest. Anim. Endocrinol.* 43, 85–94. doi:10.1016/j.domaniend.2012.03.005
- Hawken, P. a R., Jorre, T.J.D.S., Rodger, J., Esmaili, T., Blache, D., Martin, G.B., 2009. Rapid induction of cell proliferation in the adult female ungulate brain (*Ovis aries*) associated with activation of the reproductive axis by exposure to unfamiliar males. *Biol. Reprod.* 80, 1146–1151. doi:10.1095/biolreprod.108.075341
- Herbison, A.E., Pape, J.R., 2001. New evidence for estrogen receptors in gonadotropin-releasing hormone neurons. *Front. Neuroendocrinol.* 22, 292–308.
- Herde, M.K., Geist, K., Campbell, R.E., Herbison, A.E., 2011. Gonadotropin-releasing hormone neurons extend complex highly branched dendritic trees outside the blood-brain barrier. *Endocrinology* 152, 3832–3841.
- Herrera-Corredor, C.A., 2008. Efecto de la restricción del amamantamiento y el aceite de soya en el desarrollo folicular y el retorno a la actividad ovárica postparto en ovejas de pelo. *Col. Postgraduados*.
- Jayasena, C.N., Nijher, G.M., Comninos, A.N., Abbara, A., Januszewski, A., Vaal, M.L., Srisankarajah, L., Murphy, K.G., Farzad, Z., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., Dhillon, W.S., 2011. The effects of kisspeptin-10 on reproductive hormone release show sexual dimorphism in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96, E1963–E1972.
- Jenkin, G., Heap, R.B., Symons, D.B.A., 1977. Pituitary responsiveness to synthetic LH-RH and pituitary LH content at various reproductive stages in the sheep. *TT - J. Reprod. Fertil.* 49, 207–214.
- Jouhannau, M., Szymanski, L., Martini, M., Ella, A., Keller, M., 2013. Kisspeptin : a new neuronal target of primer pheromones in the control of reproductive function in mammals. *Gen. Comp. Endocrinol.* 188, 3–8. doi:10.1016/j.ygcen.2013.03.008
- Kim, J., Semaan, S.J., Clifton, D.K., Steiner, R.A., Dhamija, S., Kauffman, A.S., 2011. Regulation of Kiss1 expression by sex steroids in the amygdala of the rat and mouse. *Endocrinology* 152, 2020–2030.
- Knight, T.W., Lynch, P.R., 1980. Source of ram pheromones that stimulate ovulation in the ewe. *Anim. Reprod. Sci.* 3, 133–136.
- Knight, T.W., Peterson, A.J., Payne, E., 1978. The ovarian and hormonal response of the ewe to stimulation by the ram early in the breeding season. *Theriogenology* 10,

343–353.

- Knight, T.W., Tervit, H.R., Lynch, P.R., 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.
- Knights, M., Baptiste, Q.S., Lewis, P.E., 2002. Ability of ram introduction to induce LH secretion, estrus and ovulation in fall-born ewe lambs during anestrus. *Anim. Reprod. Sci.* 69, 199–209.
- Kotani, M., Detheux, M., Vandebogaerde, A., Communi, D., Vanderwinden, J.M., Le Poul, E., Brézillon, S., Tyldesley, R., Suarez-Huerta, N., Vandeput, F., Blanpain, C., Schiffmann, S.N., Vassart, G., Parmentier, M., 2001. The Metastasis Suppressor Gene KiSS-1 Encodes Kisspeptins, the Natural Ligands of the Orphan G Protein-coupled Receptor GPR54. *J. Biol. Chem.* 276, 34631–34636. doi:10.1074/jbc.M104847200
- 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 Rumin. Res.* 54, 25–31. doi:10.1016/j.smallrumres.2003.10.012
- Lee, J., Miele, M.E., Hicks, D.J., Karen, K., Trent, J., Weissman, B., Welch, D.R., 1996. KiSS-1, a Novel Human Malignant Melanoma Metastasis-Suppressor Gene. *J. Natl. Cancer Inst.* 88, 1731–1737.
- Lehman, M.N., Coolen, L.M., Goodman, R.L., 2010a. Minireview: Kisspeptin/Neurokinin B/Dynorphin (KNDy) Cells of the Arcuate Nucleus: A Central Node in the Control of Gonadotropin-Releasing Hormone Secretion. *Endocrinology* 151, 3479–3489. doi:10.1210/en.2010-0022
- Lehman, M.N., Merkley, C.M., Coolen, L.M., Goodman, R.L., 2010b. Anatomy of the kisspeptin neural network in mammals. *Brain Res.* 1364, 90–102. doi:10.1016/j.brainres.2010.09.020
- Lozano, J.M., Forcada, F., Abecia, J.A., 1998. Opioidergic and nutritional involvement in the control of luteinizing hormone secretion of postpartum Rasa Aragonesa ewes lambing in the mid-breeding season. *Anim. Reprod. Sci.* 52, 267–277. doi:10.1016/S0378-4320(98)00137-7
- Malven, P. V., 1986. Inhibition of pituitary LH release resulting from endogenous opioid peptides. *Domest. Anim. Endocrinol.* 3, 135–144. doi:10.1016/0739-7240(86)90001-9
- Mandiki, S.N.M., Bister, J.L., Paquay, R., 1990. Effects of suckling mode on endocrine control of reproductive activity resumption in Texel ewes lambing in July or November. *Theriogenology* 33, 397–413.
- Martin, G., Milton, J.T., Davidson, R., Banchemo Hunzicker, G., Lindsay, D., Blache, D., 2004. Natural methods for increasing reproductive efficiency in small ruminants. *Anim. Reprod. Sci.* 82–83, 231–245. doi:10.1016/j.anireprosci.2004.05.014
- Martin, G.B., Oldham, C.M., Cognié, Y., Pearce, D.T., 1986. The physiological responses of anovulatory ewes to the introduction of rams - A review. *Livest. Prod.*

- Sci. 15, 219–247. doi:10.1016/0301-6226(86)90031-X
- Martin, G.B., Oldham, C.M., Lindsay, D.R., 1980. Increased plasma LH levels in seasonally anovular Merino ewes following the introduction of rams. *Anim. Reprod. Sci.* 3, 125–132. doi:10.1016/0378-4320(80)90039-1
- Martin, G.B., Scaramuzzi, R.J., 1983. The induction of oestrus and ovulation in seasonally anovular ewes by exposure to rams. *J. Steroid Biochem.* 19, 869–875. doi:10.1016/0022-4731(83)90026-2
- Martin, G.B., Thomas, G.B., Terqui, M., Warner, P., 1987. Pulsatile LH secretion during the preovulatory surge in the ewe: experimental observations and theoretical considerations. *Reprod. Nutr. Dévelop.* 27, 1023–1040.
- McNeilly, A.S., 2001. Lactational control of reproduction. *Reprod. Fertil. Dev.* 12, 583–590.
- Messenger, S., Chatzidaki, E.E., Ma, D., Hendrick, A.G., Zahn, D., Dixon, J., Thresher, R.R., Malinge, I., Lomet, D., Carlton, M.B.L., Colledge, W.H., Caraty, A., Aparicio, S.A.J.R., 2005. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 1761–1766. doi:10.1073/pnas.0409330102
- Montiel-Castelan, M.I., 2014. “ Efecto Macho ” En La Ovulación Postparto de ovejas Pelibuey Amamantando. Colegio de Postgraduados.
- Morales-Terán, G., Herrera-Corredor, C.A., Pérez-Hernández, P., Salazar-Ortiz, J., Sánchez, J.G., 2011. Influence of Controlled suckling and the male effect on the resumption of postpartum ovarian activity in pelibuey sheep. *Trop. Subtrop. Agroecosystems* 13, 493–500.
- Morales, T.G., Pro, M.A., Figueroa, S.B., Sánchez, del R.C., Gallegos, S.J., 2004. Duración Del Anestro Postparto En Ovejas Pelibuey Continuous or Restricted Suckling and Its Relationship To the. *Agrociencia* 38, 165–171.
- Newton, G.R., Edgerton, L.A., 1989. Effects of season and lactation on luteinizing hormone secretion in postpartum ewes. *Theriogenology* 31, 885–894. doi:10.1016/0093-691X(89)90033-2
- Newton, G.R., Schillo, K.K., Edgerton, L.A., 1988. Effects of weaning and naloxone on luteinizing secretion in postpartum ewes. *Biol. Reprod.* 39, 532–535.
- Nowak, R., Porter, R.H., Lévy, F., Orgeur, P., Schaal, B., 2000. Role of mother-young interactions in the survival of offspring in domestic mammals. *Rev. Reprod.* 5, 153–163. doi:10.1530/ror.0.0050153
- Oldham, C.M., Martin, G.B., Knight, T.W., 1979. Stimulation of seasonally anovular merino ewes by rams I. Time from introduction of the rams to the preovulatory LH surge and ovulation. *Anim. Reprod. Sci.* 1, 283–290.
- Pearce, P., Oldham, C.M., 1988. Importance of non-olfactory ram stimuli in mediating ram-induced ram-induced ovulation in the ewe. *J. Reprod. Fert.* 84, 333–339.
- Pérez-Hernández, P., Hernández-Valdéz, V.M., Figueroa-Sandoval, B., Torres-Hernández, G., Díaz-Rivera, P., Gallegos-Sánchez, J., 2009. Effect of Suckling

- Type on Ovarian Activity of Postpartum Pelibuey Ewes , and Lamb Growing Rate During the First 90 Days After Birth. *Rev. científica, FCV-LUZ XIX*, 343–349. doi:Article
- Perkins, A., Fitzgerald, J.A., 1994. The Behavioral Component of the Ram Effect : The Influence of Ram Sexual Behavior on the Induction of Estrus in Anovulatory Ewes. *J. Anim. Sci.* 72, 51–55.
- Pineda, R., Garcia-Galiano, D., Roseweir, A., Romero, M., Sanchez-Garrido, M.A., Ruiz-Pino, F., Morgan, K., Pinilla, L., Millar, R.P., Tena-Sempere, M., 2010. Critical roles of kisspeptins in female puberty and preovulatory gonadotropin surges as revealed by a novel antagonist. *Endocrinology* 151, 722–730. doi:10.1210/en.2009-0803
- Poindron, P., Cognie, Y., Gayerie, F., Orgeur, P., Oldham, C.M., Ravault, J.P., 1980. Changes in gonadotropins and prolactin levels in isolated (seasonally or lactationally) anovular ewes associated with ovulation caused by the introduction of rams. *Physiol. Behav.* 25, 227–236.
- Redmond, J.S., Macedo, G.G., Velez, I.C., Caraty, A., LWilliams, G., Amstalden, M., 2011. Kisspeptin activates the hypothalamic-adenohypophyseal-gonadal axis in prepubertal ewe lambs. *Reproduction* 141, 541–548. doi:10.1530/REP-10-0467
- Rosa, H.J.D., Bryant, M.J., 2002. The “ram effect” as a way of modifying the reproductive activity in the ewe. *Small Rumin. Res.* 45, 1–16. doi:10.1016/S0921-4488(02)00107-4
- Rubianes, E., Ungerfeld, R., 1993. Uterine involution and ovarian changes during early post partum in autumn-lambing Corriedale ewes. *Theriogenology* 40, 365–372. doi:10.1016/0093-691X(93)90274-9
- SAGARPA, 2001. Norma Oficial Mexicana, Especificaciones Técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio [WWW Document]. <http://sagarpa.gob.mx>.
- Salloum, B.A., Claus, R., 2005. Interaction between lactation, photoperiodism and male effect in German Merino ewes. *Theriogenology* 63, 2181–2193. doi:10.1016/j.theriogenology.2004.09.048
- Schirar, A., Cognié, Y., Louault, F., Poulin, N., Levasseur, M.C., Martinet, J., 1989. Resumption of oestrous behaviour and cyclic ovarian activity in suckling and non-suckling ewes. *J. Reprod. Fert.* 87, 789–794.
- Schirar, A., Cognié, Y., Louault, F., Poulin, N., Meusnier, C., Levasseur, M.C., Martinet, J., 1990. Resumption of gonadotrophin release during the post-partum period in suckling and non-suckling ewes. *J. Reprod. Fert.* 88, 593–604.
- Sébert, M.E., Lomet, D., Saïd, S. Ben, Monget, P., Briant, C., Scaramuzzi, R.J., Caraty, A., 2010. Insights into the mechanism by which kisspeptin stimulates a preovulatory LH surge and ovulation in seasonally acyclic ewes: Potential role of estradiol. *Domest. Anim. Endocrinol.* 38, 289–298. doi:10.1016/j.domaniend.2010.01.001
- Signoret, J.P., Fulkerson, W.J., Lindsay, D.R., 1982. Effectiveness of testosterone-

- treated ewes as teasers wethers and ewes as teasers. *Appl. Anim. Ethol.* 9, 37–45.
- Smart, D., Singh, I., Smith, R.F., Dobson, H., 1994. Opioids and suckling in relation to inhibition of oestradiol-induced LH secretion in postpartum ewes. *J. Reprod. Fert.* 101, 115–119.
- Smith, J.T., Clay, C.M., Caraty, A., Clarke, I.J., 2007. KiSS-1 messenger ribonucleic acid expression in the hypothalamus of the ewe is regulated by sex steroids and season. *Endocrinology* 148, 1150–1157. doi:10.1210/en.2006-1435
- Smith, J.T., Clifton, D.K., Steiner, R.A., 2006. Regulation of the neuroendocrine reproductive axis by kisspeptin-GPR54 signaling. *Reproduction* 131, 623–630. doi:10.1530/rep.1.00368
- Smith, J.T., Cunningham, M.J., Rissman, E.F., Clifton, D.K., Steiner, R.A., 2005a. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology* 146, 3686–3692. doi:10.1210/en.2005-0488
- Smith, J.T., Dungan, H.M., Stoll, E.A., Gottsch, M.L., Braun, R.E., Eacker, S.M., Clifton, D.K., Steiner, R.A., 2005b. Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology* 146, 2976–2984. doi:10.1210/en.2005-0323
- Smith, J.T., Li, Q., Pereira, A., Clarke, I.J., 2009. Kisspeptin Neurons in the Ovine Arcuate Nucleus and Preoptic Area Are Involved in the Preovulatory Luteinizing Hormone Surge. *Endocrinology* 150, 5530–5538. doi:10.1210/en.2009-0712
- Smith, J.T., Li, Q., Yap, K.S., Shahab, M., Roseweir, A.K., Millar, R.P., Clarke, I.J., 2011. Kisspeptin is essential for the full preovulatory LH surge and stimulates GnRH release from the isolated ovine median eminence. *Endocrinology* 152, 1001–1012. doi:10.1210/en.2010-1225
- Smith, J.T., Li, Q., Yap, K.S., Shahab, M., Roseweir, A.K., Millar, R.P., Clarke, I.J., 2011. Kisspeptin is essential for the full preovulatory LH surge and stimulates GnRH release from the isolated ovine median eminence. *Endocrinology* 152, 1001–1012.
- Smith, J.T., Rao, A., Pereira, A., Caraty, A., Millar, R.P., Clarke, I.J., 2008. Kisspeptin is present in ovine hypophysial portal blood but does not increase during the preovulatory luteinizing hormone surge: Evidence that gonadotropes are not direct targets of kisspeptin in vivo. *Endocrinology* 149, 1951–1959. doi:10.1210/en.2007-1425
- Smith, M.F., Hawken, P.A.R., Lehman, M.N., Martin, G.B., 2014. The role of kisspeptin in reproductive function in the ewe. *Reprod. Domest. Ruminants VIII* 105–116.
- Smith, M.S., Grove, K.L., 2002. Integration of the regulation of reproductive function and energy balance: lactation as a model. *Front. Neuroendocrinol.* 23, 225–256.
- Smith, M.S., True, C., Grove, K.L., 2010. The neuroendocrine basis of lactation-induced suppression of GnRH: Role of kisspeptin and leptin. *Brain Res.* 1364, 139–152. doi:10.1016/j.brainres.2010.08.038
- Suzuki, S., Kadokawa, H., Hashizume, T., 2008. Direct kisspeptin-10 stimulation on

- luteinizing hormone secretion from bovine and porcine anterior pituitary cells. *Anim. Reprod. Sci.* 103, 360–365. doi:10.1016/j.anireprosci.2007.05.016
- Tassigny, X.D., Fagg, L.A., Carlton, M.B.L., Colledge, W.H., 2008. Kisspeptin can stimulate gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release by a direct action at GnRH nerve terminals. *Endocrinology* 149, 3926–3932.
- Tena-Sempere, M., 2015. Physiological Mechanisms for the Metabolic Control of Reproduction, in: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Elsevier, pp. 1605–1636. doi:10.1016/B978-0-12-397175-3.00035-1
- Thiery, J.-C., Martin, G.B., Tillet, Y., Caldani, M., Quentin, M., Jamain, C., Ravault, J.-P., 1989. Role of hypothalamic catecholamines in the regulation of luteinizing hormone and prolactin secretion in the ewe during seasonal anestrus. *Neuroendocrinology* 49, 80–87. doi:10.1159/000125094
- Thomson, E.L., Patterson, M., Murphy, K.G., Smith, K.L., Dhillon, W.S., Todd, J.F., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., 2004. Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *J. Neuroendocrinol.* 16, 850–858. doi:10.1111/j.1365-2826.2004.01240.x
- True, C., Kirigiti, M., Ciofi, P., Grove, K.L., Smith, M.S., 2011. Characterisation of Arcuate Nucleus Kisspeptin/Neurokinin B Neuronal Projections and Regulation during Lactation in the Rat. *J Neuroendocr.* 23, 52–64. doi:10.1111/j.1365-2826.2010.02076.x.Characterisation
- Viker, S.D., Larson, R.L., Kiracofe, G.H., Stewart, R.E., Stevenson, J.S., 1993. Prolonged postpartum anovulation in mastectomized cows requires tactile stimulation by the calf. *J. Anim. Sci.* 71, 999–1003.
- Wakabayashi, Y., Nakada, T., Murata, K., Ohkura, S., Mogi, K., Navarro, V.M., Clifton, D.K., Mori, Y., Tsukamura, H., Maeda, K., 2010. Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in the goat. *J. Neurosci* 30, 3124–32.
- Williams, G.L., Gazal, O.S., Guzman Vega, G.A., Stanko, R.L., 1996. Mechanisms regulating suckling-mediated anovulation in the cow. *Anim. Reprod. Sci.* 42, 289–297. doi:10.1016/0378-4320(96)01531-X
- Wright, P.J., Geytenbeek, P.E., Clarke, I.J., 1990. The influence of nutrient status of post-partum ewes on ovarian cyclicity and on the oestrous and ovulatory responses to ram introduction. *Anim. Reprod. Sci.* 23, 293–303.
- Wright, P.J., Geytenbeek, P.E., Clarke, I.J., Findlay, J.K., 1981. Evidence for a change in oestradiol negative feedback and LH pulse frequency in post-partum ewes. *J. Reprod. Fert.* 61, 97–102.
- Wright, P.J., Geytenbeek, P.E., Clarke, I.J., Hoskinson, R.M., 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.

- Xu, J., Kirigiti, M.A., Grove, K.L., Smith, M.S., 2009. Regulation of food intake and gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone during lactation: Role of insulin and leptin. *Endocrinology* 150, 4231–4240. doi:10.1210/en.2009-0190
- Yamada, S., Uenoyama, Y., Deura, C., Minabe, S., Naniwa, Y., Iwata, K., Kawata, M., Maeda, K., Tsukamura, H., 2012. Oestrogen-Dependent Suppression of Pulsatile Luteinising Hormone Secretion and Kiss1 mRNA Expression in the Arcuate Nucleus During Late Lactation in Rats. *J. Neuroendocrinol.* 24, 1234–1242. doi:10.1111/j.1365-2826.2012.02330.x
- Yamada, S., Uenoyama, Y., Kinoshita, M., Iwata, K., Takase, K., Matsui, H., Adachi, S., Inoue, K., Maeda, K.I., Tsukamura, H., 2007. Inhibition of metastin (kisspeptin-54)-GPR54 signaling in the arcuate nucleus-median eminence region during lactation in rats. *Endocrinology* 148, 2226–2232. doi:10.1210/en.2006-1529
- Yavas, Y., Walton, J.S., 2000. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: A review. *Theriogenology* 54, 25–55. doi:10.1016/S0093-691X(00)00323-X

