



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

INSTITUTO DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**CONTROL DE LA ACTIVIDAD SEXUAL DE OVEJAS NULÍPARAS MEDIANTE
CARNEROS DORPER TRATADOS CON TESTOSTERONA Y/O GLUTAMATO:
COMPORTAMIENTO SEXUAL Y EFECTO MACHO**

Tesis en Régimen de Co-tutela

Que presenta **MA. GUADALUPE CALDERÓN LEYVA**
como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA
(UAAAN, México)

DOCTOR EN RECURSOS NATURALES Y GESTIÓN SOSTENIBLE
(UCO-IdEP, España)

Torreón, Coahuila, México



Noviembre 2017

TITULO: CONTROL DE LA ACTIVIDAD SEXUAL DE OVEJAS NULÍPARAS
MEDIANTE CARNEROS DORPER TRATADOS CON
TESTOSTERONA Y/O GLUTAMATO: COMPORTAMIENTO SEXUAL
Y EFECTO MACHO

AUTOR: *María Guadalupe Calderón Leyva*

© Edita: UCOPress. 2017
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

INSTITUTO DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

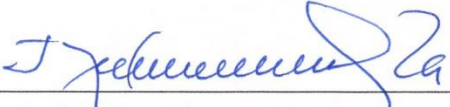
**CONTROL DE LA ACTIVIDAD SEXUAL DE OVEJAS NULÍPARAS MEDIANTE
CARNEROS DORPER TRATADOS CON TESTOSTERONA Y/O GLUTAMATO:
COMPORTAMIENTO SEXUAL Y EFECTO MACHO**

Tesis en Régimen de Co-tutela


Que presenta **MA. GUADALUPE CALDERÓN LEYVA**
como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA
(UAAAN, México)

DOCTOR EN RECURSOS NATURALES Y GESTIÓN SOSTENIBLE
(UCO-IdEP, España)


Dr. Rafael Rodríguez Martínez
Director UAAAN


Dr. Juan Vicente Delgado Bermejo
Director UCO-IdEP


Dr. Cesar A. Meza Herrera
Director UACH-URUZA

Torreón, Coahuila, México



Noviembre 2017



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
INSTITUTO DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Artículos

Influencia del comportamiento sexual de carneros Dorper tratados con glutamato y/o testosterona sobre el comportamiento reproductivo de ovejas anovulatorias

Efecto de la administración de glutamato y/o testosterona sobre el comportamiento sexual apetitivo y consumatorio en carneros y su influencia sobre el comportamiento reproductivo de ovejas nulíparas anovulatorias

Efecto de la suplementación de Glutamato sobre la calidad seminal de carneros jóvenes Dorper con inactividad sexual estacional

Que presenta **MA. GUADALUPE CALDERÓN LEYVA**
como requisito parcial para obtener el doble grado de

DOCTOR EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA
(UAAAN, México)

DOCTOR EN RECURSOS NATURALES Y GESTIÓN SOSTENIBLE
(UCO-IdEP, España)

Dr. Rafael Rodríguez Martínez
Director UAAAN

Dr. Juan Vicente Delgado Bermejo
Director UCO-IdEP

Dr. Cesar A. Meza Herrera
Director UACH-URUZA

Torreón, Coahuila, México



Noviembre 2017

**CONTROL DE LA ACTIVIDAD SEXUAL DE OVEJAS NULÍPARAS MEDIANTE
CARNEROS DORPER TRATADOS CON TESTOSTERONA Y/O GLUTAMATO:
COMPORTAMIENTO SEXUAL Y EFECTO MACHO**

Tesis en Régimen de Co-tutela

Elaborada por **MA. GUADALUPE CALDERÓN LEYVA** como requisito parcial para obtener el doble grado de Doctor en Ciencias en Producción Agropecuaria (UAAAN, México) y Doctor en Recursos Naturales y Gestión Sostenible (UCO-IdEP, España) con la supervisión y aprobación del

Comité de Asesoría



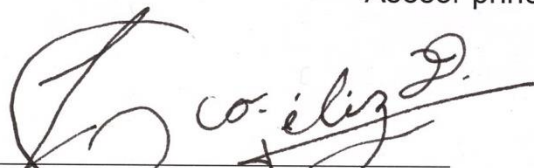
Dr. Rafael Rodríguez Martínez
Asesor principal



Dr. Juan Vicente Delgado Bermejo
Asesor principal



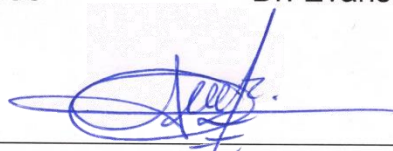
Dr. Cesar A. Meza Herrera
Asesor principal



Dr. Fco. Gerardo Véliz Beras
Asesor



Dr. Evaristo Carrillo Castellanos
Asesor



Dr. Juan Ramón Luna Orozco
Asesor



TÍTULO DE LA TESIS: CONTROL DE LA ACTIVIDAD SEXUAL DE OVEJAS NULÍPARAS MEDIANTE CARNEROS DORPER TRATADOS CON TESTOSTERONA Y/O GLUTAMATO: COMPORTAMIENTO SEXUAL Y EFECTO MACHO

DOCTORANDA: D^a. Ma. Guadalupe Calderón Leyva

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(Se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

Durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, el desempeño de la Doctoranda Ma. Guadalupe Calderón Leyva ha sido satisfactorio tanto en el ámbito científico así como con el cumplimiento de los planes formativos planteados por los programas de postgrado del Doctorado en Ciencias en Producción Agropecuaria y, Doctorado en Recursos Naturales y Gestión Sostenible; pertenecientes a la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (México) y a la Universidad de Córdoba (España), en ambas instituciones se desarrolló y evaluó el trabajo de investigación “**CONTROL DE LA ACTIVIDAD SEXUAL DE OVEJAS NULÍPARAS MEDIANTE CARNEROS DORPER TRATADOS CON TESTOSTERONA Y/O GLUTAMATO: COMPORTAMIENTO SEXUAL Y EFECTO MACHO**”, con el objetivo de instaurar y desarrollar una cooperación científica, además de desarrollar iniciativas de colaboración en materia de investigación.

La Doctoranda, permaneció en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, y para cumplir con el plan formativo en la Universidad de Córdoba realizó dos estancias académicas y de investigación, la primera del 12 de septiembre al 10 de diciembre del año 2014 y la segunda del 20 de septiembre al 20 de diciembre del año 2015, bajo la dirección y supervisión del Dr. Juan Vicente Delgado Bermejo. Durante sus estancias se capacitó en tópicos relacionados con su tema de tesis además de que se integró en actividades que contribuyeron a su formación investigadora.

Los resultados de la tesis han sido publicados en dos artículos científicos,

- Calderón-Leyva G, Meza-Herrera C.A., Rodríguez-Martínez R., Angel-García O., Rivas-Muñoz R., Delgado-Bermejo J.V. and Véliz-Deras F.G. Influence of sexual behavior of Dorper rams treated with glutamate and/or testosterone on reproductive performance of anovulatory ewes. *Theriogenology* 2018 106, 79-86. DOI:org/10.1016/j.theriogenology.2017.10.016

- Calderón-Leyva G, Meza-Herrera C.A., Arellano Rodríguez G., Gaytan-Alemán L.R., Alvarado-Espino A.S., Gonzalez-Graciano E.A., Delgado-Bermejo J.V. and Véliz-Deras F.G. Effect of glutamate supplementation upon semen quality of young seasonally sexual-inactive Dorper rams. *Journal of Animal Research* 2017 7(3), 419-424. DOI: 10.5958/2277-940X.2017.00062.6

En la actualidad hay un trabajo más en revisión:

- Calderon-Leyva G., Meza-Herrera C.A., Rodriguez-Martinez R., Rivas-Muñoz R., Delgado-Bermejo J.V., Veliz-Deras F.G. Effect of glutamate and/or testosterone administration upon appetitive and consummatory sexual behaviors in rams and their influence upon the reproductive performance of nulliparous anovulatory ewes. *Hormones and Behavior* 2017.

Derivado de su proyecto de tesis se ha presentado una comunicación oral en el III Congreso científico de investigadores en formación en Agroalimentación eidA3 y cinco posters, en memorias de congresos a nivel internacional.

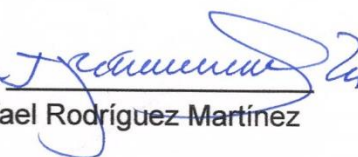
Además, la Doctoranda Calderón-Leyva participó como Co-Directora de una Tesis de Licenciatura (UACH-URUZA, México) a la cual se le otorga la distinción con Mención Honorífica durante su defensa oral y, adicionalmente, también se le otorgó una Mención Honorífica en el 4to. Encuentro de Jóvenes Investigadores en el Área de Biotecnología y Ciencias Agropecuarias, celebrado en Durango, Dgo., México.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 16 de noviembre de 2017

Firma del/de los director/es

Fdo.: 
Dr. Juan Vicente Delgado Bermejo

Fdo.: 
Dr. Rafael Rodríguez Martínez

Fdo.: 
Dr. César A. Meza-Herrera

***Se hace patente un reconocimiento al apoyo recibido
para el desarrollo de la presente investigación:***

Al Programa de Becas Nacionales CONACYT 2013-2016.

*Al Programa de Becas Mixtas en el Extranjero, para Becarios CONACYT
Nacionales 2014 y 2015.*

*Al Programa de Becas Doctorado Iberoamericano en Agroalimentación,
de la Asociación Universitaria Iberoamericana de Postgrado 2013-2015
(AUIP).*

*Al Programa de Doctorado en Ciencias en Producción Agropecuaria
2013-2017 (UAAAN).*

*Al Programa de Doctorado en Recursos Naturales y Gestión Sostenible
en 2013-2017 (UCO).*

*A la Subdirección de Postgrado de la Universidad Autónoma Agraria
Antonio Narro.*

*Al Instituto de Estudios de Postgrado de la Universidad de Córdoba
España (IdEP-UCO).*

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por las todas las bendiciones y la fortaleza para seguir.

A mis guías en el mundo de la ciencia, el Dr. Cesar A. Meza-Herrera y el Dr. Fco. Gerardo Véliz-Deras, gracias por su dedicación y paciencia. A los Doctores Rafael Rodríguez Martínez, Juan Vicente Delgado Bermejo, Evaristo Carrillo Castellanos y al Dr. Juan Ramón Luna Orozco por compartir su gran experiencia, por asesorar y contribuir en el presente trabajo. Gracias a todos por creer en mí, por ser maestros y amigos, y por aceptar ser parte de este proyecto de tesis en régimen de Co-tutela.

Al Dr. Arturo F. Chica, Director de la Escuela de Doctorado de la UCO y Vicerrectorado de Estudios de Posgrado y Formación Continua de la UCO, por su asesoría y su disposición para que se realizará el convenio de tesis en régimen de Co-tutela.

A compañeros y amigos de postgrado en la UAAAN, por mencionar algunos, Oscar, Guillen, Lucy, Alan, Homero, Andrea, Paco, Julieta, Jessy, Caro, Carolina (Honduras), Dra. Lety.

A mis compañeros y amigos de Postgrado en la UCO, Gaby Pizarro, Ander Arando, Javi, María, Jose y Joaquín del departamento de genética y de la Diputación de Córdoba; del otro programa BUAP-UCO a Esteban, Numa y Luis.

A mis padres y hermanos, por su apoyo incondicional.

A Oscar Ángel García, por ser un gran apoyo y por estar en todo momento.

A todas las personas con quien he compartido momentos o espacios a lo largo de este tiempo, gracias por aportar algo de su ser que ha ayudado a obtener este logro en mi vida.

DEDICATORIA

Con mucho cariño...

A mi madre Espedita Leyva, que dentro de tantas y tantas cosas que he aprendido de ti a través de tu ejemplo, el no desistir, ser humilde, trabajadora y agradecida me han llevado muy lejos...

A mi padre Víctor Calderón, que siempre ha sido difícil expresar lo mucho que lo quiero y que es así a pesar del distanciamiento entre nosotros.

A mis hermanos Heriberto, Juan, Irene, Gloria, Verónica, Luis, Carlos y Víctor por estar al pendiente de mis pasos y de la ruta a seguir, por el cariño y el respeto que siempre me han demostrado ... y por esas lindas personitas que me llenan de alegría al recordarlas.

Nuevamente les reitero que son mí guía, mi luz, mi fuerza, mis motivos, mi refugio, mi todo...y que ha sido muy difícil estar lejos de ustedes pero ha valido la pena.

ÍNDICE

Contenido	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
ABREVIATURAS	xiv
RESUMEN	xvii
SUMMARY	xix
I. CARTAS DE ACEPTACIÓN DE LOS ARTÍCULOS	xxi
II. CARTA DE RECEPCIÓN DE ARTÍCULO	xxiv
III. INTRODUCCIÓN	1
IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	5
Hipótesis general	6
Hipótesis específicas	6
Objetivo general	7
Objetivos específicos	7
V. REVISIÓN DE LITERATURA	8
1. FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA DE LOS CARNEROS	9
1.1 Esteroidogénesis testicular	9
1.2 Control hormonal de los testículos mediante mecanismos de retroacción	13
1.3 Espermatogénesis	18
1.4 Reposo sexual en los carneros	22
1.5 Comportamiento sexual	28
1.5.1 Descripción del comportamiento sexual de los carneros	32
1.5.2 Endocrinología del comportamiento sexual	35

1.5.3 Tratamientos estimulatorios del comportamiento sexual de los carneros	39
1.5.4 Función neuroendocrina del glutamato en el comportamiento sexual	42
2. FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA DE LAS OVEJAS	50
2.2 Estacionalidad Reproductiva en la Oveja	54
2.3 Efecto macho	57
VI. ARTÍCULOS	61
Influencia del comportamiento sexual de carneros Dorper tratados con glutamato y/o testosterona sobre el comportamiento reproductivo de ovejas anovulatorias ..	62
Efecto de la administración de glutamato y/o testosterona sobre el comportamiento sexual apetitivo y consumatorio en carneros y su influencia sobre el comportamiento reproductivo de ovejas nulíparas anovulatorias	71
Efecto de la suplementación de Glutamato sobre la calidad seminal de carneros jóvenes Dorper con inactividad sexual estacional	94
VII. CONCLUSIONES	101
Conclusiones específicas	102
Conclusiones generales	103
VIII. REFERENCIAS	104

ÍNDICE DE FIGURAS

Núm.	Título	Pág.
1	Metabolismo de esteroides en el testículo	8
2	Ruta de la biosíntesis de testosterona en las células de Leydig	10
3	Representación esquemática de hipotálamo-hipófisis-gónadas	13
4	Diagrama simplificado del control de la retroacción negativa en el eje hipotálamo-hipófisis-testículo	15
5	Sección del epitelio germinal de los túbulos seminíferos con diferentes estadios en la formación de los espermatozoides	16
6	Interrelación entre las hormonas producidas por el hipotálamo, el lóbulo anterior de la pituitaria, las células de Sertoli y las células de Leydig para el control de la espermatogénesis	17
7	Concentraciones de la hormona luteinizante y testosterona en suero sanguíneo después de la aplicación subcutánea de glutamato	19
8	Cambios estacionales en la producción diaria de espermatozoides en carneros adultos	22
9	Efecto del decrecimiento e incremento del fotoperiodo sobre la circunferencia escrotal, las concentraciones de testosterona, LH y FSH	23
10	Esquema del tracto fotoneuroendocrino en reproductores de días largos y días cortos	24
11	Diagrama de la correlación hormonal/neural del comportamiento reproductivo	28
12	Comportamiento sexual de búsqueda los carneros, pataleo y aproximación	30
13	Comportamiento sexual consumatorio en los carneros, intento de monta y monta completa	32

14	Clasificación de los receptores a glutamato	41
15	Diferentes formas de liberación del glutamato	43
16	Modelo que muestra la posible interacción entre el glutamato, el ON, y la Dopamina en el APOM	47
17	Endocrinología del ciclo estral de la oveja	50
18	Oleadas foliculares en el ciclo estral de la oveja	52
19	Variaciones estacionales de la ocurrencia de ovulaciones y de comportamiento estral en ovejas	53
20	Estacionalidad reproductiva en reproductores de días largos y de días cortos	56
21	Ciclo reproductivo anual de las ovejas, un resumen de los métodos actuales para el control de la reproducción	59

ABREVIATURAS

Abreviaturas	Español	Inglés
17 β -HSD	17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa	17 β -hydroxysteroid dehydrogenase
3 β -HSD	3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa	3 β -hydroxysteroid dehydrogenase
A15	Núcleo hipotalámico A15	Hypothalamic nucleus A15
AMPA	DL- α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole + ácido propiónico	α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico	Cyclic adenosine monophosphate
APOM	Área preóptica medial	Medial preoptic area
ARC	Núcleo arqueado	Arcuate nucleus
ATP	Adenosín trifosfato	Adenosine triphosphate
BNST	Cama del núcleo de la estría terminalis	Bed nucleus of the stria terminalis
Ca ²⁺	Calcio	Calcium
CaM	Calcio Calmodulina	Calcium Calmodulin
CL	Cuerpo lúteo	Corpus luteum
cm	Centímetro	Centimeter
CSA	Comportamiento sexual apetitivo	Sexual behavior appetitive
CSC	Comportamiento sexual consumatorio	Sexual behavior consummatory
DA	Dopamina	Dopamine
DAT	Transportadores de dopamina	Dopamine transporters
DHT	Dihidrotestosterona	Dihydrotestosterone
E ₂	Estradiol	Estradiol
eCG	Gonadotropina coriónica equina	Equine chorionic gonadotropin
EM	Eminencia media	Middle eminence
FSH	Hormona folículo estimulante	Follicle-stimulating hormone
g	Gramo	Gramme
GABA	Ácido gamma-aminobutírico	Gamma-aminobutyric

		acid
GluRs	Receptores glutamato	Glutamate receptors
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas	Gonadotropin-releasing hormone
h	Hora(s)	Hour
HPG	Hipotálamo hipófisis gónadas	Hypothalamus-pituitary-gonads
IGF-1	Factor de crecimiento análogo a insulina	Insulin-like growth factor
iGlu	Receptores glutamato ionotrópicos	Iontropic glutamate receptors
LBD	Lipoproteínas de baja densidad	Low density lipoproteins
LH	Hormona luteinizante	Hormone Luteinizing
LHRH	Hormona liberadora de la hormona luteinizante	Luteinizing hormone releasing hormone
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos	Mitogen-Activated Protein Kinases
MeA	Amígdala medial	Medial amygdala
mGlu	Receptores glutamato metabotrópicos	Metabotropic glutamate receptors
ml	Mililitros	Milliliter
N	Norte	North
ng	Nanogramo	Nanogramme
NMDA	N-metil-D-aspartato	<i>N</i> -methyl-d-aspartate
NPV	Núcleo paraventricular	Paraventricular nucleus
NPY	Neuropéptido Y	Neuropeptide Y
NSC	Núcleo supraquiasmático	Suprachiasmatic nucleus
NSO	Núcleo supraóptico	Supraoptic nucleus
NVM	Núcleo ventromedial	Ventromedial nucleus
ON	Óxido nítrico	Nitric oxide
ONS	Óxido nítrico sintetasa	Nitric oxide synthase
OPC	Células precursoras de oligodendrocitos	Oligodendrocyte precursor cells
P ₄	Progesterona	Progesterone
P450c17	17 α -hidroxilasa/C ₁₇₋₂₀ liasa	17 α -hydroxylase/C _{17,20} lyase
P450scc	Enzima de desdoblamiento de la cadena lateral de colesterol	Cholesterol side-chain cleavage enzyme
PGF2 α	Prostaglandina F2 α	Prostaglandin F2 α

PKA	Proteína quinasa A	Protein kinase A
PKC	Proteína quinasa C	Protein kinase C
PSD-95	Proteína de densidad postsináptica 95	postsynaptic density protein 95
R-LH	Receptor de LH	LH-receptor
SCP2	Proteína transportadora de esteroides 2	Sterol carrier protein 2
SNARE	Receptor de proteína de unión al factor sensible a N-etilmaleimida soluble	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor
SNC	Sistema nervioso central	Central nervous system
StAR	Proteína reguladora aguda esteroideogénica	Steroidogenic acute regulatory protein
UI	Unidades internacionales	International units
TS	Túbulos seminíferos	Seminiferous tubules

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la administración de glutamato y/o testosterona sobre los indicadores de la actividad reproductiva y del comportamiento sexual en ovinos jóvenes y adultos de la raza Dorper, además de la capacidad de estos machos para incrementar la respuesta sexual de las ovejas nulíparas anovulatorias Dorper a través del efecto macho durante fotoperiodos crecientes. Se realizaron 3 experimentos en el norte de México (25°LN y 103°LO) durante 2014 y 2015 al inicio de la primavera bajo condiciones naturales de luz. Se utilizaron carneros Dorper (jóvenes con 11 meses de edad, 56 ± 0.9 kg y adultos con 2-3 años de edad, 81 ± 0.32 kg) los cuales se dividieron en grupos experimentales y a cada grupo se administró uno de los siguientes tratamientos: glutamato, testosterona, glutamato + testosterona y testigo. Al finalizar los tratamientos de los carneros, para evaluar el efecto macho se utilizaron ovejas nulíparas anovulatorias Dorper (7-8 meses de edad) donde se midieron variables reproductivas tales como el intervalo de inicio de estro, tasa ovulatoria, número de cuerpos lúteos y tasa de preñez. En el *Experimento 1*, se planteó la hipótesis que durante el reposo reproductivo, la administración de glutamato y/o testosterona en carneros adultos Dorper tendría la capacidad de incrementar los indicadores del comportamiento sexual, y que consecuentemente, los carneros tratados inducirían la actividad reproductiva de ovejas anovulatorias durante fotoperiodos crecientes. Con los resultados obtenidos se concluyó que la administración de glutamato o glutamato + testosterona en carneros adultos Dorper durante fotoperiodos crecientes en la época natural de reposo sexual, incrementan tanto el comportamiento sexual apetitivo como el consumatorio, y que a su vez, estos carneros tratados provocan una respuesta estral más rápida, una mayor tasa ovulatoria, número de cuerpos lúteos y tasa de preñez en las ovejas nulíparas anovulatorias. En el *Experimento 2*, la hipótesis de trabajo propuso que durante el reposo reproductivo, la administración de glutamato y/o testosterona en carneros jóvenes Dorper tiene la capacidad de incrementar el comportamiento sexual de los machos, y que consecuentemente, los machos tratados inducen

la reactivación de la función ovárica de ovejas nulíparas anovulatorias a través del efecto macho. Los resultados permitieron concluir que el comportamiento sexual de los carneros jóvenes Dorper se puede mejorar a través de la administración de glutamato + testosterona, y que tales carneros promueven resultados reproductivos alentadores en las ovejas Dorper anestrícas-acíclicas a través del efecto macho. Esta respuesta socio-sexual puede ser una importante alternativa reproductiva para inducir la reactivación de la actividad ovárica de ovejas acíclicas fuera de la estación reproductiva, así como en un periodo más corto de tiempo. En el *Experimento 3* se planteó como hipótesis que la administración de glutamato incrementa el volumen y la calidad seminal en carneros Dorper bajo un esquema de fotoperiodos crecientes, inhibitorios de la actividad sexual. Los resultados reflejaron una mayor concentración espermática en los carneros tratados con glutamato que en los carneros del grupo testigo, por lo que se concluyó que tratamientos con glutamato en carneros Dorper bajo fotoperiodos crecientes afectan el proceso de la espermatogénesis. De manera general a través de los experimentos realizados se revela un posible estímulo sinérgico proporcionado por la administración de glutamato + testosterona al incrementar el comportamiento sexual de los carneros jóvenes y adultos de la raza Dorper y, a su vez, el rendimiento reproductivo de las ovejas nulíparas anovulatorias expuestas a estos carneros previamente tratados. En el mismo sentido, los resultados de esta investigación revelan al glutamato como una molécula con efectos alentadores que puede tener aplicaciones transmisibles a otras especies y a otros sistemas de producción pecuaria.

Palabras clave: carneros Dorper, glutamato, testosterona, comportamiento sexual, ovejas nulíparas anovulatorias.

SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the effect of the administration of glutamate and/or testosterone upon some indicators of reproductive activity and sexual behavior in young and adult male Dorper rams, as well as the ability of these males to increase the response of the nulliparous anovulatory Dorper ewes through the male effect during increasing photoperiods. A total of three experiments were carried out in northern Mexico (25° N, 103° W) during 2014 and 2015 at the beginning of spring under natural light conditions. Young (11 mo. 56 ± 0.9 kg) and adult (2-3 yr. 81 ± 0.32 kg) Dorper rams were distributed to experimental groups and receiving the following treatments: glutamate, testosterone, glutamate + testosterone and control. At the end of the treatments and in order to evaluate the male effect, treated rams were exposed to anovulatory-nulliparous Dorper ewes (7-8 months of age) quantifying different response variables: estrus onset interval, ovulatory rate, number of corpora lutea and rate of pregnancy. In *Experiment 1*, it was hypothesized that during reproductive rest, the administration of glutamate and/or testosterone in adult Dorper rams would have the ability to increase the indicators of sexual behavior, and that consequently would induce the reproductive activity of anovulatory Dorper ewes during increasing photoperiods. The administration of glutamate or glutamate + testosterone in adult Dorper rams during increased photoperiods in the natural period of sexual rest, increased both the appetitive and consummatory sexual behaviors, and in turn, these treated rams induced not only faster estrus response but also an increased ovulatory and pregnancy rates, in the nulliparous anovulatory Dorper ewes. In *Experiment 2*, we hypothesized that the administration of glutamate and/or testosterone in young Dorper rams during the reproductive rest increased the sexual behavior of males, and once exposed to nulliparous anovulatory Dorper ewes would induce the reactivation of the function ovulatory of through the male effect. Results of this trial allows us to conclude that the sexual behavior of young Dorper rams can be improved through the administration of glutamate + testosterone, and that glutamate + testosterone treated rams improved the reproductive outcomes

anestrous-acyclic Dorper ewes through the male effect. This socio-sexual response can be an important reproductive alternative to induce reactivation of the ovarian response of acyclic ewes outside the reproductive season, as well as in a shorter period of time. In the *Experiment 3*, it was hypothesized that the administration of glutamate increases the volume and seminal quality in Dorper rams under a scheme of increasing photoperiods, inhibitory of sexual activity. From this trail, we concluded that a higher sperm concentration was observed in those glutamate-treated rams regarding the control group. Therefore, it was concluded that glutamate treatments in Dorper rams under increasing photoperiods affect the process of spermatogenesis. In general, through the different studies carried out, a possible synergistic stimulus provided by the administration of glutamate + testosterone upon an increased sexual behavior of both young and adult Dorper rams. In turn, these treated males increased the reproductive outcomes of anovulatory nulliparous Dorper ewes through the male effect. In addition, information obtained from these studies unveils to glutamate as an interesting molecule which generated encouraging reproductive outcomes during the anestrous season. Such results can be applied to other animal industries and production systems.

Keywords: Dorper rams, glutamate, testosterone, sexual behavior, anovulatory nulliparous ewes.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Tesis en Régimen de Co-tutela

Control de la actividad sexual de ovejas nulíparas mediante
carneros Dorper tratados con testosterona y/o glutamato:
comportamiento sexual y efecto macho

I.

CARTAS DE ACEPTACIÓN DE LOS ARTÍCULOS

Doctorado en Ciencias en Producción Agropecuaria
Doctorado en Recursos Naturales y Gestión Sostenible



Theriogenology



From: eesserver@eesmail.elsevier.com <eesserver@eesmail.elsevier.com> on behalf of Leonardo Brito <eesserver@eesmail.elsevier.com>
Sent: Saturday, October 7, 2017 3:04 PM
To: cmeza2020@hotmail.com; cmeza2000@gmail.com
Subject: Your Submission THERIO-D-17-00357R3

Ms. Ref. No.: THERIO-D-17-00357R3

Title: Influence of sexual behavior of Dorper rams treated with glutamate and/or testosterone on reproductive performance of anovulatory ewes.
Theriogenology

Dear Dr. Meza-Herrera,

I am pleased to confirm that your manuscript, "Influence of sexual behavior of Dorper rams treated with glutamate and/or testosterone on reproductive performance of anovulatory ewes., has been accepted for publication in Theriogenology.

Your accepted manuscript will now be transferred to our production department and work will begin on creation of the proof. If we need any additional information to create the proof, we will let you know. If not, you will be contacted again in the next few days with a request to approve the proof and to complete a number of online forms that are required for publication.

When your paper is published on ScienceDirect, you want to make sure it gets the attention it deserves. To help you get your message across, Elsevier has developed a new, free service called AudioSlides: brief, webcast-style presentations that are shown (publicly available) next to your published article. This format gives you the opportunity to explain your research in your own words and attract interest. You will receive an invitation email to create an AudioSlides presentation shortly. For more information and examples, please visit <http://www.elsevier.com/audioslides>.

Thank you for submitting your work to this journal.

Sincerely,

Leonardo Brito, DVM, PhD, DACT
Associate Editor
Theriogenology

JOURNAL OF ANIMAL RESEARCH

Print ISSN No : 2249-5290

Online ISSN No: 2277-940X

www.ndpublisher.in

NAAS rating: 5.68

Date: 07 May, 2017

Dr. M.G. Calderón-Leyva

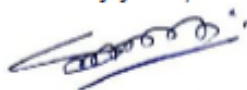
Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Unidad Laguna, Posgrado en Ciencias en Producción Agropecuaria, Periférico Raúl López Sánchez y Carretera a Santa Fe, Torreón, Coahuila, MÉXICO

Sub: Acceptance letter

Dear Author

We are pleased to inform you that your manuscript entitled "Effect of Glutamate Supplementation upon Semen Quality of Young Seasonally Sexual-Inactive Dorper Rams" by M.G. Calderón-Leyva, C.A. Meza-Herrera, G. Arellano-Rodriguez, L.R. Gaytan-Alemán, A.S. Alvarado-Espino, E.A. Gonzalez-Graciano, J.V. Delgado-Bermejo, F.G. Véliz-Deras has been peer reviewed finally by Editorial committee and is accepted for the publication in Journal of Animal Research. You are requested to make yourself available for necessary editing/reviewing/ revision in the galley proof, if needed before final printing. Demand letter of publication charges will be send with a galley proof. We appreciate your valuable prompt response and early consideration.

Sincerely yours,



Neelesh Sharma, M.V.Sc., PhD (South Korea)
Founder Editor-In-Chief
Journal of Animal Research

Reach us at:



NEW DELHI PUBLISHERS

90, SainikVihar, Mohan Garden, Uttam Nagar, New Delhi-110059

Ph No: 011-25372232, 9971676330, 9582248909

E Mail: journalofanimalresearch@gmail.com



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Tesis en Régimen de Co-tutela

Control de la actividad sexual de ovejas nulíparas mediante
carneros Dorper tratados con testosterona y/o glutamato:
comportamiento sexual y efecto macho

II.

CARTA DE RECEPCIÓN DE ARTÍCULO

Doctorado en Ciencias en Producción Agropecuaria
Doctorado en Recursos Naturales y Gestión Sostenible



Hormones and Behavior



From: Hormones and Behavior <EvisSupport@elsevier.com>
Sent: Tuesday, September 12, 2017 10:23 PM
To: cmeza2020@hotmail.com
Subject: Submission HB_2017_327 received by Hormones and Behavior

This message was sent automatically. Please do not reply.

Ref: HB_2017_327

Title: Effect of glutamate and/or testosterone administration upon appetitive and consummatory sexual behaviors in rams and their influence upon the reproductive performance of nulliparous anovulatory ewes.

Journal: Hormones and Behavior

Dear Dr. Meza-Herrera,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Hormones and Behavior. Your submission was received.

Thank you for submitting your work to Hormones and Behavior.

Kind regards,

Hormones and Behavior

Have questions or need assistance?

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

Copyright © 2017 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Tesis en Régimen de Co-tutela

Control de la actividad sexual de ovejas nulíparas mediante
carneros Dorper tratados con testosterona y/o glutamato:
comportamiento sexual y efecto macho

III.

INTRODUCCIÓN

Doctorado en Ciencias en Producción Agropecuaria
Doctorado en Recursos Naturales y Gestión Sostenible

A nivel mundial la carne de ovinos representa una pequeña parte del total del producto cárnico comercializado, pero tiene un impacto social y económico relevante en los países productores de carne de ovinos (Andrade *et al.*, 2017). Las ovejas y las cabras representan el 65% de la población mundial de rumiantes con 1,196 millones de ovejas y 1,000 millones de cabras en el total de 3,402 millones de cabezas (FAOSTAT, 2014; Marino *et al.*, 2016). En el caso específico de México, la producción de ovinos desempeña un papel socioeconómico crucial que contribuye a proporcionar productos de la demanda nacional de carne de cordero, y lana (Vázquez-García, 2013). A pesar de que México ha mejorado su productividad, sólo genera el 70% de la carne ovina que consume, por lo que tiene un mercado interno potencial, cercano a 30,000 toneladas anuales. Además, nuestro país ha recibido la petición de exportar carne y animales a países como Jordania, Turquía, Libia, India y Corea del sur, además de Centroamérica (Partida *et al.*, 2013).

En México, en los últimos 10 años, la producción de carne ha incrementado un 21%, las características propias de cada región, determinadas por la disponibilidad de recursos y por los hábitos o tradiciones en el consumo de productos ovinos, ocasionan fluctuaciones estacionales a lo largo del año, lo que genera una marcada irregularidad en la oferta de ganado y provoca marcadas diferencias en la conformación, condición corporal y en el peso que alcanzan los animales al momento de la venta, lo cual contrasta fuertemente con dos requisitos fundamentales que exige el mercado formal; que son la constancia en el suministro de animales y uniformidad en la calidad del producto ofertado (Partida *et al.*, 2013).

Hasta hace pocos años, los rebaños ovinos de las regiones árida y semiárida del norte y centro de México estaban conformados principalmente por animales de la raza Merino Rambouillet, sin embargo en las últimas dos décadas ha iniciado la introducción de razas de pelo, como la Pelibuey y Blackbelly, y más recientemente con las razas Dorper y Katahdin, debido a que los ovinos de pelo son más fáciles de manejar (González-Godinez *et al.*, 2014). Asimismo, en

ovinos de pelo se han reportado resultados variables de los efectos del fotoperiodo en la reproducción, sobre todo en las regiones tropicales y subtropicales, donde los cambios en la duración del día a través del año no son tan evidentes (Rosa y Bryant, 2003; Arroyo *et al.*, 2006). Por ello, en los últimos años, se ha incrementado el interés por emprender estudios para conocer el comportamiento reproductivo de la raza Dorper (Cloete *et al.*, 2000; Fourier *et al.*, 2005; Zeleke *et al.*, 2005; Zishiri *et al.*, 2013; González-Godínez *et al.*, 2014) y aumentar la productividad y la eficiencia de la producción de carne de cordero (Montossi *et al.*, 2013), debido a que la estacionalidad reproductiva que muestra esta especie constituye un serio impedimento (González-Godínez *et al.*, 2014).

Durante el fotoperiodo de días crecientes, en la oveja se presenta la etapa de anestro estacional, en la que disminuye la liberación de GnRH (amplitud y frecuencia de pulso) y se expresa con la ausencia de ciclos estrales regulares, poca receptividad sexual y fallos en la ovulación, mientras que en el carnero, se observa atrofia testicular, reducción de la espermatogénesis, disminución de la producción de testosterona de las células de Leydig (Young y Nelson, 2001), y de la libido (Arroyo, 2011). Esta etapa de reposo sexual en los machos ovinos se puede modificar a través de la manipulación del fotoperiodo, con la simulación de días largos seguidos de días cortos la actividad sexual puede ser reanudada (Malpoux *et al.*, 1997).

En los carneros, cuando disminuye la duración del día, se estimula la glándula pituitaria, así como, la secreción de las gonadotrofinas y la actividad testicular (Langford *et al.*, 1999). Otros factores ambientales naturales, tales como la presencia de individuos de la misma especie, pueden influir ligeramente en el momento de aparición de la época reproductiva. Cuando los carneros se colocan con ovejas anovulatorias que han sido previamente aisladas de los carneros, una proporción del rebaño ovulará, mostrará estro y quedará preñada (Martin *et al.*, 1986; Abecia *et al.*, 2015), fenómeno al que se le conoce como "efecto macho" (Abecia *et al.*, 2015).

Durante décadas, los criadores de ovejas han utilizado el “efecto macho” como una oportunidad para adelantar la temporada de empadre e incrementar la eficacia del apareamiento, además de proporcionar un grado de sincronía en el momento de la monta y posteriormente, en el momento del parto (Lindsay, 1996). Sin embargo, es necesario considerar que los carneros deben presentar una intensa actividad sexual para estimular la ovulación de un mayor porcentaje de ovejas anovulatorias (Perkins y Fitzgerald, 1994).

Para incrementar la efectividad del efecto macho se han utilizado tratamientos fotoperiodicos de días largos (16h luz y 8h oscuridad) más implantes de melatonina, que estimulan la secreción con testosterona (Delgadillo *et al.*, 2001). También se han utilizado tratamientos hormonales como estrógenos, testosterona y eCG, que son métodos sencillos, efectivos y de fácil aplicación (De Santiago-Miramontes *et al.*, 2011; Luna-Orozco *et al.*, 2012; Tejada *et al.*, 2016). Sin embargo, los tratamientos fotoperiodicos requieren de técnicas adecuadas e instalaciones de alto costo, muchas veces difíciles de implementar en sitios sin energía eléctrica (Luna-Orozco *et al.*, 2012). Asimismo, la legislación de algunos países prohíbe el uso de productos hormonales, por lo que se requiere desarrollar investigación innovadora que genere un mejor entendimiento de los procesos neuro-fisiológicos alrededor de este tema, y mejorar las técnicas de manejo aplicadas a la reproducción para incrementar la eficiencia productiva del rebaño (Orihuela, 2014). Por ello, el uso del glutamato podría ser una buena alternativa, ya que investigaciones previas han reportado que a nivel cerebral interviene en el comportamiento sexual (Dominguez, 2009), y que está implicado en la regulación directa e indirecta de la secreción de GnRH, promoviendo la liberación pulsátil de LH y, en la producción de testosterona en los machos (Dhandapani y Brann, 2000; Meza-Herrera *et al.*, 2009; Will *et al.*, 2014) a través de la distribución diferencial de GluRs en las células de Leydig y en el epitelio germinal de los túbulos seminíferos de los testículos, teniendo un papel específico en la espermatogénesis y la regulación hormonal (Gill *et al.*, 2000).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Tesis en Régimen de Co-tutela

Control de la actividad sexual de ovejas nulíparas mediante
carneros Dorper tratados con testosterona y/o glutamato:
comportamiento sexual y efecto macho

IV.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Doctorado en Ciencias en Producción Agropecuaria
Doctorado en Recursos Naturales y Gestión Sostenible

Hipótesis general

Durante fotoperiodos crecientes, tratamientos con glutamato y/o testosterona incrementan los indicadores de la actividad reproductiva y el comportamiento sexual de machos jóvenes y adultos de la raza Dorper, y estos a su vez, son capaces de incrementar la respuesta sexual de ovejas nulíparas anovulatorias a través del efecto macho.

Hipótesis específicas

1. Durante el reposo reproductivo, la administración de glutamato y/o testosterona en carneros adultos Dorper, incrementan los indicadores de actividad reproductiva y de comportamiento sexual de los machos.
2. Durante el fotoperiodo creciente, los carneros Dorper jóvenes tratados frecuentemente con glutamato y/o testosterona incrementan su comportamiento sexual.
3. Los carneros jóvenes y adultos de la raza Dorper tratados previamente con glutamato y/o testosterona, inducen la reactivación de la función ovárica de ovejas nulíparas anovulatorias a través del efecto macho.
4. La administración de glutamato incrementa el volumen y calidad seminal en carneros Dorper bajo un esquema de fotoperiodos crecientes, inhibitorios de la actividad sexual.

Objetivo general

Evaluar el efecto de la administración de glutamato y/o testosterona sobre los indicadores de actividad reproductiva y del comportamiento sexual en machos jóvenes y adultos de la raza Dorper, además de la capacidad de estos machos para incrementar la respuesta sexual de las ovejas nulíparas anovulatorias a través del efecto macho durante fotoperiodos crecientes.

Objetivos específicos

1. Determinar si la administración de glutamato y/o testosterona en carneros adultos Dorper durante el reposo reproductivo es capaz de incrementar los indicadores de actividad reproductiva y el comportamiento sexual durante fotoperiodos crecientes.
2. Evaluar si tratamientos frecuentes con glutamato y/o testosterona en carneros jóvenes Dorper incrementan el comportamiento sexual durante fotoperiodos crecientes.
3. Evaluar si a través del efecto macho, carneros jóvenes y adultos de la raza Dorper tratados previamente con glutamato y/o testosterona pueden inducir la reactivación de la función ovárica de ovejas nulíparas anovulatorias.
4. Valorar la acción de tratamientos con glutamato sobre el volumen y calidad seminal en carneros Dorper bajo un esquema de fotoperiodos crecientes, inhibitorios de la actividad sexual.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Tesis en Régimen de Co-tutela

Control de la actividad sexual de ovejas nulíparas mediante
carneros Dorper tratados con testosterona y/o glutamato:
comportamiento sexual y efecto macho

IV.

REVISIÓN DE LITERATURA

Doctorado en Ciencias en Producción Agropecuaria
Doctorado en Recursos Naturales y Gestión Sostenible

1. FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA DE LOS CARNEROS

1.1 Esteroidogénesis testicular

En las gónadas, el proceso de síntesis de andrógenos, progestinas y estrógenos a partir del colesterol, se lleva a cabo por diversas enzimas, entre las cuales se encuentran diferentes tipos de citocromo P450, deshidrogenasas de esteroides y reductasas. La síntesis de las hormonas esteroideas inicia con la conversión del colesterol a pregnenolona por la enzima citocromo P450_{scc}/Cyp11A1, localizada en la membrana interna mitocondrial (Gómez-Chang *et al.*, 2012; Rojas *et al.*, 2015).

La esteroidogénesis testicular consiste casi en su totalidad, en la producción de andrógenos dentro del compartimento intersticial del testículo, más específicamente, por aproximadamente 500 millones de células intersticiales de Leydig (Stocco y McPhaul, 2006), bajo el control de la liberación episódica de LH, que interactúa con el receptor LH en la superficie de las células de Leydig (Gómez-Chang, 2012). A partir de los ésteres de colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (LBD), las células de Leydig obtienen el colesterol del plasma. Las LBD atraviesan la membrana plasmática por endocitosis mediada por receptores; los ésteres de colesterol pueden almacenarse en forma de gotas de lípidos o convertirse en colesterol libre para ser utilizado en la síntesis. El colesterol es transformado en pregnenolona en la mitocondria, por lo que el colesterol, unido a una proteína transportadora de esteroides (SCP2), debe transportarse e internarse en esta estructura. Cuando el colesterol es convertido en pregnenolona, ésta última es liberada de la mitocondria y se transporta al retículo endoplásmico liso, donde se completa la esteroidogénesis. La síntesis de testosterona se lleva a cabo a través de dos rutas metabólicas: a partir de 17-hidroxi-pregnenolona (ruta $\Delta 5$), o a partir de 17-hidroxi-progesterona (ruta $\Delta 4$). Los esteroides intermedios de la ruta $\Delta 5$ pueden convertirse en los esteroides de la ruta $\Delta 4$ correspondiente. La testosterona puede metabolizarse en otros esteroides biológicamente activos,

en dihidrotestosterona (DHT) a través de la enzima 5 α -reductasa. Por la ruta de la aromatasa, la testosterona puede metabolizarse en estradiol y la androstenediona en estrona (Figura 1) (Rojas *et al.*, 2015).

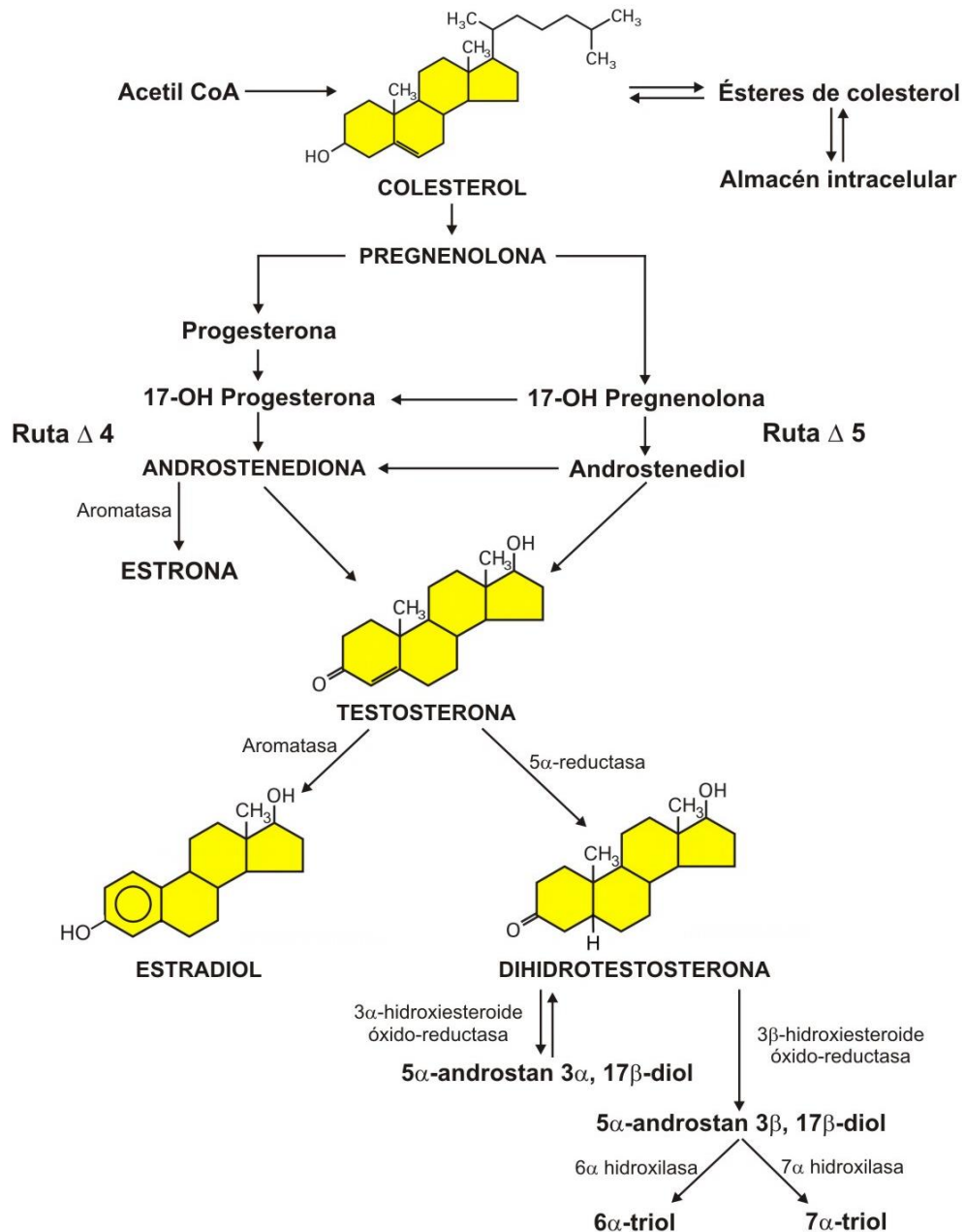


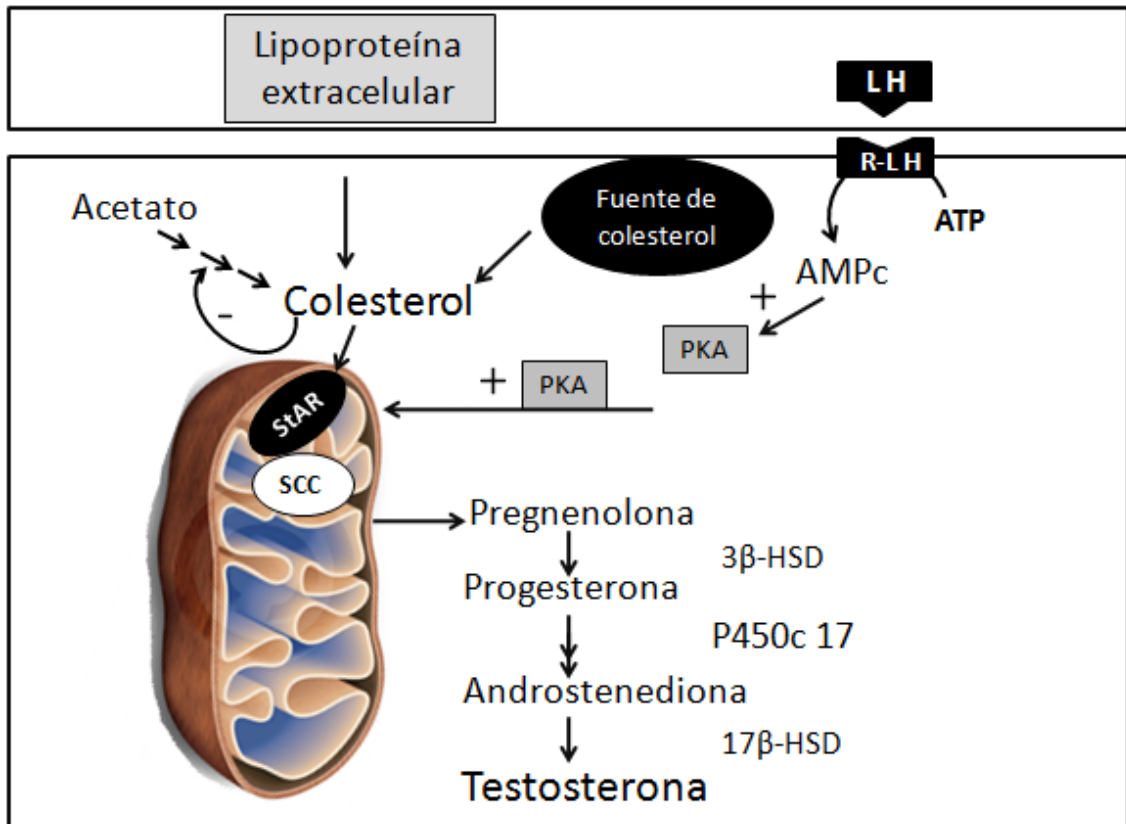
Figura 1. Metabolismo de esteroides en el testículo. La síntesis de testosterona puede llevarse a cabo a partir de la 17-hidroxi-pregnenolona (ruta $\Delta 5$) o a partir de la 17-hidroxi-progesterona (ruta $\Delta 4$). La importancia de estas dos vías varía según la especie (tomado de Rojas *et al.*, 2015).

La síntesis de los andrógenos se regula por el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas; después de la pubertad, la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) es sintetizada y secretada en el hipotálamo medio basal y el área preóptica (APOM) en una forma pulsátil (Meza-Herrera, 2008). Esta proteína hormonal llega al sistema hipofiseal portal, y desde ahí entra en contacto con la pituitaria anterior, estimulando a los gonadotropos, donde la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), estimula la secreción de la hormona luteinizante (LH) en la adenohipófisis (Rojas *et al.*, 2015; Coss, 2017). La LH liberada de los gonadotropos llega al testículo por vía endocrina e interactúa con los receptores específicos de LH en la superficie de las células de Leydig (Hales *et al.*, 1999; Gómez-Chang *et al.*, 2012).

La vía de señalización de transducción utilizada después de la interacción del receptor LH/LH, acoplada a la proteína G en la membrana plasmática, activa la adenilato ciclasa que cataliza la conversión de ATP (adenosín trifosfato) a AMPc (adenosín monofosfato cíclico), el segundo mensajero intracelular para LH en las células de Leydig. El AMPc tiene dos funciones principales en la biosíntesis de la testosterona: la estimulación aguda de la movilización y el transporte del colesterol en la ruta esteroidogénica y, la regulación transcripcional de la expresión génica de la enzima esteroidogénica. Las acciones del AMPc son mediadas por la activación de la PKA (proteína quinasa A). La PKA a su vez, activa la movilización del colesterol a partir de grupos de colesterol intracelular, de fuentes de lipoproteínas extracelulares, o de la *novo* síntesis de colesterol. Independientemente de su origen, la transferencia del colesterol a la membrana mitocondrial interna es un proceso dependiente de AMPc que requiere la acción de la proteína reguladora esteroidogénica (StAR). El colesterol se convierte en pregnenolona mediante la acción de la enzima de desdoblamiento de la cadena lateral de colesterol P450 (P450_{scc}), que reside en la parte interna de la membrana de la matriz mitocondrial. La pregnenolona se difunde al retículo endoplasmático liso donde se convierte en progesterona mediante la acción de la isomerasa 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa-Δ⁴-Δ⁵

(3β -HSD). La progesterona se convierte a su vez en 17α -hidroxiprogesterona, luego en androstenediona por la acción de 17α -hidroxilasa/ C_{17-20} liasa (P450c17), la cual finalmente se convierte androstenediona en testosterona a través de la acción de la 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β -HSD) (Figura 2) (Hales *et al.*, 1999).

Figura 2. Ruta de la biosíntesis de testosterona en las células de Leydig



(adaptado de Hales *et al.*, 1999).

Esta cascada de transducción de señal no es la única en activarse, ya que el testículo genera una gran variedad de moléculas reguladoras que inducen vías activadoras independientes de AMPc, como es el caso de los factores de crecimiento como IGF-I, que estimulan la expresión de StAR y la síntesis de hormonas esteroideas a través de vías que involucran a la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) y la proteína quinasa C (PKC). Algunas citosinas, derivadas de los macrófagos y del ácido araquidónico producen la

activación de PKC, y en ciertos casos, éstos funcionan en sinergia con LH para promover la esteroidogénesis testicular. Estas observaciones sugieren la presencia en el testículo de tres vías de señalización, que al activarse y que al comunicarse entre ellas modifican la tasa de síntesis hormonal. La participación de otras vías de señalización en la esteroidogénesis testicular no solamente involucra a las diferentes quinasas, sino también al tipo de segundo mensajero que induce su activación (Gómez-Chang *et al.*, 2012).

Las acciones andrógenas más significativas ocurren sólo una vez y producen cambios anatómicos irreversibles, durante la embriogénesis (por ejemplo, la inducción de órganos sexuales accesorios y copulatorios, y la diferenciación masculina de las áreas cerebrales), o en la pubertad (por ejemplo, el aumento de la masa corporal, de la laringe o dientes, la organogénesis modificada de la piel induciendo marcación de las glándulas, dientes modificados, desarrollo de cuernos o astas), y favoreciendo el mantenimiento de la espermatogénesis y la conducta sexual (Stocco y McPhaul, 2006; Gómez-Chang *et al.*, 2012; Schlatt y Ehmcke, 2014). Sin embargo, la testosterona sola tiene poca acción biológica directa, por lo que se requiere primero la conversión a su metabolito 5 α -reductasa, DHT, o su aromatización a estrógeno antes de lograr actividad biológica (Stocco y McPhaul, 2006). Debido a estas acciones anatómicas y usualmente irreversibles de la testosteronemia, las características específicas de la especie se producen durante la diferenciación de los sexos y presentan la aparición de vertebrados masculinos y femeninos diferentes (Schlatt y Ehmcke, 2014).

1.2 Control hormonal de los testículos mediante mecanismos de retroacción

Las dos hormonas gonadotrópicas, la hormona folículo estimulante (FSH) y LH son los actores centrales en el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (HHG). El generador de impulsos GnRH en el hipotálamo se considera el interruptor maestro de encendido y apagado del eje reproductor. Una amplia gama de información, por ejemplo, la edad, la nutrición, el estatus social y el estrés, se

utilizan para crear una decisión de cuales funciones reproductivas de un individuo deben ser (re) iniciadas o detenidas. El generador de impulsos GnRH actúa a través del receptor transmembranal de GnRH y controla todo el sistema reproductivo con dos señales endocrinas principales para el testículo originadas de los gonadotropos hipofisarios y son las distintas hormonas heterodiméricas de glucoproteína: FSH y LH (Gerlach y Aurich, 2000).

Un modelo hipotético de regulación hormonal maestra es aquel en el que la GnRH controla dos circuitos de retroalimentación, totalmente independientes, responsables de la espermatogénesis (FSH-inhibina) o de la esteroidogénesis (LH-testosterona). La FSH actúa específicamente sobre las células de Sertoli, que regulan la producción de espermatozoides del epitelio seminífero, controlando la expansión de las células germinales premeióticas. La Inhibina, hormona glicoproteica que funciona como señal endocrina para la integridad y actividad del sistema de células madre que proporciona una señal a la pituitaria sobre la capacidad de producción de espermatozoides (Schlatt y Ehmcke, 2014), es producida por células de Sertoli y los túbulos seminíferos (TS) y que en el macho puede actuar junto con la testosterona en el control de la FSH. En los carneros, las concentraciones de inhibina en el plasma varían de acuerdo con el estado reproductivo estacional, y están correlacionadas positivamente con el tamaño testicular y la secreción de testosterona (Gerlach y Aurich, 2000).

En los carneros, la secreción pulsátil de la LH de la pituitaria es dependiente de la hormona liberadora de LH (LHRH) del hipotálamo. Cada pulso de LH liberado al sistema circulatorio generalmente estimula una respuesta de testosterona en los testículos. Los esteroides testiculares modulan la regulación de la secreción episódica de LH al afectar la frecuencia de los impulsos de LHRH desde el hipotálamo, así como la capacidad de respuesta de la pituitaria a LHRH (Dayalu y Kittok, 1996). La LH actúa sobre las células de Leydig estimulando la liberación de andrógenos que inducen o mantienen un fenotipo masculino, estimulan los órganos sexuales y las acciones controladas por andrógenos en la periferia. Al mismo tiempo, los andrógenos funcionan como

hormona de retroalimentación a nivel hipotalámico y sus niveles séricos son controlados por la acción estimuladora balanceada de LH sobre las células de Leydig, frente a las acciones inhibitorias de los andrógenos en partes del cerebro que reducen la liberación de LH a partir de los gonadotropos. En este escenario, ambas gonadotropinas tienen funciones separadas y circuitos de retroalimentación reguladora independientes: el eje de la FSH y la inhibina controlan la producción de espermatozoides, el eje de la testosterona-LH y la androgenización del organismo (Figura 3) (Schlatt y Ehmcke, 2014).

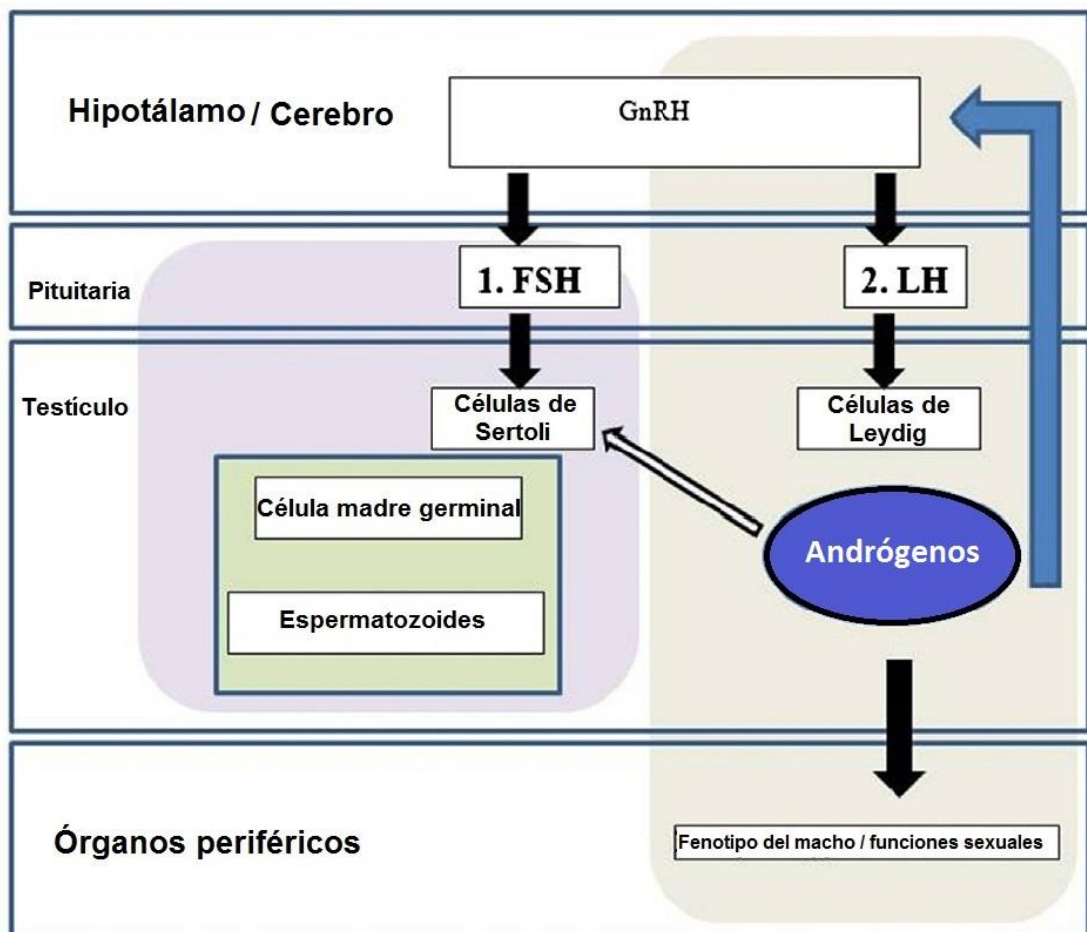


Figura 3. Representación esquemática de Hipotálamo-hipófisis-gónadas (tomado de Schalatta y Ehmeke, 2014).

La descarga pulsátil de LH es importante por dos razones. Primero, las altas concentraciones de testosterona dentro de los TS son esenciales para la espermatogénesis. Segundo, las células de Leydig inician la refractariedad para sostener los altos niveles de LH. En efecto, las concentraciones continuas altas de LH se reflejan en una reducida secreción de testosterona (Schalatta y Ehmeke, 2014).

Desde una perspectiva fisiológica el término refractariedad significa sin respuesta a cierto tratamiento. Se cree que la condición de refractariedad provocada por altas concentraciones sostenidas de LH es causada por una reducción en el número de receptores de LH en las células de Leydig, existiendo una marcada reducción en la secreción de testosterona cuando la LH permanece alta por un periodo sostenido. Los niveles de testosterona intratesticular son de 100-500 veces más altos que los de la sangre sistémica. Sin embargo, la testosterona testicular es diluida aproximadamente 500 veces cuando llega a la sangre periférica, dilución que en conjunto con una vida media relativamente corta mantiene las concentraciones sistémicas de testosterona muy por debajo de lo que causaría una regulación negativa del sistema de retroacción de GnRH/LH. Por ejemplo, si la pulsatilidad de LH fuera larga (en horas), las células de Leydig podrían producir testosterona por horas más que por minutos, lo que podría resultar en una falla metabólica para depurar la testosterona de la sangre sistémica y la testosterona podría ejercer una retroacción negativa sostenida sobre las neuronas de GnRH en el hipotálamo, la que a su vez podría eventualmente detener la secreción de LH y consecuente la de testosterona, ocasionando así, que no ocurra la espermatogénesis. El papel de la naturaleza pulsátil de la testosterona no ha sido completamente entendido, suponiéndose que a la larga las concentraciones sistémicas altas de testosterona suprimen la secreción de FSH. La función de las células de Sertoli es dependiente de FSH, por lo que su función se compromete cuando la FSH es reducida. La reducción periódica en

la testosterona permite que la retroacción negativa en la FSH sea removida (Figura 4) (Senger, 2003).

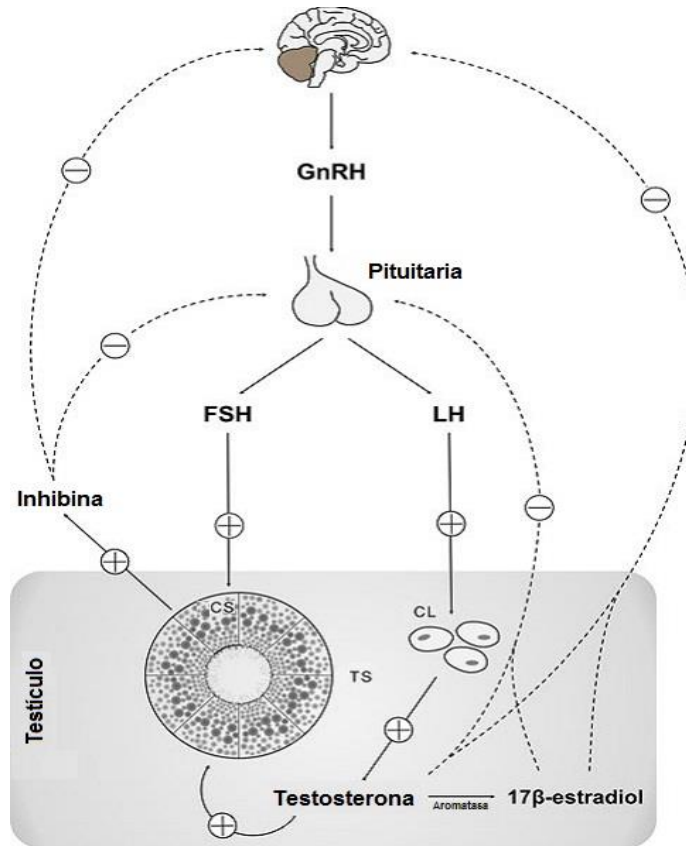


Figura 4. Diagrama simplificado del control de la retroacción negativa en el eje hipotálamo-hipófisis-testículo.

Las células de Sertoli convierten la testosterona a estradiol, utilizando un mecanismo idéntico al de las células de la granulosa de los folículos antrales en la hembra. La funcionalidad exacta del estradiol (E_2) en los machos es poco conocida, pero hay pocas dudas de su función de retroacción negativa en el hipotálamo; la testosterona y el E_2 en la sangre actúan sobre el hipotálamo y ejercen una retroacción negativa sobre la producción de GnRH y, a su vez, son reducidas la LH y la FSH. Por lo tanto, las altas concentraciones de E_2 se reflejan en la reducción de las descargas de GnRH y LH (Figura 4). Además, para convertir la testosterona a estradiol, las células de Sertoli producen

inhibina que, como en las hembras, suprime la secreción de FSH del lóbulo de la pituitaria anterior (Senger, 2003).

1.3 Espermatogénesis

La espermatogénesis es un proceso fisiológico continuo que toma lugar en los TS, los cuales están compuestos de células de Sertoli rodeadas por células germinales en proceso de maduración, y de células mioides peritubulares. En las células de Sertoli, las células germinales auto-antigénicas forman la barrera sanguínea testicular y expresan los factores inmunorreguladores, creando así un ambiente inmunológico para la supervivencia de las células germinales testiculares (Kaur *et al.*, 2014). El proceso fisiológico continuo es complejo y altamente organizado, durante el cual, las células germinales se someten a tres fases de desarrollo (espermatocitogénesis, meiosis y espermiogénesis), que consta de varias etapas celulares que se suceden en el tiempo a través de la conversión de células espermatogoniales a espermatozoides elongados (Divya *et al.*, 2013). Cada estadio consiste en una o dos generaciones de espermatogonias, espermatocitos, y espermátides (Bilaspuri y Guraya, 1986) (Figura 5).

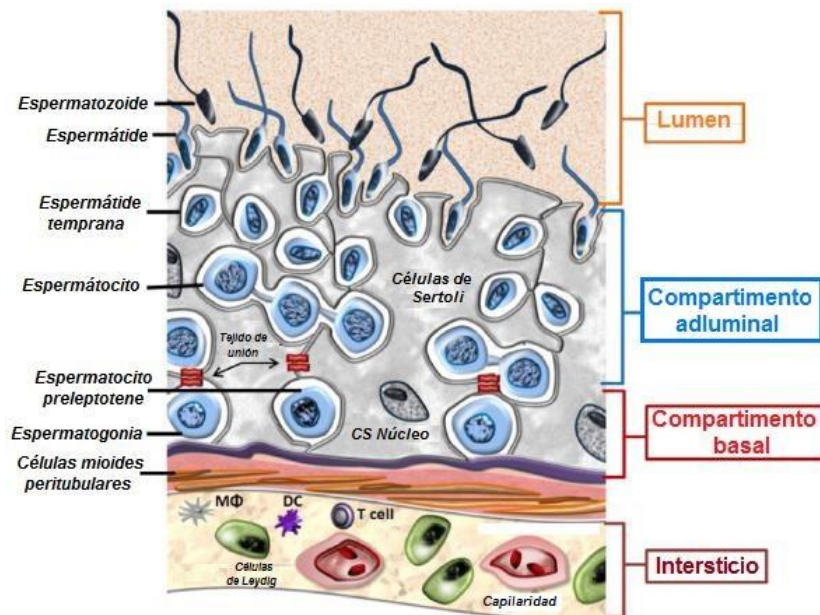


Figura 5. Sección del epitelio germinal de los túbulos seminíferos con diferentes estadios en la formación de los espermatozoides (adaptado de Kaur *et al.*, 2014).

Factores epigenéticos, hormonales, climáticos, fármacos, nutricionales y químicos tóxicos influyen en la espermatogénesis. La evaluación de la espermatogénesis es realizada mediante un método convencional al igual que la valoración del buen estado para la reproducción (valoración física y medición de la circunferencia escrotal), evaluación seminal (concentración espermática, motilidad espermática, análisis morfológico espermático) y el análisis isométrico de los testículos (Divya *et al.*, 2013).

De entre los factores hormonales se ha considerado que se requiere la acción combinada de FSH y LH en el testículo para iniciar la espermatogénesis (Figura 6). Este punto de vista es apoyado por el aumento progresivo de FSH y LH durante la maduración puberal en animales. Además, los pacientes con hipogonadismo hipogonadotrófico que tienen testículos inmaduros, son tratados con combinaciones de FSH y LH o con GnRH para lograr la espermatogénesis (DeKretser *et al.*, 1992). Así mismo, la FSH y la testosterona son reguladores claves de la espermatogénesis, y en consecuencia, de la masa de células germinales y del tamaño de los testículos en el carnero adulto.

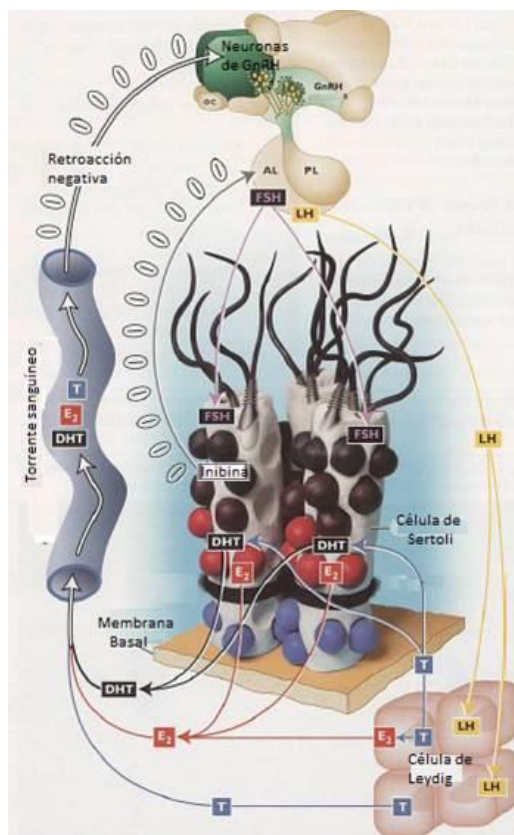


Figura 6. Interrelación entre las hormonas producidas por el hipotálamo, el lóbulo anterior de la pituitaria, las células de Sertoli y las células de Leydig para el control de la espermatogénesis.

Esferas azules= espermatogonia.

Esferas rojas= espermatocitos primarios.

Esferas café= espermatocitos secundarios.

Esferas negras= espermátides
(Adaptado de Senger, 2003).

Cada hormona juega un papel único en la diferenciación y proliferación de las espermatogonias, después de lo cual, la testosterona promueve la formación y diferenciación de los espermátidos en espermátides redondas y alargadas (Kilgour *et al.*, 1994; Bustos y Torres-Díaz, 2012; Dong *et al.*, 2016). Además, en ausencia de FSH, la testosterona puede mantener la espermatogénesis (Griswold y McLean, 2006), sin embargo, también se ha reportado que la FSH es necesaria para la espermatogénesis en carneros adultos, específicamente para la diferenciación de la espermatogonia A1 a espermatogonia B2 a través de las células de Sertoli (Kilgour *et al.*, 1993).

Las concentraciones de testosterona en las cuales la espermatogénesis es mantenida en la presencia o ausencia de la hipófisis no difieren, sino que las concentraciones intratesticulares de testosterona son 10-40% de las normales. Por otra parte, mientras que la testosterona puede mantener la espermatogénesis a corto plazo, el mantenimiento a largo plazo requiere la participación de otra o de otras sustancias, probablemente la FSH (DeKretser *et al.*, 1992) y de manera indirecta del glutamato, puesto que se ha reportado que influye en la secreción de GnRH, que conduce a la producción de hormonas gonadales en los testículos. Al respecto, Olney *et al.* (1976) reportaron que en ratones, la administración subcutánea de glutamato incrementa la frecuencia y amplitud del pulso de GnRH en el hipotálamo anterior, pudiendo modular la estimulación neuronal y desencadenar una respuesta de células gonadotropas, permitiendo la liberación de FSH y LH de la pituitaria y, consecuentemente la secreción de la testosterona por los testículos (Polat *et al.*, 2011) (Figura 7).

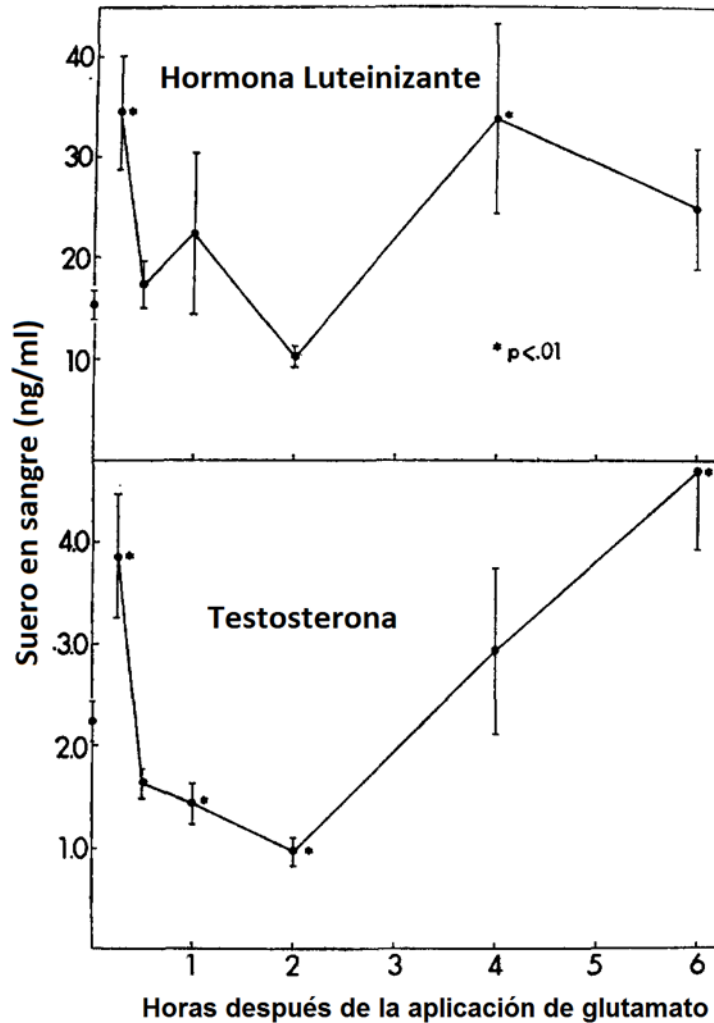


Figura 7. Concentraciones de la hormona luteinizante y testosterona en suero sanguíneo después de la aplicación subcutánea de glutamato (adaptado de Olney *et al.*, 1976).

En los testículos se encuentran receptores ionotrópicos y metabotrópicos del glutamato, con una afinidad específica para diferentes estructuras. Los GluRs pueden estar involucrados en el desarrollo testicular, la espermatogénesis, y la motilidad espermática, y cada estado unido a su receptor específico. La distribución diferencial de GluRs en las células Leydig productoras de testosterona y en el epitelio germinal de los TS de los testículos, sugiere que cada subtipo o combinación de receptores puede tener un papel específico en

la espermatogénesis y en la regulación hormonal. Actualmente se sigue investigando la presencia de GluRs en los testículos durante varias etapas de desarrollo (Gill *et al.*, 2000), sin embargo, se ha demostrado que los aminoácidos libres (como el glutamato) pueden servir como sustratos oxidables en el metabolismo por los espermatozoides (Pruneda *et al.*, 2007), por lo que el glutamato se encuentra principalmente en el plasma seminal, más que en los espermatozoides, teniendo este un papel significativo en producción de ATP como fuente de energía, para ayudar en la motilidad espermática. La motilidad ideal de los espermatozoides debe ir acompañada de líquido o semen plasmático de calidad, necesarios para la fertilidad. Así pues, el ácido glutámico es necesario para el metabolismo de los espermatozoides, por lo que el descenso de su nivel resulta en la reducción de la motilidad de los espermatozoides (Susetyarini, 2015).

1.4 Reposo sexual en los carneros

En muchas especies, la actividad reproductiva se restringe a un cierto periodo del año para asegurar que el nacimiento ocurra en un tiempo óptimo del año, usualmente en el final del invierno o a principios de la primavera, lo cual permite la sobrevivencia y crecimiento de las crías bajo condiciones favorables de temperatura y disponibilidad de alimentos (Gerlach y Aurich, 2000).

Este fenómeno, conocido como estacionalidad reproductiva, está influenciado principalmente por el fotoperiodo y los cambios en la longitud del día, y puede ser modificado por otros factores como la temperatura, la nutrición, el contacto con animales del otro sexo, el tiempo de parto y la duración de la lactancia (Rosa y Bryant, 2003). El animal percibe los cambios de estación principalmente a través de cambios diarios fotoperiodo, es decir, la prolongación o acortamiento de la longitud del día (Malpaux, 2006; Sarlós *et al.*, 2013).

La influencia del fotoperiodo sobre la secreción de GnRH se refleja en los cambios circanales en la liberación de LH. En los reproductores de días largos, la secreción de LH aumenta durante la primavera y disminuye en otoño. En los reproductores de días cortos, los cambios anuales en la secreción de LH están inversamente correlacionados con la duración del día, lo que conlleva en los machos a la estimulación máxima de los testículos en el invierno. En los carneros, durante la época reproductiva, las concentraciones plasmáticas de LH aumentan de 5 veces a 14 veces, principalmente por un aumento en la frecuencia del pulso de LH (Gerlach y Aurich, 2000).

En los carneros, la actividad reproductiva fuera de la temporada de cría se suprime en menor grado que en las ovejas (Gerlach y Aurich, 2000), siendo principalmente los factores ambientales los que regulan la función testicular a través del eje HHG, mediante la alteración de la secreción de la pituitaria de FSH y LH, y consecuentemente a través de la secreción de la testosterona por los testículos para generar el ciclo testicular (Young y Nelson, 2001; Bustos y Torres-Díaz, 2012). La espermatogénesis existe como un proceso continuo; durante la primavera y el verano, los pulsos de baja frecuencia LH afectan, pero no impiden, la fertilidad en los machos. Por lo tanto, las diferencias sexuales en la actividad reproductiva de los ovinos puede deberse a las diferentes funciones neuroendocrinas reproductivas en machos y hembras (Gerlach y Aurich, 2000).

En los carneros, existen indicadores de la estacionalidad en la actividad sexual, como evidencia, se muestran cambios en el diámetro testicular y en los niveles de las hormonas secretadas (Gündoğan *et al.*, 2003). Sin embargo, existen marcadas diferencias entre razas de ovinos. En las razas silvestres o rústicas, como la Mouflon o la Soay, las variaciones circanales en las concentraciones plasmáticas de testosterona, FSH e inhibina, son significativamente más pronunciadas que en otras razas altamente domesticadas, encontrándose diferencias similares en el grado en que cambian el tamaño de los testículos y la espermatogénesis (Gerlach y Aurich, 2000). Por otra parte, la producción de

espermatozoides varía mucho durante el año (Malpaux, 2006) y dependiendo de la especie, los testículos pueden disminuir su tamaño entre un 10 y un 95% en respuesta a los factores ambientales asociados a la estación de reposo sexual (Young y Nelson, 2001). En carneros de la raza Ile-de-France, la producción espermática diaria varía a través del año, es de 50 a 80 veces más alta en el otoño que en la primavera (Malpaux, 2006) (Figura 8).

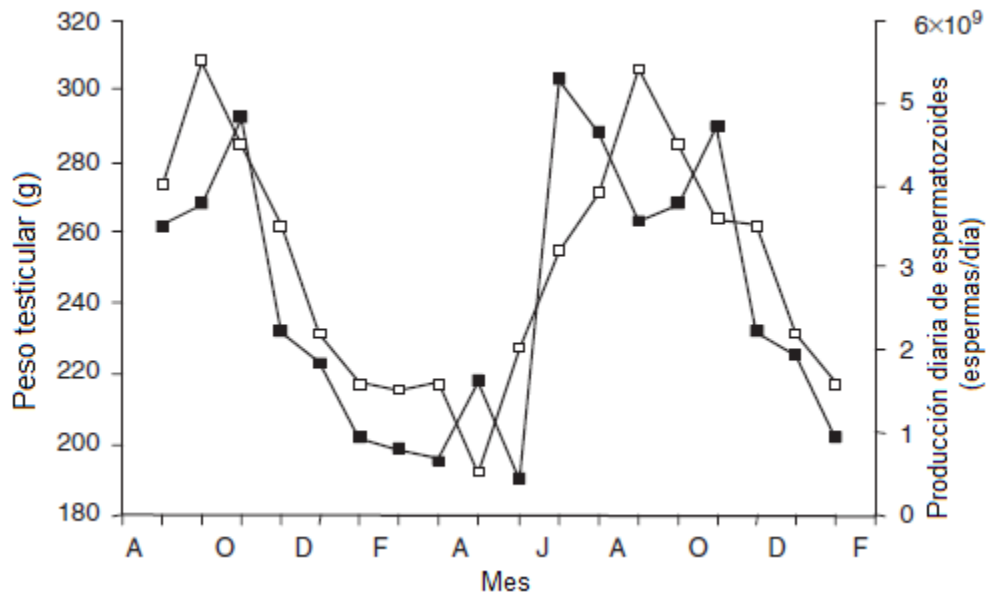


Figura 8. Cambios estacionales en la producción diaria de espermatozoides en carneros adultos Ile de France, a una altitud de 45° N (adaptado de Malpaux, 2006).

Los descensos estacionales en la producción de espermatozoides parecen comenzar después del decrecimiento de los testículos y en la secreción de fluidos, debido tal vez, a los diferentes tiempos de respuesta de las células de Sertoli para debilitar las señales endocrinas (por ejemplo, la FSH y testosterona) (Dickson y Sanford, 2005). En la figura 9 se observa el efecto del decremento e incremento del fotoperiodo sobre aspectos reproductivos en carneros. Durante cuatro semanas, los carneros se aclimataron con 12 h luz: 12 h oscuridad y después se dividieron en dos grupos para ser tratados

durante 8 semanas simulando días cortos (8 h luz: 16 h oscuridad ○) o días largos (16 h luz: 8 h oscuridad ●). Los carneros expuestos a la simulación de días cortos incrementaron la secreción de LH, FSH, testosterona y el crecimiento testicular, en comparación a los carneros expuestos a la simulación de días largos (Pinckard *et al.*, 2000).

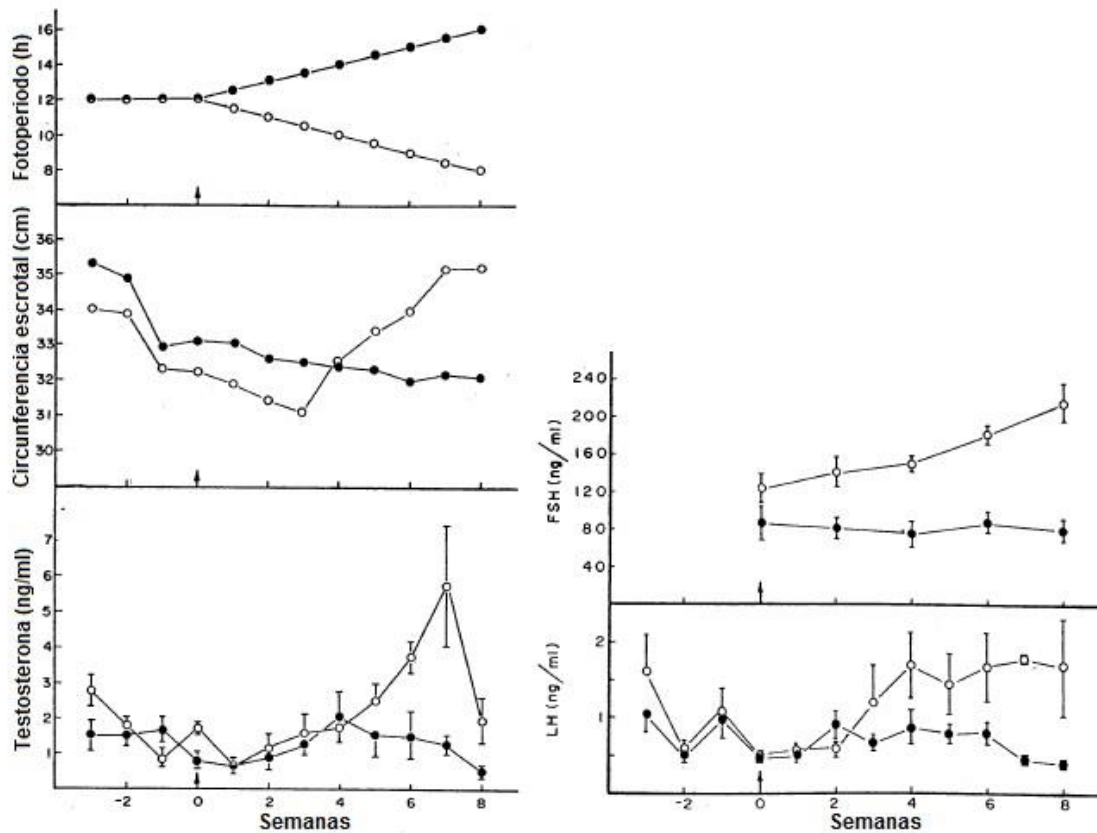


Figura 9. Efecto del decremento e incremento del fotoperiodo sobre la circunferencia escrotal, las concentraciones de testosterona, LH y FSH (adaptado de Pinckard *et al.*, 2000).

Los cambios estacionales son percibidos gracias a la duración de la luz del día, que se transduce a través de la retina y la glándula pineal en los patrones de melatonina, que son percibidos por el hipotálamo para activar o desactivar el generador de impulsos GnRH. La longitud del fotoperiodo puede registrarse como uno de los factores ambientales más importantes. El interruptor maestro

GnRH puede utilizar esta información para controlar la actividad de los órganos reproductores en sincronía con los cambios estacionales (Schlatt y Ehmcke, 2014) (Figura 10). Los factores ambientales que estimulan o mantienen la reproducción promueven la síntesis y la secreción de GnRH de la eminencia mediana hipotalámica y regulan positivamente la secreción de las gonadotrofinas de la pituitaria anterior (Bronson, 2009); la LH estimula las células de Leydig en los testículos para la producción de testosterona, mientras que la FSH activa las células de Sertoli, y junto con la testosterona estimulan la maduración de los espermatozoides (Roselli *et al.*, 2004).

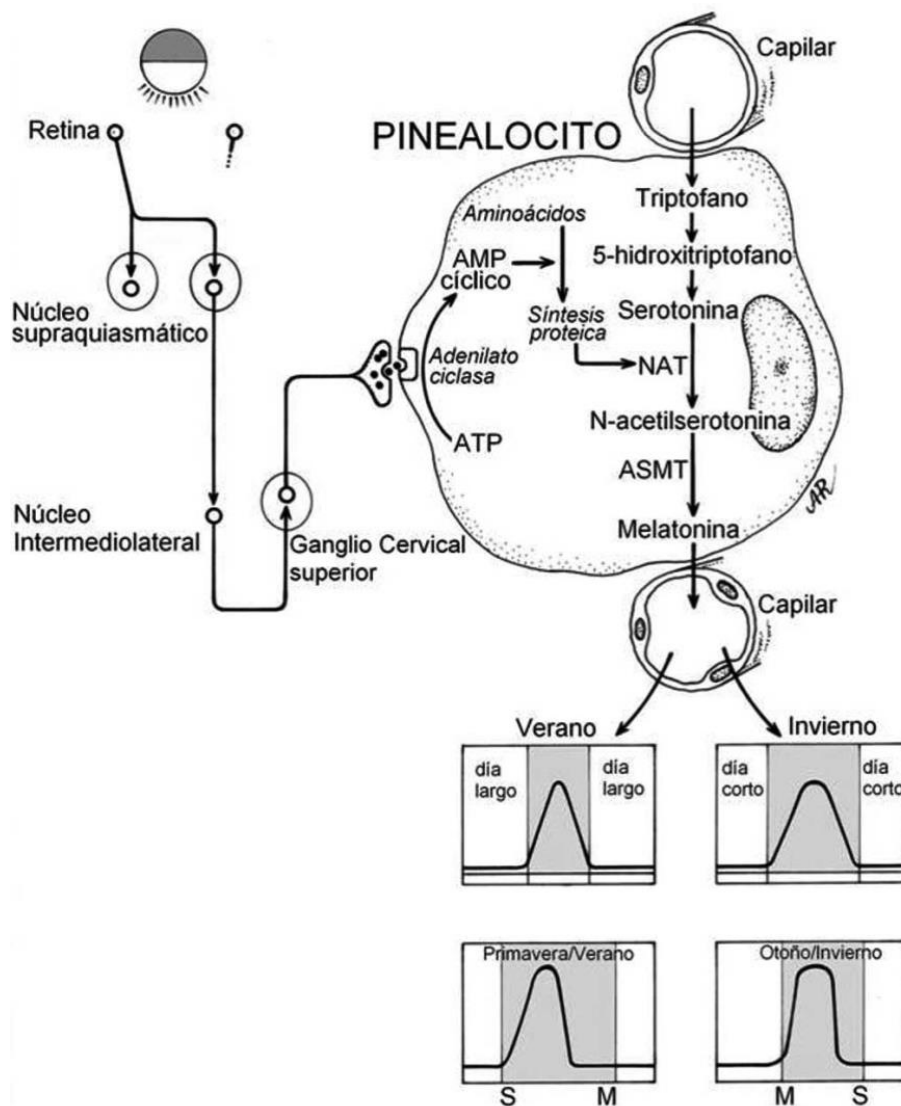


Figura 10. Esquema del tracto fotoneuroendocrino en reproductores de días largos y días cortos (tomado de Bustos y Torres-Díaz, 2012).

Por el contrario, los factores ambientales no estimulantes disminuyen la liberación de GnRH (amplitud y frecuencia de pulso), lo que resulta en atrofia testicular, espermatogénesis reducida y disminución de la producción de testosterona de las células de Leydig, las células somáticas esteroideogénicas del intersticio testicular (Young y Nelson, 2001).

Sanford *et al.* (2002) reportaron que en los carneros de razas como la Dorset, Finn, Suffolk y Blackface, los cambios mensuales mostrados en las concentraciones de FSH regulan el tamaño testicular en dos formas. En primer lugar, los aumentos en la FSH en el verano determinan cuándo ocurrirá máxima proliferación de espermatogonias y la aparición estacional de los máximos tamaños testiculares. La testosterona parece regular las primeras etapas de desarrollo (A1 a espermatogonias intermedias), mientras que la FSH regula las últimas etapas (espermatogonias intermedias a espermatoцитos primarios leptotene). En segundo lugar, hay indicios de que la secreción de FSH por sí, ejerce algún control sobre el tamaño testicular durante todo el ciclo estacional y que, los cambios mensuales de la circunferencia escrotal están muy paralelos a las concentraciones de FSH y ambos se correlacionan significativamente en los carneros. Por lo tanto, se ha considerado que el aumento de la secreción de FSH en el verano puede determinar el tiempo de la máxima proliferación de espermatogonias tanto en las razas estacionales como en las relativamente no estacionales y que, el aumento de la FSH por sí, no siempre es de magnitud suficiente como para jugar un gran papel en el mantenimiento de la proliferación de espermatogonias o el desarrollo de los testículos (Gerlach y Aurich, 2000; Dickson y Sanford, 2005).

Rhim *et al.* (1993) reportaron que, en los carneros adultos de la raza Hampshire, la frecuencia de los pulsos de LH se considera que es el regulador más importante de los cambios estacionales en la secreción de testosterona. Esta relación no es sorprendente, ya que los episodios en la secreción de testosterona están fuertemente acoplados a la aparición de pulsos de LH

(Mandiki *et al.*, 1998) y los aumentos estacionales en la frecuencia de los pulsos de LH están correlacionados con proteínas clave en el testículo, que regulan tanto la disponibilidad del sustrato de colesterol a la ruta androgénica y la biosíntesis de testosterona (Price *et al.*, 2000). Excepto tal vez en las razas más estacionales, pareciera que la LH basal juega un papel secundario a la frecuencia de pulsos de LH en la regulación de la secreción de testosterona durante todo el ciclo testicular (Dickson y Sanford, 2005).

Aunque la relación entre la LH basal (interpulso) y la testosterona se muestre relativamente débil en algunas razas de carneros, es probable que la LH basal es una parte integral de la señal de LH en el desarrollo testicular, que sirve para amplificar el efecto estimulante de la liberación de los pulsos de alta frecuencia de LH en la secreción de testosterona. La aparente asincronía entre las reducciones en la masa testicular y la salida de los espermatozoides durante la regresión testicular, podría ser debida a una respuesta diferencial de las células de Sertoli a una señal débil de testosterona en el testículo, especialmente en las razas más estacionales (Dickson y Sanford, 2005).

Con respecto al semen ovino, no se han encontrado referencias sobre la morfometría aparentemente normal de la cabeza del espermatozoide y la estacionalidad reproductiva, sin embargo, existen numerosos estudios sobre el efecto del fotoperiodo en anomalías morfológicas de éstos y aunque no se han encontrado variaciones estacionales en otros parámetros espermáticos, se han encontrado en la morfología (Mandiki *et al.*, 1998), señalándolo como un buen indicador de los efectos estacionales.

1.5 Comportamiento sexual

La sobrevivencia de una especie depende en última instancia de su reproducción, y uno de los elementos claves de ésta es el comportamiento sexual, el cual debe de ser mostrado a un tiempo fisiológicamente apropiado para que la fertilización ocurra (Pfaus, 1996; Borja y Fabre-Nys, 2012). Las

señales ambientales, tales como olfativas, táctiles, visuales y auditivas, afectan la expresión del comportamiento sexual en los animales, tanto en machos como hembras (Maina y Katz, 1999). El comportamiento reproductivo de los machos mamíferos incluye dos componentes separados, pero que interactúan: el apetitivo (CSA) o componente motivacional (referente a la estimulación sexual), que dirige a los machos a buscar y acercarse a las hembras receptivas; y el consumatorio (CSC) o componente eyaculatorio (referente al desempeño sexual), en el cual el macho hace el contacto sexual en forma de montas, penetraciones y eyaculaciones (Borja y Fabre-Nys, 2012).

Las señales sensoriales que inician con el acto reproductivo pueden activar de manera simultánea respuestas relativamente simples a través del eje HHG, y a través de respuestas binarias o ternarias relativamente complejas, junto a procesos límbicos (sensoriales, complejos y cognitivos), requeridos para el completo desempeño de los componentes del comportamiento reproductivo apetitivo y consumatorio. El hecho de que estos componentes puedan ser seccionados sobre las bases de la respuesta hormonal, indica que existen mecanismos importantes discriminatorios los cuales pueden revelar técnicas de orden central y periférico (Dluzen y Ramirez, 1993).

La investigación de los componentes hormonales/ neurales del comportamiento reproductivo, implica principalmente intentos de correlacionar las respuestas hormonales/neurales a los componentes apetitivos o consumatorios del apareamiento. La dinámica de la determinación periférica, que son las respuestas hormonales, tiende a ser “simples” en naturaleza de acuerdo a la correlación con aspectos apetitivos vs. consumatorios de la reproducción. Por “simple” se entiende que la correlación hormonal está asociada exclusivamente con el componente del comportamiento apetitivo o consumatorio. Por ejemplo, la respuesta de LH en el macho pareciera ser dominante para el componente apetitivo del comportamiento reproductivo. En ratas macho, ratones y carneros, la sola exposición de la hembra, o el estímulo de las hembras, resulta en un rápido incremento agudo de LH. Los pulsos de oxitocina también pudieran

estar asociados con actividades apetitivas. En el caso contrario, la prolactina y la testosterona parecieran ser una hormona relacionada con el componente consumatorio. Con respecto a la epinefrina como neurotransmisor, muestra un control neural más directo, sus niveles efectúan más de una respuesta ternaria con incrementos lentos durante periodos apetitivos, incrementos rápidos durante la fase consumatoria, y regresa a niveles basales estables durante intervalos intercopulatorios (Dluzen y Ramirez, 1993).

Las determinaciones periféricas pueden ser consideradas binarias, ternarias o mayores con respecto a la correlación con el comportamiento reproductivo. Es decir, las mismas áreas o funciones del SNC son capaces de responder a ambos componentes del comportamiento reproductivo tanto consumatorio como apetitivo. El mejor ejemplo puede ser la unidad simple y múltiple activamente medible en el APOM (Figura 11) (Dluzen y Ramirez, 1993).

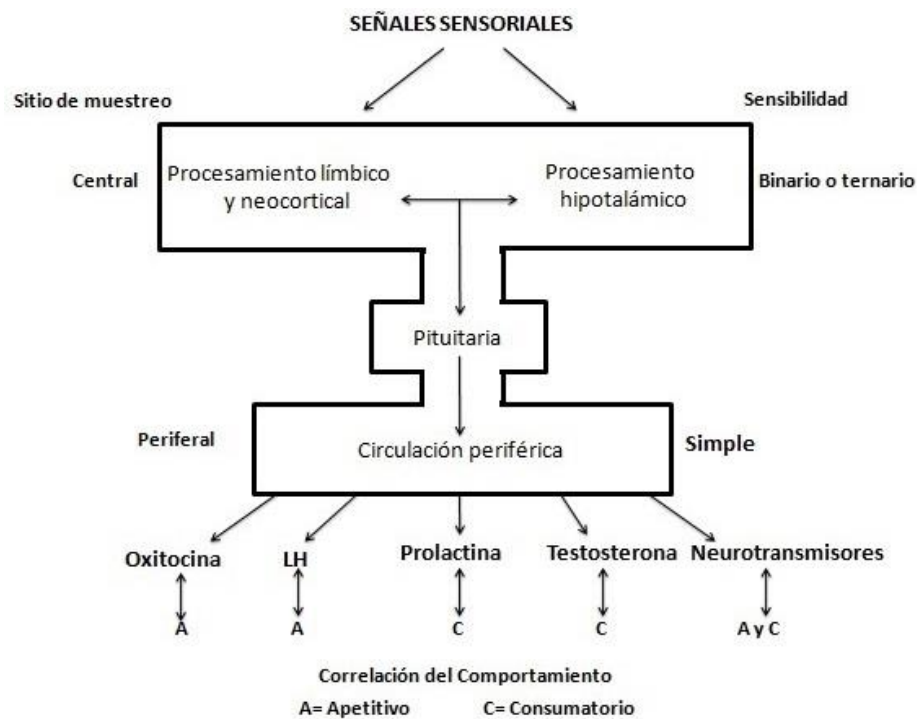


Figura 11. Diagrama de la correlación hormonal/neural del comportamiento reproductivo (adaptado de Dluzen y Ramirez, 1993).

Ambos aspectos de comportamiento coordinados son logrados primordialmente por hormonas esteroidales actuando sobre estructuras particulares sobre el

cerebro (Hull *et al.*, 2006; Borja y Fabre-Nys, 2012; Limon-Morales *et al.*, 2014), en gran medida, bajo el control de los estrógenos derivados de la testosterona, aunque el sitio de acción de esteroides en la activación de cada componente del comportamiento del macho pareciera ser distinta en algún grado, que implica principalmente la parte anterior del APOM para CSA y la parte posterior del núcleo de CSC (Balthazart y Ball, 2006; Charlier *et al.*, 2013; Fusani, 2014).

Dentro del CSC, probablemente la cópula es el comportamiento examinado con más frecuencia en muestreos en campo o laboratorio para el funcionamiento sexual. Numerosos estudios han demostrado la influencia de factores hormonales que determinan la expresión general de la actividad copulatoria. El descubrimiento trascendental de la neuroendocrinología del comportamiento, así como de las interacciones cerebro-hormonales, ha sido llevado a cabo en diferentes especies (Andersen *et al.*, 2011); el comportamiento sexual del macho se activa cuando los testículos secretan testosterona durante periodos de reproducción estacionalmente adecuados. Estos comportamientos incluyen vocalizaciones, comportamientos agresivos asociados con la defensa territorial y las fases apetitiva y consumatoria del comportamiento sexual del macho (Fusani, 2014).

En muchas especies, algunos machos con testículos funcionales y concentraciones sanguíneas normales de testosterona no muestran comportamiento sexual, lo que puede ser debido a lesiones medulares en el APOM, sugiriendo que la motivación sexual, en lugar de la consumación, es suficiente para involucrar la hormona de LH (Opendak *et al.*, 2016).

1.5.1 Descripción del comportamiento sexual de los carneros

Si una oveja receptiva es introducida en un corral que contiene un carnero con previa experiencia copuladora, el carnero se acercará a ella en cuestión de segundos. Hay varios comportamientos estereotipados que el carnero puede realizar antes de la monta inicial. Estos incluyen olfatear la región genital de la oveja, patear su flanco repetidamente con su pata delantera mientras está de pie detrás (Figura 12-A) y en un pequeño ángulo con la oveja; y olfatear, lamer y mordisquear en su flanco (Figura 12-B) y área ano-genital. Antes de la cópula, los carneros también elevan la cabeza y retraen el labio superior en respuesta al olor o sabor de la orina de la oveja, una conducta conocida como flehmen, mediante ésta conducta se extraen los olores no volátiles hasta el órgano vomeronasal para su detección por el sistema olfativo accesorio. Algunos machos, además, emiten vocalizaciones de "gargarismos" de tono bajo antes y mientras patean a la oveja. La suma total de estos comportamientos se denomina con frecuencia "conductas de cortejo" (Bermant *et al.*, 1969; Perkins y Roselli, 2007; Orihuela *et al.*, 2014).



Figura 12. Comportamiento sexual de apetitivo los carneros, pataleo (A) y aproximación (B).

Entre los machos, hay una variación considerable en la frecuencia y duración de estas respuestas precopulatorias. No está claro si desempeñan un papel funcional en estimular a la oveja o inducirla a postrarse para la cópula. Las ovejas realizan un movimiento característico de la cola (abanico), que

acompaña a la receptividad total y que puede ayudar a dispersar las señales olfativas relevantes (Bermant *et al.*, 1969; Perkins y Roselli, 2007).

El comportamiento de la monta en los carneros es acompañado por una serie de empujes pelvianos poco profundos. Los carneros generalmente se montan varias veces antes de la penetración vaginal y la eyaculación, pero un carnero experimentado puede eyacular en la primera monta. Los carneros son capaces de eyacular en varias veces con una sola oveja, aunque los intervalos entre sucesivas eyaculaciones se hacen progresivamente más largos (Bermant *et al.*, 1969; Perkins y Roselli, 2007).

El comportamiento copulatorio se puede medir en una prueba de capacidad de servicio, donde un carnero se coloca con 3 o 4 ovejas en celo, o en pruebas individuales de un carnero con una oveja en estro. Las pruebas de comportamiento copulatorio suelen ser limitadas en el tiempo y duran al menos 10 minutos, durante las cuales se pueden realizar varias mediciones. Estas incluyen latencia de monta, frecuencia de monta, latencia de eyaculación, frecuencia de eyaculación, así como el intervalo post-eyaculatorio (Perkins y Roselli, 2007).

Existe una variación considerable dentro y entre razas de carneros en la frecuencia y duración de las respuestas precopulatorias, aunque no está totalmente claro que juegue un papel funcional en la inducción de las ovejas para postrarse para la copula. Una oveja totalmente receptiva espera quieta hasta el acercamiento inicial del carnero. Cuando el carnero está atrás, ella generalmente gira su cabeza para un lado y pareciera que lo observa. El meneo o agitación de la cola también es una característica que frecuentemente acompaña la aceptación completa (Bermant *et al.*, 1969).

Típicamente, una oveja parcialmente receptiva se aleja de los acercamientos de los carneros. Si el carnero intenta montar a la oveja, ella puede moverse fuera de su alcance. También la oveja puede ponerse junto a las paredes del corral de forma que el intento de monta sea difícil o imposible. En este caso un

macho vigorosamente experimentado incrementará la intensidad de su pataleo y olfateo y, ocasionalmente, triunfara poniendo la hembra en el centro del corral (Bermant *et al.*, 1969).

Los carneros inician rápidamente una serie de empujones poco profundos durante la monta a la oveja. Este es el caso de la rata macho, del gato y quizás de otras especies. Estos empujones poco profundos parecieran orientar el pene con respecto a la abertura de la vulva. Un factor que pareciera intervenir en el número de empujones poco profundos previo a la penetración, es el tamaño relativo del carnero y la oveja, ya que los carneros pequeños tienen dificultad para penetrar ovejas grandes. Por otra parte, un carnero experimentado puede conseguir la penetración durante su primer empujón (Figura 13) (Bermant *et al.*, 1969).



Figura 13. Comportamiento sexual consumatorio en los carneros, intento de monta y monta completa.

En resumen, el comportamiento de la cópula es el resultado de varias unidades conductuales que abarcan la búsqueda de la hembra, el cortejo y la eyaculación. Este comportamiento puede verse afectado por condiciones ambientales, como la dominancia o la presencia de hembras en celo entre otros, siendo necesario conocer estos factores por su aplicabilidad en la reproducción controlada de los ovinos, y de esa manera tener la opción de

diseñar técnicas de manejo que permitan utilizar al máximo las ventajas reproductivas que puede ofrecer un semental (Pfaus, 1996).

No todos los carneros tienen un buen comportamiento sexual ni en la misma intensidad. Factores como la edad y la raza, entre otros, tienen un rol fundamental en la manifestación de los elementos de interés sexual. Esta variación puede deberse entre otros factores a la selección artificial y los métodos de crianza. La primera puede ejemplificarse, cuando bajo condiciones intensivas, los reproductores tradicionalmente se escogen dando mínima importancia al comportamiento sexual (Orihuela *et al.*, 2014).

1.5.2 Endocrinología del comportamiento sexual

El sistema reproductivo presenta una compleja regulación neuro-humoral que involucra estructuras del sistema nervioso central (hipotálamo y pituitaria) y estructuras periféricas (sistema autonómico simpático y parasimpático), además de los órganos reproductivos (Andersen *et al.*, 2011).

Aunque varios estudios han demostrado la rápida acción de las hormonas esteroidales a nivel de la membrana y citoplasma, muchos de los efectos biológicos de los esteroides son mediados a través de la activación de sus respectivos y rápidos receptores nucleares. Cuando se exponen al esteroide sus receptores, se unen a un elemento de respuesta específico, y regulan la transcripción de genes afectando a la fisiología celular, y en última instancia, puede afectar la respuesta de un organismo a su entorno y la expresión de un comportamiento específico en respuesta a un estímulo social definido (Charlier *et al.*, 2013).

El comportamiento sexual es dirigido por una interacción sofisticada de hormonas esteroidales que actúan en el cerebro (Andersen *et al.*, 2011), especialmente en el área preóptica medial (APOM) del hipotálamo, donde se expresan las enzimas que transforman a la testosterona en componentes, los cuales aumentan (DHT) o diferencian (estrógenos) sus acciones; estos sistemas enzimáticos incluyen 5 α -reductasa y aromatasa, respectivamente

(Simerly *et al.*, 1990; Andersen *et al.*, 2011; Fusani *et al.*, 2014; Orihuela, 2014). El APOM no es la única región del cerebro que media la expresión del comportamiento sexual masculino; sin embargo, es un sitio integrador en este proceso. Esto sugiere que la acción hormonal dentro de la APOM puede ser un factor crítico en la regulación del comportamiento, con regiones específicas mediando aspectos del comportamiento conducente al apareamiento (fase apetitiva) y otros mediando la copulación misma (fase consumatoria) (Dominguez, 2009). En el cerebro, la testosterona actúa por dos vías principales: (1) una vía de andrógenos, en la cual la testosterona o su metabolito activo reducido, la 5 α -dihidrotestosterona, interactúa con los receptores de andrógenos en las células diana (Cornil *et al.*, 2012), y (2), una vía de estrógeno en el que la testosterona se convierte en E₂ por el citocromo P450 aromatasa, y los estrógenos derivados del cerebro activan los receptores de estrógeno (Roselli y Stormshak, 2009). Existe evidencia que el comportamiento de cortejo requiere de la activación de ambas vías de señalización de esteroides (Attila *et al.*, 2010; Fusani *et al.*, 2014; Will *et al.*, 2014).

Una manera a través de la cual las concentraciones de estrógenos cerebrales podrían ser moduladas rápidamente, implica cambios rápidos en las concentraciones periféricas de andrógenos, que estarían disponibles para la aromatización local. Por lo tanto, las fluctuaciones a corto plazo (min-h) en la secreción de testosterona de los testículos en respuesta a la liberación pulsátil de la LH de la pituitaria, pueden teóricamente dar lugar a cambios en la concentración local de estrógeno en la región del cerebro que expresa aromatasa, lo que sugiere que el estrógeno actúa a través de mecanismos no genómicos (Cornil *et al.*, 2012).

Por otra parte, también se cree que las hormonas gonadales facilitan el comportamiento sexual a través de mecanismos genómicos lentos, ante este hecho, algunas pruebas indican que los estrógenos pueden modular el comportamiento sexual muy rápidamente, (Balthazart *et al.*, 2004; Cornil *et al.*,

2012). Los efectos genómicos de los estrógenos sobre el comportamiento a menudo son mediados en última instancia por los cambios en la producción o la acción de los neurotransmisores en circuitos específicos del cerebro, resultantes de una modificación de la transcripción y traducción de enzimas que sintetizan o estabilizan los transmisores o sus receptores (Cornil *et al.*, 2012).

La testosterona también afecta fuertemente a los fenotipos celulares y modula la expresión de enzimas específicas como la aromatasas y el óxido nítrico sintetasas neuronal, y la de neuropéptidos como la somatostatina y la neurotensina por nombrar unos pocos, en varias regiones del cerebro (Balthazart y Ball, 1998). Así mismo, varios estudios han reportado el papel de neurotransmisores implicados en el comportamiento sexual de los machos, incluyendo el GABA (Ácido gamma-aminobutírico), acetilcolina, óxido nítrico (ON), la dopamina (DA), opioides y el glutamato (Domínguez y Hull, 2005; Domínguez, 2009; Will *et al.*, 2014).

La DA y los sistemas opioides en el cerebro regulan aspectos del comportamiento sexual tanto apetitivo como el consumatorio (Pfaus, 1996; Will *et al.*, 2014). La DA influye en varias regiones cerebrales para facilitar el comportamiento sexual, existiendo evidencias que indican que los tipos de receptores, la especificidad, la especie y el área cerebral influyen en como modula estos comportamientos en distintas especies (Will *et al.*, 2014).

El glutamato es considerado el principal neurotransmisor excitador en el SNC de los mamíferos y se distribuye de forma general en todo el cuerpo. El origen de la liberación de glutamato inducido por el comportamiento sexual en el APOM aún no está claro. Sin embargo, fuentes de glutamato preóptico incluyen el *septum* lateral, cama del núcleo de la estría terminalis (BNST), amígdala medial (MeA), MPOA, y los núcleos paraventricular (NPV), supraquiasmático (NSC), ventromedial (NVM), arqueado (ARC), ventral premamilar, supramamilar, y los núcleos paraventriculares del tálamo. De estas áreas, el

MeA y BNST son de particular interés, ya que reciben señales quimiosensoriales relacionadas con el comportamiento sexual y contienen receptores de hormonas esteroidales sexuales (Simerly *et al.*, 1990).

En machos, se ha reportado que el glutamato participa en la expresión del CSA y CSC actuando en las neuronas de GnRH (Iremonger *et al.*, 2010). Este incremento en la actividad neural facilita la erección y el comportamiento de la cópula (Melis *et al.*, 2010). El glutamato modula la liberación de la LH, como un intermediario en el eje HHG y posteriormente, aumenta los niveles de LH y testosterona (Will *et al.*, 2014), sin embargo, la interacción hormona-glutamato puede reflejar influencias bidireccionales en las cuales las hormonas regulan la actividad del glutamato, y éste también regula la función endocrina para estimular el comportamiento (Dominguez, 2009), actuando en las neuronas de GnRH (Iremonger *et al.*, 2010), donde inicia una cascada hormonal que conduce a la producción de hormonas gonadales en los testículos. A su vez, dichas hormonas facilitan el comportamiento sexual de los machos (Olney *et al.*, 1976; Will *et al.*, 2014), que se expresa en la erección, vocalizaciones ultrasónicas que se producen durante el apareamiento y el contacto social entre las ratas (Fu y Brudzynski, 1994) y el comportamiento de la cópula (Ebling *et al.*, 1998; Melis *et al.*, 2010; Dominguez *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2013). En ratas machos, se ha reportado que después de dos horas de ser tratados subcutáneamente con glutamato, se incrementan los niveles basales de testosterona séricos de aproximadamente 1 ng/ml a 4 ng/ml en 3 h y a 5 ng/ml en 6 h (Olney *et al.*, 1976).

Por otro lado, machos castrados sexualmente experimentados tratados con grandes dosis de E₂ muestran un comportamiento copulatorio indistinguible de los carneros tratados con testosterona. Sin embargo, aunque el E₂ puede estimular la monta y la penetración sexual, la eyaculación es rara o inexistente (Attila *et al.*, 2010).

Dado que las acciones estimuladoras de la testosterona sobre el comportamiento sexual dependen en parte de su aromatización a estrógenos, una deficiencia de los receptores de estrógenos podría explicar la reducción del deseo sexual. Otros estudios han explorado que posiblemente los cambios en la cantidad de receptores a esteroides gonadales o el metabolismo de estas hormonas en el tejido neural pueden estar involucrados en la disminución del comportamiento sexual de los machos. Así, los niveles de decrecimiento de los andrógenos nucleares, de los receptores de estrógenos y la actividad de la aromatasa, han sido encontrados en estructuras relevantes para el comportamiento sexual, tales como el APOM y la amígdala de ratas macho ancianos, mostrando las características relativas a la edad con deficiencias en la actividad copulatoria (Mas, 1995).

La participación de los núcleos cerebrales en la modulación y dirección del comportamiento sexual del macho permanece poco clara, por lo que son necesarios más estudios que permitan coadyuvar en el entendimiento de estos procesos (Orihuela, 2014).

1.5.3 Tratamientos estimulatorios del comportamiento sexual de los carneros

Dado que del comportamiento sexual depende el éxito reproductivo de las especies (Andersen *et al.*, 2011), sigue el interés por investigar los métodos para incrementar la actividad sexual de los carneros con tratamientos hormonales como la melatonina (Rosa *et al.*, 2012; Casao *et al.*, 2013; Abecia *et al.*, 2016), la eCG (Ungerfeld *et al.*, 2014) y la testosterona (Tejada-Ugarte *et al.*, 2016; y con los tratamientos fotoperiodicos (Abecia *et al.*, 2015); de la misma manera, después del descubrimiento de los efectos excitatorios del glutamato sobre el SNC fue probado su efecto en ratas macho (Olney *et al.*, 1976) y hamsters (Ebling *et al.*, 1998), para que después de algunas décadas reapareciera el interés por conocer la función de este neurotransmisor excitatorio como molécula clave en la expresión del comportamiento sexual y que ayuda en la regulación del eje reproductivo (Dominguez *et al.*, 2006; Domínguez, 2009; Meza-Herrera, 2012; Will *et al.*, 2014).

Tratamiento con Implantes de melatonina y fotoperiodo. En los carneros, tratamientos con melatonina estimulan la liberación de LH y FSH y activan la función testicular. En carneros y ovejas, influye en la liberación de GnRH por vías reguladoras dentro o cerca del hipotálamo mediobasal, reportándose que los implantes con melatonina aceleran el crecimiento testicular y mejoran la producción espermática, aunque un tratamiento de luz en los días largos es requerido antes de la inserción de un implante para incrementar el crecimiento testicular, el comportamiento sexual, la producción espermática y la fertilidad (Gerlach y Aurich, 2000).

Fitzgerald y Stellflug (1991) evaluaron el efecto de implantes de melatonina colocados por 40 días en carneros de la raza Booroola, sobre los cambios estacionales en el comportamiento reproductivo, encontrando que la producción neta de corderos, de ovejas empadradas en primavera fue mayor cuando los carneros se trataron con melatonina y/o fotoperiodo, es decir, los implantes con melatonina tienen un impacto positivo sobre el desempeño reproductivo de los carneros y sobre la eficiencia reproductiva. De manera similar, carneros Rasa Aragonesa sexualmente activos inducidos por tratamientos fotoperiodicos y melatonina durante la primavera, promovieron la pubertad en las ovejas nacidas en otoño e incrementaron la fertilidad de éstas (Abecia *et al.*, 2016). Otro escenario que se puede presentar en los carneros de la raza Dorset expuestos a fotoperiodos controlados de 8 h luz: 16 h oscuridad durante la primavera es el incremento del comportamiento reproductivo a un nivel que podría ocurrir naturalmente en otoño, independientemente del incremento de los niveles de testosterona (El-Alamy *et al.*, 2001).

Tratamiento con ovejas estrogenizadas. La exposición de carneros a ovejas en estro activa directamente la GnRH y el eje HHG, estimulando un incremento inmediato en la secreción de LH. La secreción de testosterona es estimulada por el incremento en la secreción de LH y de las concentraciones plasmáticas de FSH, cortisol y prolactina, asociadas con el comportamiento sexual de

monta y penetración (Walkden-Brown *et al.*, 1999; Rosa *et al.*, 2000; Carrillo *et al.*, 2011).

La presencia constante de hembras estrogenizadas provoca grandes aumentos de la secreción de testosterona que acompañan a los cambios en la secreción de LH, además de cambios rápidos en el comportamiento de los machos, y posiblemente en la producción de señales químicas como la secreción de feromonas que pueden mejorar la respuesta ovulatoria (Walkden-Brown *et al.*, 1993; De Santiago-Miramontes *et al.*, 2011).

Administración de gonadotropina coriónica equina (eCG). Las neuronas GnRH en el hipotálamo sintetizan y secretan el decapeptido GnRH, que desempeña un papel fundamental en la regulación de la cascada de eventos hormonales, desde la liberación de gonadotropina pituitaria y la producción de estrógenos necesarios para la maduración sexual normal y la función reproductiva normal (Ng *et al.*, 2009). A carneros de la raza Corriedale se les administró una dosis simple y dos dosis de 1000 UI eCG al día -3 y a los días -7 y -3 (respectivamente), solo el tratamiento con las dos dosis de eCG antes de unirlos con las hembras en anestro, incrementó su habilidad para inducir la actividad cíclica en ovejas. Este incremento estuvo relacionado a la respuesta de las concentraciones de testosterona de los carneros (Ungerfeld *et al.*, 2014).

Tratamientos con testosterona exógena. Desde un punto de vista cuantitativo, el andrógeno más importante es la testosterona, andrógeno crucial para el desarrollo y mantenimiento de las características sexuales de los machos, para el desarrollo de la espermatogénesis, el mantenimiento de los órganos accesorios, el crecimiento de los músculos, y la retroacción del hipotálamo pituitaria (Andersen *et al.*, 2011). Recientemente, se ha reportado en carneros que la administración de testosterona exógena por vía intramuscular incrementa el comportamiento sexual consumatorio (Tejada *et al.*, 2016).

Opioides. Los péptidos opioides han sido implicados en el control de la liberación de LH. En general, los agonistas opiáceos disminuyen la concentración plasmática de LH, mientras que los antagonistas la mejoran, (Perkins y Fitzgerald, 1994). La Naloxona (un antagonista opioide) inyectada en carneros sexualmente activos incrementa el número de eyaculaciones en comparación con el período previo al tratamiento, sin embargo, en carneros sexualmente inactivos no incrementa la actividad sexual aunque evoca diferencias en los niveles de LH en machos sexualmente inactivos y sexualmente activos, por lo que se considera que el efecto de los opioides sobre el comportamiento sexual y la secreción de LH depende del nivel de actividad sexual de los carneros (Perkins y Fitzgerald, 1994).

1.5.4 Función neuroendocrina del glutamato en el comportamiento sexual

El glutamato pertenece a la familia de neurotransmisores conocida como aminoácidos excitadores, siendo el principal neurotransmisor excitador del SNC y ejerciendo esta función por medio de receptores específicos (Spitzer *et al.*, 2016), de los cuales se han reconocido dos importantes familias los que median las respuestas sinápticas rápidas abriendo canales de iones, llamados receptores glutamato ionotrópicos (iGlu), y los que causan efectos sinápticos lentos asociados con canales bioquímicos, llamados receptores glutamato metabotrópicos (mGlu). La familia de receptores iGlu incluye al N-metil-D-aspartato (NMDA), el DL- α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole+ácido propiónico (AMPA) y el Kainato. Los receptores de la familia mGlu están unidos a proteínas G y comprenden tres grupos: Grupo I (mGlu1 y mGlu5), Grupo II (mGlu2 y mGlu3) y Grupo III (mGlu4, 6, 7 y 8) (Figura 14) (Watkins y Jane, 2006).

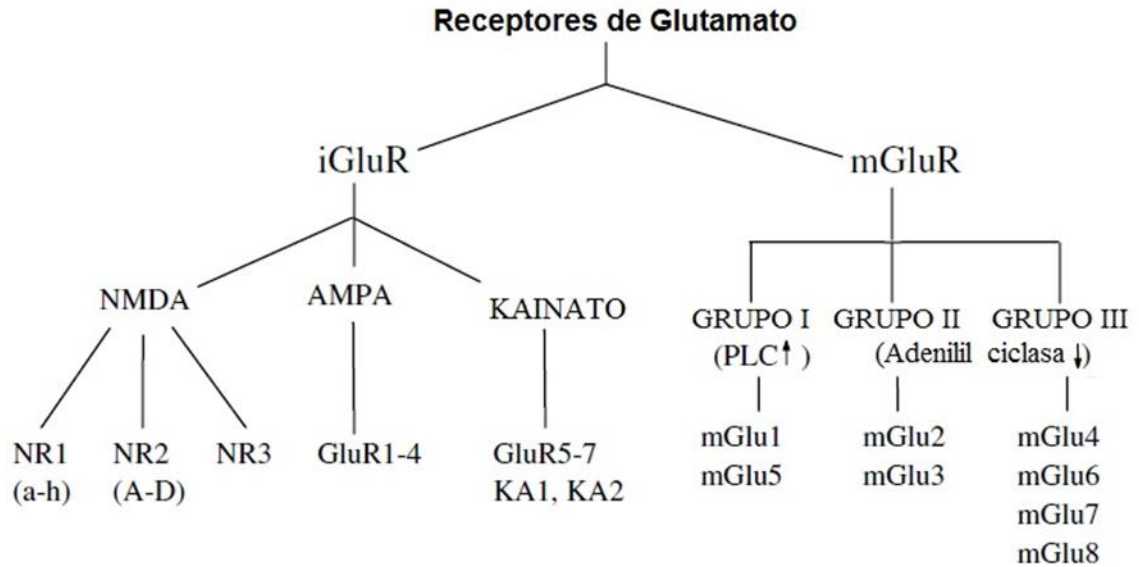


Figura 14. Clasificación de los receptores a Glutamato (adaptado de Watkins y Jane, 2006).

El glutamato como sus receptores, están localizados en una gran cantidad de tejido neuroendocrino y en una gran variedad de núcleos hipotalámicos como los núcleos paraventriculares (NPV), en el núcleo ventromedial (NVM), arqueado (ARC) y supra óptico (NSO), en la eminencia media (EM) y en el tallo Infundibular importantes en la función reproductiva (Estienne *et al.*, 2000; Mahesh y Brann, 2005; Durand *et al.*, 2008). Además, este aminoácido no esencial tiene una infinidad de funciones entre especies, tanto dentro como fuera del SNC (Michaelis, 1998; Spitzer *et al.*, 2016): La señalización del glutamato está comúnmente asociada con la transmisión sináptica. La sinapsis, definida por un sitio presináptico y un sitio postsináptico separado por la hendidura sináptica, es el centro primario de información neuronal. En las sinapsis glutamatérgicas, la maquinaria presináptica (que incluye el complejo SNARE) libera glutamato a través del calcio y la liberación vesicular dependiente de la actividad. La mayoría (90%) de la transmisión sináptica ocurre de esta manera y, por lo tanto, puede denominarse liberación canónica o normal del glutamato para distinguirla de otras formas de liberación vesicular que también ocurren en la terminal presináptica, como la transmisión sináptica

espontánea y asincrónica, que puede ocurrir en la actividad del calcio y del complejo SNARE de manera independiente (Spitzer *et al.*, 2016).

El glutamato que se utiliza como neurotransmisor se almacena en vesículas. Estas lo atrapan con la participación de moléculas que se localizan en la membrana vesicular, y el proceso de liberación ocurre cuando la vesícula se fusiona con la membrana presináptica por medio de la interacción con proteínas presentes en la membrana de las vesículas, en el citoplasma y en la membrana presináptica. Las proteínas tienen la capacidad de formar un sistema de anclaje que se activa con la entrada de calcio a la terminal presináptica. Hasta ahora solo se ha identificado algunas proteínas que participan en este proceso. En la membrana de las vesículas se conocen entre otras, la sinaptobrevina, la sinaptofisina y la sinaptotagmina. En el citoplasma está presente la α -SNAP, mientras que en la membrana presináptica se localizan la SNAP-25 (proteína asociada a la sinapsis) y la fisofilina (Michaelis, 1998).

En la figura 15 se muestra un esquema de la liberación del glutamato vesicular, de donde puede ser liberado en una actividad normal dependiente (A, B, normal) o independiente (C, D, anormal) del complejo SNARE. Ambos tipos de liberación vesicular pueden ocurrir en las sinapsis en el SNC. Sin embargo, también pueden observarse en ausencia de una densidad postsináptica, por ejemplo, antes de la formación de sinapsis en desarrollo, cuando los axones liberan neurotransmisores. Se cree que esta liberación vesicular guía a la dendrita postsináptica para formar el contacto sináptico final, un mecanismo posiblemente copiado por las células precursoras de oligodendrocitos (OPC) para formar la sinapsis axón-OPC. Aunque se describe aquí como es la liberación axonal, también se puede observar la liberación vesicular del glutamato en las células no neuronales, tales como los astrocitos, además, de que existe la liberación del glutamato no vesicular (E) de diversas fuentes, por ejemplo de la microglía, astrocitos o células dañadas, de la corriente sanguínea o de la reintegración de los transportadores de glutamato, por ejemplo, en

células que sufren de escasez de energía en la isquemia. El modo de liberación del glutamato podría afectar diferencialmente la señalización corriente abajo en la oligodendroglia ya que difieren la concentración y la ubicación del glutamato en el momento de la activación de su receptor (Spitzer *et al.*, 2016).

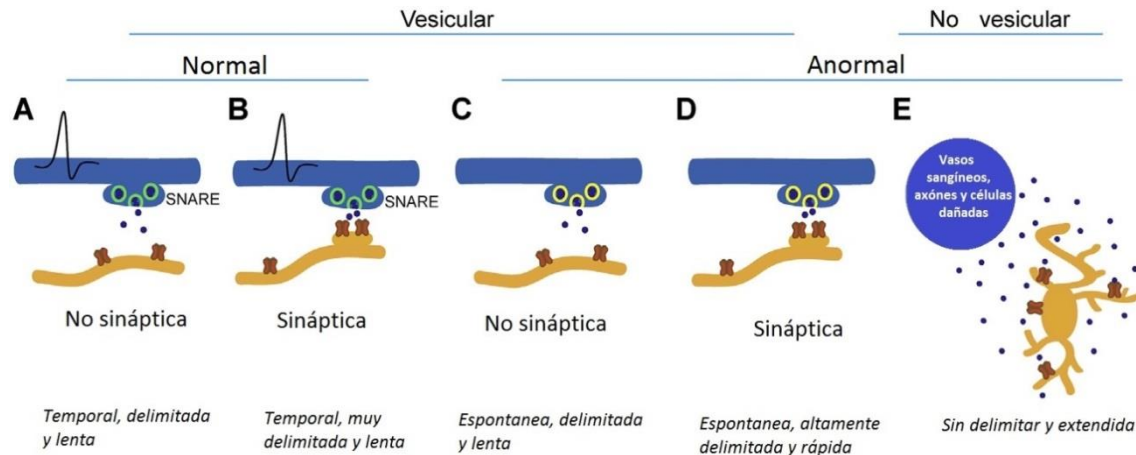


Figura 15. Diferentes formas de liberación del glutamato (adaptado de Spitzer *et al.*, 2016).

Una vez que la vesícula se fusiona a la membrana presináptica, el neurotransmisor se libera en el espacio sináptico e interactúa con los receptores, ubicados tanto en la membrana pre como postsináptica, que regulan esta operación (Bergles *et al.*, 1999).

En el SNC, el glutamato ejerce su función por medio de receptores específicos frecuentemente localizados en las neuronas y células gliales y están, así, idealmente situados para mover neurotransmisores hasta el sitio de liberación y de acción (Watkins y Jane, 2006). Los receptores ionotrópicos son los que están asociados con cuestiones reproductivas (Mahesh y Brann, 2005). El glutamato regula la reproducción mediante la liberación de LH, mediada a través de los efectos hipotalámicos de GnRH para controlar en la pituitaria la secreción de LH (Brann y Mahesh, 1997; Meza-Herrera *et al.*, 2009). Este efecto se puede dar mediante una regulación directa de las células neurosecretoras o indirecta, a través de la modulación de neurotransmisores-

neuropéptidos que contienen neuronas alrededor de las de GnRH (Iremonger *et al.*, 2010).

Los efectos del glutamato pueden estar mediados por los sistemas de acción neuronal que son conocidos por regular la secreción de GnRH y gonadotropinas o la secreción de prolactinas (tales como DA, norepinefrina, epinefrina, Neuropéptido Y (NPY) y acetilcolina) (Brann y Mahesh, 1992). De hecho, la administración de glutamato y sus agonistas promueven la liberación pulsátil de LH en animales previamente expuestos a esteroides. Contrariamente, los antagonistas de los receptores ionotrópicos de glutamato inhiben la liberación de LH, e inhabilitan la secreción de LH inducida por E₂ y la oleada preovulatoria de LH (Meza-Herrera *et al.*, 2009). Así mismo, las neuronas glutamatérgicas implicadas en el control de las neuronas GnRH contienen kisspeptina, un péptido esencial en la regulación del eje gonadotrópico, aumentando la transmisión glutamatérgica directamente a las neuronas GnRH de una manera dependiente de E₂ (Meza-Herrera *et al.*, 2014a; Piet *et al.*, 2015). En un principio fue difícil admitir el papel del glutamato como neurotransmisor, dado que esta molécula se encuentra ampliamente distribuida en las neuronas y en células gliales y se involucra en la actividad considerada no-sináptica, tal como su participación en la función metabólica de las células. Por tal razón, es importante distinguir entre el acervo de glutamato dedicado a la neurotransmisión y aquel que forma parte de las rutas metabólicas comunes a todas las células (Bergles *et al.*, 1999).

En cuestiones reproductivas, se ha reportado que la administración exógena del glutamato incrementa rápidamente la liberación de GnRH, LH y la secreción de prolactina *in vivo* e *in vitro*. Estudios con agonistas del glutamato han demostrado que la activación de los receptores a glutamato están involucrados en numerosos eventos endocrinos reproductivos, tales como la inducción a la pubertad, la reproducción estacional, la secreción de LH inducida por esteroides y la oleada preovulatoria de LH y la prolactina en las hembras (Brann y Mahesh, 1992; Meza-Herrera, 2008; Meza-Herrera *et al.*, 2009; Meza-

Herrera, 2012). Previamente, en cabras, se ha demostrado como el glutamato genera un efecto estimulador sobre el eje reproductivo, a través del incremento de metabolitos sanguíneos, involucrados en la activación del crecimiento folicular y la ovulación (López-Medrano *et al.*, 2009; Torres-Moreno *et al.*, 2009; Meza-Herrera *et al.*, 2011; Meza-Herrera *et al.*, 2014a; Meza-Herrera *et al.*, 2014b). En efecto, la administración de glutamato y sus agonistas promueven la liberación pulsátil de LH tanto en machos como en hembras (Dominguez *et al.*, 2006; Andersen *et al.*, 2011; Meza-Herrera *et al.*, 2012).

La copulación requiere de interacciones somatotrópicas rápidas entre dos individuos activos. El medio por el cual los efectos hormonales lentos se traducen en comportamientos interactivos rápidos, incluyen la regulación de diversas enzimas y receptores de neurotransmisores que activan o inhiben neuronas específicas que integran y ejecutan las conductas (Hull y Dominguez, 2009). Desde el año de 1976 Olney *et al.*, encontraron que inyecciones de glutamato vía subcutánea son efectivas en la estimulación de la liberación de LH en ratas macho adulto, el glutamato, por su influencia en la secreción de GnRH, inicia una cascada hormonal que conduce a la producción de hormonas gonadales en los testículos facilitando el comportamiento sexual tanto apetitivo como consumatorio de los machos (Dominguez, 2009; Andersen *et al.*, 2011), aumentando la respuesta eréctil y las vocalizaciones ultrasónicas (Dominguez *et al.*, 2006). Así mismo, también se ha demostrado que el glutamato y sus antagonistas están implicados en la regulación directa e indirecta de la secreción de GnRH promoviendo la liberación pulsátil de LH y en la producción de testosterona (Dhandapani y Brann, 2000; Meza-Herrera *et al.*, 2009; Will *et al.*, 2014).

La testosterona facilita el comportamiento sexual, en parte, por un incremento de la tasa de liberación de las neuronas productoras de glutamato que se proyectan en el MPOA. Un modelo hipotético que integra estos hallazgos es la presencia del estímulo excitatorio sexual o el acto de la cópula por sí mismo

que activa las neuronas que contienen glutamato en el MeA/BNST (Dominguez, 2009).

En la figura 16 se muestra la posible interacción entre el glutamato, el ON, y la DA en el APOM. (1) Las neuronas liberan glutamato, de esta manera estimulan en el APOM receptores NMDA que operan en los canales de calcio. (2) El incremento de calcio intracelular activa el calcio Cadmodulin (CaM), (3) el cual a su vez activa la enzima ONS que conduce inmediatamente a la producción de ON. La unión de ONS a la cola del carboxilo terminal del receptor NMDA es a través de una proteína de densidad postsináptica (PSD-95). Una vez sintetizado el ON frecuentemente se dispersa de célula a célula, (4) donde puede alterar la actividad en las neuronas presinápticas. (5) Además, en las neuronas que producen DA, se ha demostrado que el ON puede inhibir los transportadores de dopamina (DAT) e incrementar la liberación del calcio vesicular. Este producción de ON en el APOM, después de la liberación del glutamato, puede aumentar los niveles extracelulares de la DA y prolongar la presencia de la DA en la sinapsis (Dominguez y Hull, 2005).

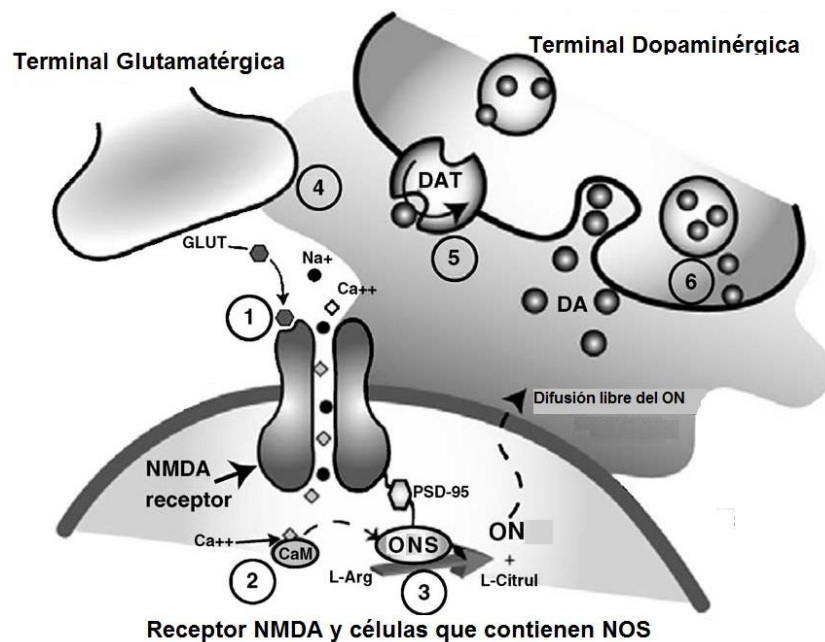


Figura 16. Modelo que muestra la posible interacción entre el glutamato, el ON, y la DA en el APOM (adaptado de Dominguez y Hull, 2005).

Por otro lado, la testosterona facilita el comportamiento sexual por la detonación del glutamato contenido en las neuronas. Tal modelo tiene en cuenta relevantes estímulos quimiosensoriales y mediadores neuroendocrinos de la inducción activa del comportamiento de monta en MeA, BNST, y APOM (Mahesh y Brann, 2005). Una forma importante en que la testosterona y sus metabolitos mantienen la activación del APOM para que se estimule el comportamiento copulatorio, regulando la producción de ON, que a su vez es importante tanto para la liberación de DA basal y la estimulada por la presencia de la hembra. Un factor importante para la liberación de la DA estimulada por la presencia de la hembra es el glutamato del MeA, del BNST y de otras estructuras (Dominguez y Hull, 2005).

Contrariamente, otros estudios también han demostrado que el glutamato regula directamente la acción neuroendocrina (Mahesh y Brann, 2005). Un efecto de tal interacción es la influencia del glutamato sobre la aromatasa, la enzima que convierte testosterona a estradiol. El incremento de los niveles de glutamato influyen en el Ca^{2+} dependiente de la fosforilación de la aromatasa; esta fosforilación rápidamente suprime la actividad enzimática (Balthazart *et al.*, 2006). Consecuentemente, los cambios en el nivel de glutamato durante la monta pueden impactar la acción rápida hormonal en el APOM por la acción de la aromatasa; esto influye en la expresión del comportamiento sexual en minutos (Balthazart *et al.*, 2006; Balthazart y Ball 2006; Dominguez, 2009).

Con respecto a lo anterior se ha expuesto que las hormonas median la actividad del glutamato y que éste también media la función endocrina para estimular el comportamiento y aspectos reproductivos (Dominguez, 2009). A nivel gonadal, específicamente en los testículos de ratas, los receptores ionotrópicos y metabotrópicos del glutamato tienen una afinidad específica para diferentes estructuras y se ha encontrado que la distribución diferencial de GluRs en las células Leydig productoras de testosterona y en el epitelio germinal de los TS de los testículos tiene un papel específico en la regulación hormonal (Gill *et al.*, 2000).

2. FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA DE LAS OVEJAS

El ciclo estral está asociado con una serie de eventos endocrinos interrelacionados regulados por el hipotálamo con la secreción de GnRH. La regulación de la secreción y biodisponibilidad de las hormonas gonadotróficas depende de una interacción compleja entre varios factores internos y externos (Gündoğan *et al.*, 2003). Los factores externos incluyen las señales fotoperiódicas, las feromonas masculinas, la nutrición y el estrés que afectan la función del eje hipotálamo-pituitario-ovárico. La regulación puede lograrse directamente, a través de los efectos sobre la secreción de GnRH, o indirectamente, alterando la respuesta hipofisaria a la GnRH o la sensibilidad ovárica a las gonadotrofinas (Rosa y Bryant, 2003; Bartlewski *et al.*, 2011).

En la época reproductiva, un aumento en la frecuencia de pulsos de GnRH/LH provoca la ovulación, lo cual se conoce como “pico” preovulatorio (Arrollo *et al.*, 2006). La descarga preovulatoria de GnRH, y posteriormente de LH y FSH, alcanza un pico aproximadamente 14 h antes de la ovulación. Esta oleada de gonadotropina es propiciada y sostenida por una disminución de la progesterona (P_4) y un aumento de la secreción de E_2 (Bartlewski *et al.*, 2011) al final de la fase lútea, al iniciarse la luteólisis por efecto de la acción de la prostaglandina $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$) liberada por el endometrio uterino.

La secreción tónica de LH durante el ciclo está inversamente correlacionada con la función lútea, así que la concentración de LH declina gradualmente desde el día 1 hasta el día 9 del ciclo estral y permanece baja; a partir del día 12 se observa un aumento en la frecuencia de secreción y la disminución en la amplitud de los pulsos. Las concentraciones de LH aumentan rápidamente al día 16 hasta alcanzar un pico de 100 a 200 ng/ml (de 50 a 100 veces los niveles basales) y luego declina rápidamente perdurando la oleada aproximadamente 12 h. El inicio de la oleada generalmente está unido al inicio del comportamiento estral y el intervalo entre el pico de LH y la ovulación es determinado. En las concentraciones de FSH se observan ligeras fluctuaciones

de aumentos y descensos en intervalos de aproximadamente 3 a 6 días, y un día antes de la oleada preovulatoria de LH, la FSH declina hasta los niveles basales para luego aumentar, coincidiendo así su pico con el pico de LH. De igual manera, las concentraciones de FSH disminuyen a la par que las concentraciones de LH y descienden nuevamente hasta los niveles basales en un tiempo de 8 a 12 h después del pico preovulatorio. La FSH volverá a incrementarse para tener un segundo pico, aunque ya no llegará a niveles tan altos como el pico anterior. Las concentraciones de P_4 van aumentando gradualmente hasta que al día 8 llegan a una concentración máxima entre 1.5 a 3 mg/ml y permanecen constantes hasta el día 14, después los siguientes dos días decrece rápidamente hasta niveles indetectables. El E_2 se mantiene en concentraciones basales y aumenta inmediatamente después de que inicia la caída de las concentraciones de P_4 (al día 14), aumentando de 5 a 10 veces más en los siguientes 3 días, dándose el pico de E_2 en el inicio de la oleada preovulatoria de LH (Goodman y Inskeep, 2006).

La secreción de LH durante la fase lútea del ciclo estral ovino, refleja principalmente la etapa de desarrollo y la actividad secretora del CL, y sólo un aumento en la amplitud del pulso LH puede estar vinculado a la fase de crecimiento de los folículos que aparecen tempranamente en el ciclo. Los incrementos en las concentraciones medias y basales de FSH se unen estrechamente con los días de emergencia de las oleadas foliculares a lo largo del ciclo estral de la oveja, y la frecuencia del pulso de FSH aumenta durante la fase de crecimiento del folículo a mitad del ciclo, pero disminuye al inicio del aumento de la secreción de P_4 lútea (Figura 17). Las fluctuaciones regulares en las concentraciones séricas diarias de FSH, con una periodicidad de aproximadamente 4-6 días, ocurren durante todo el ciclo ovulatorio (Ginther *et al.*, 1995) y anestro estacional en ovejas (Bartlewski *et al.*, 1999), y también pueden detectarse en ovejas ovariectomizadas (Duggavathi *et al.*, 2005).

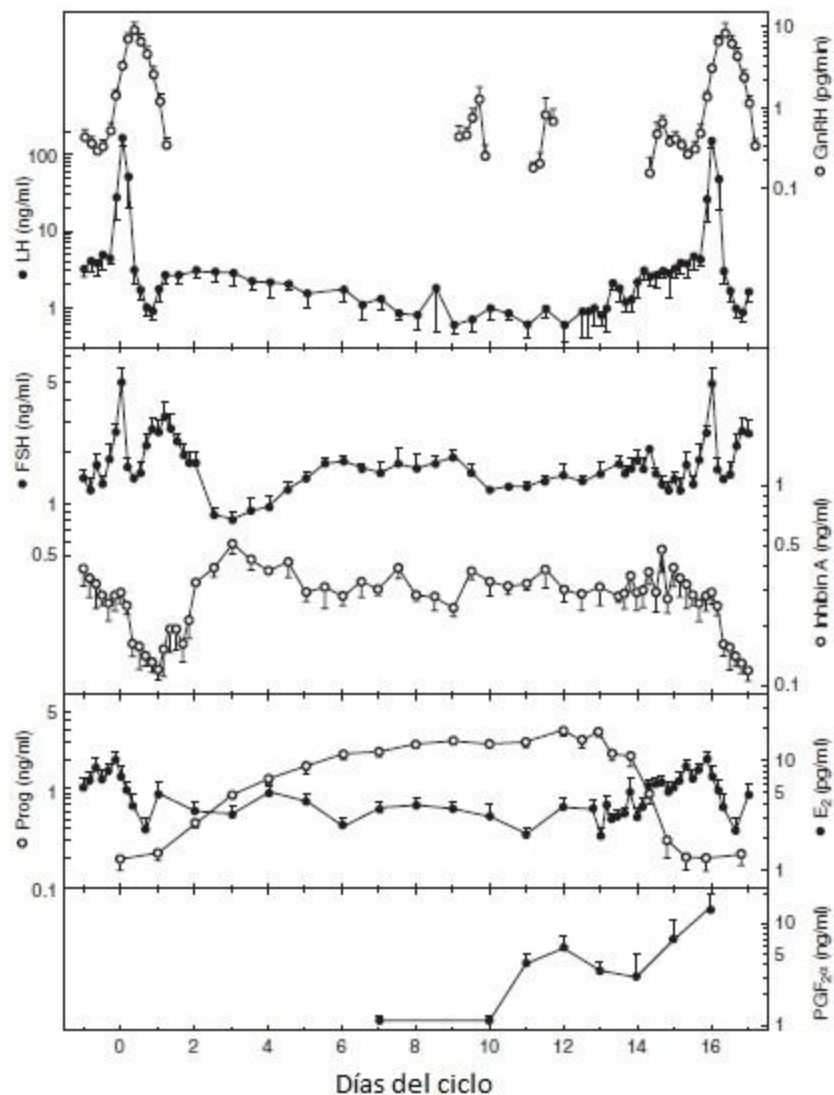


Figura 17. Endocrinología del ciclo estral de la oveja (adaptado de Goodman y Inskeep, 2006).

La principal característica del patrón de secreción de FSH durante el periodo preovulatorio es la aparición de dos oleadas consecutivas. La primera es coincidente con la oleada preovulatoria de LH, y la segunda ocurre entre 20 y 36 h después. La segunda descarga de FSH es de menor amplitud pero de mayor duración (20-24 h), en comparación con la oleada preovulatoria (11-12 h). La oleada preovulatoria de FSH es precedida por niveles relativamente bajos de FSH, mientras que las concentraciones séricas de LH, E₂ e inhibina están aumentando. Esto sugiere que el aumento preovulatorio de FSH surge

de la acción de GnRH, que anula los efectos inhibitorios sobre la liberación FSH durante ese tiempo. La segunda oleada de FSH se produce después de la ovulación, que efectivamente termina la secreción de inhibidores foliculares de FSH (Bartlewski *et al.*, 2011).

En la figura 18 se muestran las oleadas foliculares, la fase lútea, en la cual existen folículos en desarrollo que sufren atresia. Los folículos en desarrollo durante esta etapa secretan E_2 ; sin embargo, la P_4 inhibe la secreción pulsátil de LH a nivel central y esto impide la maduración folicular y la ovulación. Durante la fase folicular, cuando la concentración de P_4 disminuye, el E_2 secretado por los folículos en desarrollo estimula la secreción pulsátil de LH y se ejerce un sistema de retroalimentación positivo, favoreciendo la maduración folicular y la ovulación. Por lo general, se observan dos o tres oleadas foliculares durante el ciclo estral de la oveja (Arrollo *et al.*, 2006).

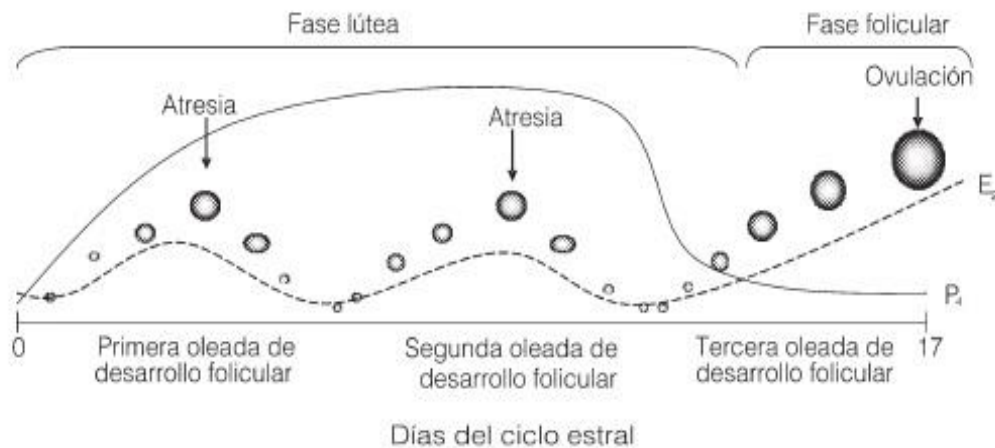


Figura 18. Oleadas foliculares en el ciclo estral de la oveja (tomado de Arrollo *et al.*, 2006).

La P_4 parece ser una señal endocrina clave que interviene en el control de los aumentos periódicos de las concentraciones séricas de FSH y el número de oleadas foliculares en ovejas cíclicas (Bartlewski *et al.*, 2011).

Dos mecanismos pueden ser responsables de la regulación del número y la periodicidad de los picos de FSH por P_4 en todo el ciclo estral de la oveja. En primer lugar, los gonadotropos hipofisarios son estimulados por la GnRH para

sintetizar y liberar LH y FSH de la glándula pituitaria anterior, y con la pulsatilidad de GnRH que permanece baja, la secreción de FSH es favorecida sobre la LH. Por lo tanto, bajo la influencia de la P₄ lútea, la sensibilidad de los gonadotropos productores de FSH a la GnRH puede aumentar, resultando en una mayor secreción de FSH de la glándula pituitaria. En segundo lugar, las concentraciones circulantes de P₄ pueden determinar la tasa de eliminación de la FSH circulante (Bartlewski *et al.*, 2011).

2.2 Estacionalidad Reproductiva en la Oveja

El ciclo reproductivo anual de la oveja se clasifica en una etapa de actividad reproductiva y una de ausencia de reproducción (anestro). En la mayoría de las razas ovinas, la época reproductiva se inicia a finales del verano y se caracteriza por ciclos estrales sucesivos de 17 días. La época de anestro inicia a finales del invierno y se caracteriza por la ausencia de ciclos ováricos regulares y ovulación (Rosa y Bryant, 2003; Arroyo *et al.*, 2006). Sin embargo, dentro de cada especie, existen diferencias muy importantes entre razas en relación a la duración y las fechas de inicio y fin de las actividades ovulatoria y estral. Las ovejas de la raza Ile de France, sin experiencia sexual con machos enteros, manifiestan períodos prolongados de anovulación y anestro, alternando con períodos de ciclos ovulatorios y estrales (Figura 19) (Chemineau *et al.*, 2003).

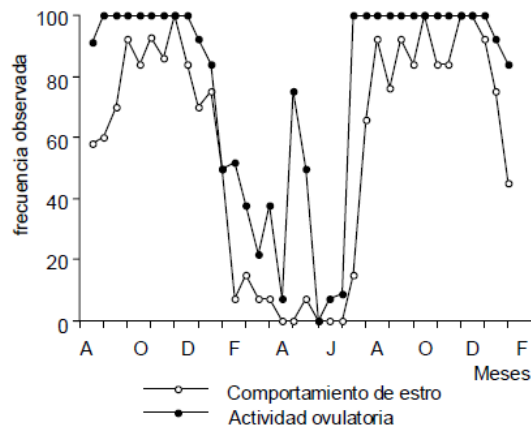


Figura 19. Variaciones estacionales de la ocurrencia de ovulaciones y de comportamiento estral en ovejas Ile de France (Chemineau *et al.*, 2003).

Las ovejas se valen del fotoperiodo (horas luz) para sincronizar el momento del año en que iniciaran su estación productiva (Porrás *et al.*, 2003; Arroyo, 2011). Las razas originarias de zonas localizadas por encima de 35° latitud norte o sur presentan un anestro largo y profundo y una época corta de apareamiento; por el contrario razas provenientes de latitudes menores a 35° norte o sur son de anestro corto y actividad sexual larga (Porrás *et al.*, 2003).

La información fotoperiodica que reciben las ovejas se transmite al sistema neuroendocrino reproductivo, a través de una vía neuro-hormonal que comienza con las señales luminosas recibidas por la retina y transmitidas al núcleo supraquiasmático (NSC), y de ahí, por medio de un circuito multi-sináptico que incluye neuronas en el núcleo paraventricular, la médula espinal intermedia y el ganglio cervical superior, terminan en la inervación de la glándula pineal. La melatonina es normalmente sintetizada y secretada por la glándula pineal de manera diurna, con un aumento dramático que ocurre durante la noche y que vuelve a niveles casi indetectables por la mañana (Weems *et al.*, 2015). La señal de la melatonina, en combinación con la historia fotoperiodica, proporciona información exacta e inequívoca sobre la estación (Gerlach y Aurich, 2000) (Figura 20).

La menor duración en la secreción de melatonina durante los días largos permite la síntesis de DA e induce el anestro estacional. Durante los días cortos, la mayor duración en la síntesis y secreción de melatonina inhibe la producción de DA, con el subsecuente restablecimiento de la actividad estral y la ovulación (Malpaux *et al.*, 1997) (Figura 20).

Durante el período de transición de la ciclicidad a la estación de anestro en ovejas, el ritmo endógeno de la liberación de FSH decae para mantener un orden de emergencia de las oleadas foliculares (folículos en crecimiento de 3 a ≥ 5 mm). En comparación con las ovejas que se encuentran en la mitad de la estación reproductiva, las que se encuentran al final, tienen una significativa reducción de la secreción de E_2 por los folículos ováricos y por bajas

concentraciones de P_4 sérica. El decrecimiento de las concentraciones de P_4 puede ser el reflejo de la baja tasa ovulatoria y del poco volumen del tejido luteal, pero las concentraciones muy bajas de E_2 no son consecuencia de la ausencia de folículos antrales grandes. Todas las alteraciones anteriores en el patrón del ciclo normal de la función ovárica es debida probablemente a la reducida respuesta ovárica del estímulo gonadotrópico y/o al inicio de las señales fotoperiodicas que suprimen la liberación de LH (Bartlewski *et al.*, 1999).

Por otro lado, el anestro estacional en la oveja, se caracteriza por la ausencia de ciclos estrales regulares, de conducta de estro y de ovulación; en esta etapa fisiológica, el estradiol, cuya concentración es basal, ejerce un efecto de retroalimentación negativa a nivel hipotalámico, actuando específicamente en el núcleo dopaminérgico A15, donde induce la síntesis y secreción de DA, la cual actúa en las neuronas productoras de GnRH e inhibe la frecuencia de síntesis y liberación de esta hormona. El evento fisiológico anterior ocurre a pesar de que en el núcleo A15 no se identificaron receptores para estradiol; por lo tanto, el mecanismo de acción del E_2 en este proceso no es claro (Arroyo *et al.*, 2011).

Los tratamientos fotoperiodicos más melatonina causan un incremento en la proporción de ovejas que mantienen la ciclicidad durante la temporada típica de anestro, probablemente debido a que la pulsatilidad de LH es mantenida al nivel que es suficiente para ovulaciones sucesivas, estas ovejas expresan mejor del comportamiento estral debido a la secreción de E_2 más alta y más sostenida después de la actividad de LH (Abecia *et al.*, 2015).

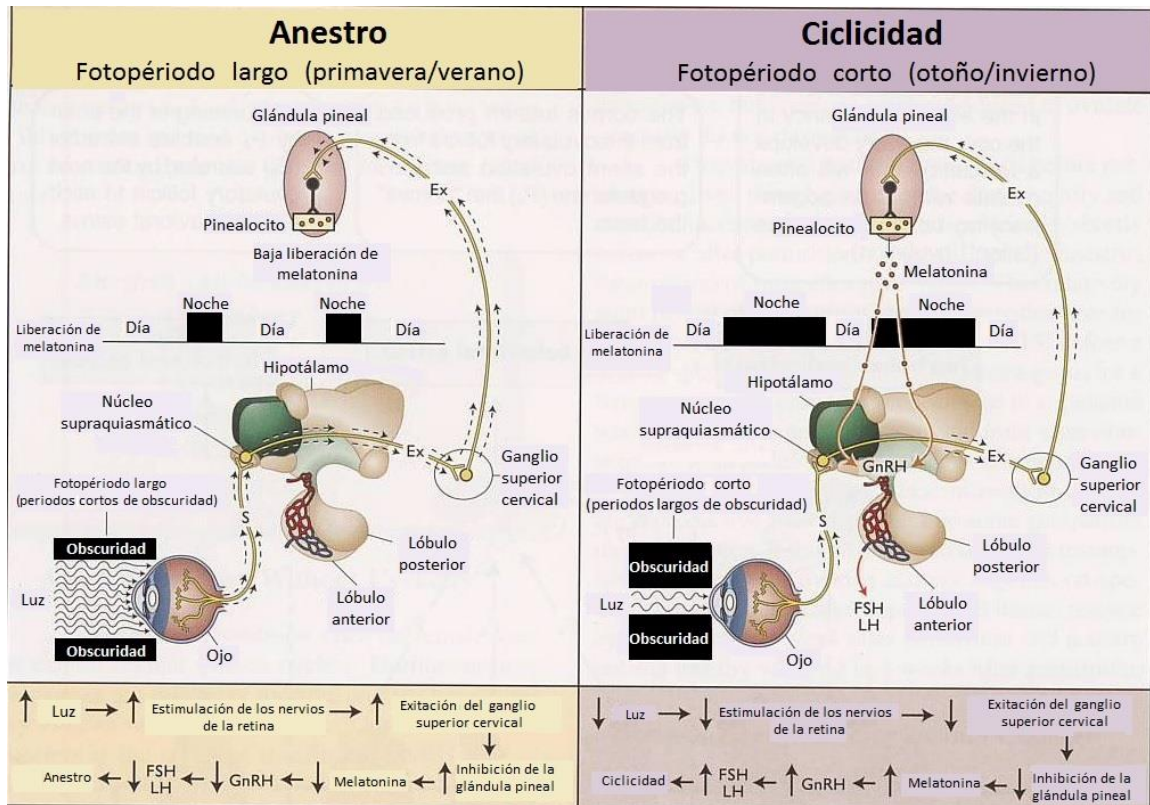


Figura 20. Estacionalidad reproductiva en reproductores de días largos y de días cortos (adaptado de Senger, 2003).

2.3 Efecto macho

El efecto macho constituye un estímulo social que actúa para iniciar la actividad reproductiva tanto en ovejas como en cabras (Álvarez y Zarco, 2001), siendo, la regulación de la actividad ovárica en hembras provocada por la proximidad de los machos, el fenómeno más evidente y más conocido de todos los efectos reproductivos causados por las interacciones sociales. Debido a sus considerables beneficios económicos, el efecto macho, sigue siendo el método reproductivo regulado socialmente, más investigado en la reproducción de los ovinos. La presencia continua de un carnero con las ovejas puede tener importantes efectos sobre los eventos reproductivos en todos los estados de la vida reproductiva, adelanta la pubertad, induce la ovulación durante el anestro

estacional, o el anestro lactacional y modifica el tiempo de la oleada de LH durante la estación reproductiva (Rosa y Bryant, 2003; Fabre-Nys *et al.*, 2015).

El efecto macho es particularmente útil en algunas razas de cabras y ovejas procedentes de latitudes templadas o subtropicales que muestran una estacionalidad reproductiva (Ramírez *et al.*, 2017). Durante el período de anestro (durante los días largos) las ovejas no experimentan ovulación ni ciclos ováricos (Gelez y Fabre-Nys, 2004), sin embargo, la introducción de un carnero sexualmente activo en un grupo de ovejas con anestro estacional activa la secreción de LH (respuesta a corto plazo), seguida por la ovulación (respuesta a largo plazo). En estas hembras, se observa un pulso de LH en cuestión de minutos, mientras que la secreción de FSH o prolactina no experimenta cambios tan rápidos. Si el contacto con los machos se mantiene, las ovejas experimentan una oleada preovulatoria de LH, que tiene lugar alrededor de las 36 h (entre 6 y 52 h) (Chanvallon *et al.*, 2010). Simultáneamente, se produce un aumento en la concentración de FSH. La ovulación se observa alrededor de 48 h después de la introducción del macho y se califica como "silencioso" (Martín *et al.*, 1986) porque no está asociado con el comportamiento estral (Gelez y Fabre-Nys, 2004).

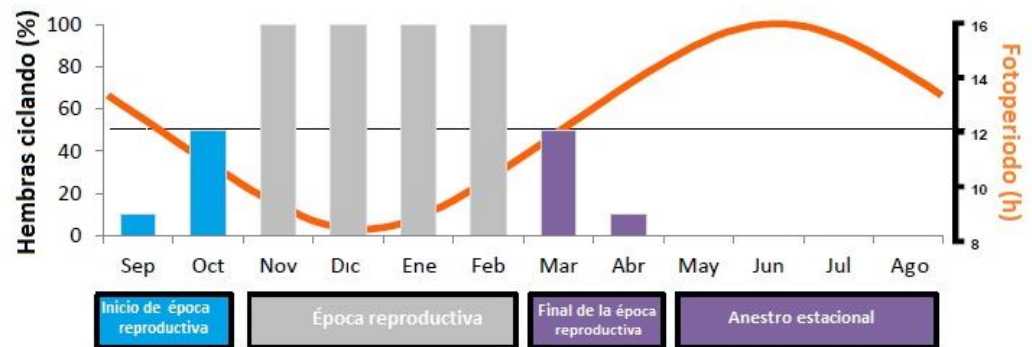
De las ovulaciones inducidas por los carneros puede resultar la formación de un CL (ciclo normal), o uno que regresa de forma prematura alrededor de 6-7 días (ciclo corto). Las ovejas en este último grupo a menudo re-ovulan espontáneamente, pero sin el acompañamiento de celo, por lo tanto, tienen una segunda ovulación "silenciosa" (Chemineau *et al.*, 2006). El comportamiento sexual aparece con las ovulaciones posteriores y tiene lugar en forma de dos picos de actividad en el hato 18 y 25 días después de la introducción del macho, al tiempo de que se presenta una tercera ovulación (Gelez y Fabre-Nys, 2004). Por último, un porcentaje de ovejas que ovulan en respuesta al efecto del carnero no vuelven a ovular y simplemente retornan al anestro. Así, hay una variedad de posibles respuestas al efecto del carnero que contribuyen a la naturaleza altamente inconstante del efecto macho (Chanvallon *et al.*,

2010). Sin embargo, este fenómeno es una herramienta para identificar esta respuesta reproductiva al “efecto macho” (Abecia *et al.*, 2015; Fabre-Nys *et al.*, 2015).

A pesar de algunas contradicciones y de muchas preguntas sin respuesta encontradas en la literatura, ha quedado claro que los estímulos involucrados en el efecto carnero provienen principalmente de feromonas producidas espontáneamente por los mismos (Gelez y Febre-Nys, 2006), en asociación con señales conductuales generadas principalmente durante el cortejo, donde la oveja utiliza los sentidos del olfato, la vista, el oído y el tacto para percibir estos estímulos (Hawken y Martin, 2012). En algunos casos, diferentes señales sensoriales pueden actuar solas con resultados positivos, sin embargo, en muchos casos, el efecto máximo sólo se puede lograr cuando actúan de manera sinérgica (Rosa y Bryant, 2003).

Para incrementar la efectividad del efecto macho se han utilizado tratamientos en los carneros, como la simulación de los días cortos, mediante tratamientos fotoperiodicos con 8 h luz y 16 h oscuridad. Este tratamiento tiene como ventaja que estimula de manera natural la secreción de testosterona, induciendo, como consecuencia, un intenso comportamiento sexual, necesario para obtener una buena repuesta ovulatoria en hembras anéstricas (Delgadillo *et al.*, 2001), pero requiere de técnicas adecuadas e instalaciones laboriosas y de alto costo, además de que la falta de electricidad en los corrales dificulta su implementación (Luna-Orozco *et al.*, 2012). Otra estrategia es la de utilizar tratamientos hormonales como estrógenos, testosterona y eCG, por ser un método sencillo, efectivo y de fácil aplicación, y que requiere de una mínima cantidad de trabajo, pudiéndose implementar tanto en animales bajo sistemas de producción intensiva como en extensiva (De Santiago-Miramontes *et al.*, 2011; Luna-Orozco *et al.*, 2012; Tejada *et al.*, 2016). Sin embargo, su uso está prohibido en algunos países, por lo que se siguen investigando métodos alternativos que puedan complementar el efecto macho.

En la figura 21 se representa el ciclo reproductivo anual de las ovejas y un resumen de los métodos actuales para el control de la reproducción, en la parte de arriba se representa el porcentaje de ovejas ciclando a través del año. La primera fila de la tabla corresponde a la fertilidad de las hembras, bajo condiciones naturales (letras azules), con el uso de métodos ecológicos (letras en color verde), o con el uso de tratamientos hormonales (letras en color rojo). Las celdas que coinciden con el tiempo del año cuando los tratamientos no son requeridos o no son eficientes.



	Inicio de época reproductiva	Época reproductiva	Final de la época reproductiva	Anestro estacional
Reproducción Natural	Buena fertilidad Nacimientos dispersos		Baja / Muy baja fertilidad	Sin fertilidad
Solo efecto macho	Buena fertilidad Nacimientos agrupados		Baja / Muy baja fertilidad	No aplicable Sin actividad sexual
Solo tratamiento con luz			Buena fertilidad Nacimientos dispersos	
Efecto macho / Tratamiento con luz			Buena fertilidad Nacimientos agrupados	
Tratamiento Hormonal	Fertilidad alta / ovulaciones sincronizadas al rededor de 24 h / IA a tiempo fijo		Fertilidad media / ovulaciones sincronizadas al rededor de 24 h / IA a tiempo fijo	
Tratamiento hormonal & Tratamiento con luz			Fertilidad alta / ovulaciones sincronizadas al rededor de 24 h / IA a tiempo fijo	

Figura 19. Ciclo reproductivo anual de las ovejas y un resumen de los métodos actuales para el control de la reproducción (adaptado de Dardente *et al.*, 2016).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Tesis en Régimen de Co-tutela

Control de la actividad sexual de ovejas nulíparas mediante
carneros Dorper tratados con testosterona y/o glutamato:
comportamiento sexual y efecto macho

VI.

ARTÍCULOS

Doctorado en Ciencias en Producción Agropecuaria
Doctorado en Recursos Naturales y Gestión Sostenible



Influencia del comportamiento sexual de carneros Dorper tratados con glutamato y/o testosterona sobre el comportamiento reproductivo de ovejas anovulatorias

Influence of sexual behavior of Dorper rams treated with glutamate and/or testosterone on reproductive performance of anovulatory ewes

Calderón-Leyva G, Meza-Herrera C.A., Rodríguez-Martínez R., Angel-García O., Rivas-Muñoz R., Delgado-Bermejo J.V. and Véliz-Deras F.G. Influence of sexual behavior of Dorper rams treated with glutamate and/or testosterone on reproductive performance of anovulatory ewes. *Theriogenology* 2018 106, 79-86.

DOI:org/10.1016/j.theriogenology.2017.10.016



Influence of sexual behavior of Dorper rams treated with glutamate and/or testosterone on reproductive performance of anovulatory ewes



Guadalupe Calderón-Leyva^{a,d}, Cesar A. Meza-Herrera^{b,*}, Rafael Rodríguez-Martínez^a, Oscar Angel-García^a, Raymundo Rivas-Muñoz^c, Juan V. Delgado-Bermejo^d, Francisco G. Véliz-Deras^a

^a Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Periférico Raúl López Sánchez y Carretera a Santa Fe, 27054 Torreón, Coahuila, Mexico

^b Universidad Autónoma Chapingo, Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas, Bermejillo, Durango 35230, Mexico

^c Instituto Tecnológico de Torreón, Carretera a San Pedro km 7.5, Torreón Coahuila, Mexico

^d Universidad de Córdoba, Instituto de Estudios de Posgrado, Campus Rabanales, 14071, Córdoba, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 May 2017

Received in revised form

7 October 2017

Accepted 7 October 2017

Available online 9 October 2017

Keywords:

Dorper rams

Glutamate

Testosterone

Male effect

Anovulatory-nulliparous ewes

Reproductive outcomes

ABSTRACT

The aim of this study was to determine if exogenous administration of glutamate and (or) testosterone to male rams during the season of reproductive arrest is able to re-activate male sexual behavior and, later on, to promote through the male effect, both sexual and reproductive competence of anovulatory nulliparous ewes. Therefore, an experiment was performed under long-day photoperiods (spring; photoreproductive arrest, 26°N). Dorper rams were randomly divided into four homogeneous experimental groups ($n = 5$ males each) regarding live weight (LW), body condition score (BCS), scrotal circumference (SC) and odor intensity (OI). Then, groups were treated with: i) GG (7 mg kg⁻¹ LW of glutamate, every 4d × 30d, im.), ii) GGT (7 mg kg⁻¹ LW of glutamate every 4d × 30d im + 25 mg of testosterone propionate, every 3d × 15d, im.), iii) GT (25 mg of testosterone propionate every 3d × 15d, im, and iv) GC (1 mL of saline, every 4d × 30d, im.). Thereafter, Dorper rams, ($n = 4$ per group) were selected and exposed to Dorper anovulatory-nulliparous ewes divided in four groups ($n = 14$ ewes each), and all the appetitive (ASB) and consummatory (CSB) sexual behaviors and indicators of sexual rest (ISR) were registered during the first 48 h of this male-to-females contact. Thereafter, males continued the male-to-female contact for another 8 d, in order to quantify the ewe's sexual and reproductive response through the male effect. During the sexual behavior tests, the GGT rams showed the highest ASB + CSB frequencies ($P < 0.05$) followed by the GG-rams with the lowest frequencies showed by the GC and GT groups. While the highest ISR behaviors were shown by the GG and GGT groups ($P < 0.05$) followed by the GC and GT-rams, no differences occurred regarding LW, BCS, and SC along the experimental breeding, with the largest ($P < 0.05$) OI shown by the GGT-rams and the lowest value observed in the control rams. Regarding the reproductive response of the nulliparous-anovulatory ewes exposed to treated rams, the glutamate + testosterone treated males induced not only an increased ($P < 0.05$) ovulatory activity and faster ($P < 0.05$) estrus response but an augmented ($P < 0.05$) pregnancy rate of the previously anovulatory ewes. To conclude, whereas the GG and GGT treatments generated encouraging sexual and reproductive outcomes, our results are also thought-provoking from a comparative sexual behavior perspective while may embrace potential applications to other animal industries.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

* Corresponding author.

E-mail addresses: cmeza2020@hotmail.com, cmeza2000@gmail.com (C.A. Meza-Herrera).

URL: <http://www.researchgate.net/meza-herrera>

1. Introduction

Sheep from temperate latitudes, either males or females, are considered strongly seasonal breeders [1]. To anticipate environmental changes and to program biological functions and behaviors accordingly, adaptation strategies have been evolved mainly based in seasonal rhythms of reproductive and metabolic function [2]. A

key environmental cue modulating reproductive function is photoperiod, which is the most reliable environmental signal that seasonal breeders use to align their physiology to a changing environment [3,4]. Also, in temperate sheep males, photoperiod is the main environmental factor responsible to generate full activity or quiescence of reproductive function; photoperiodic-dependent variations in sexual activity are accompanied by changes which clearly promote detectable changes in sexual behavior [5], testicular size [6] and hormone secretion [2,7]. The effect on hormone secretion occurs mainly by altering secretion of GnRH which in turn promote the release of the pituitary hormones FSH and LH, and later on, the secretion of testosterone by the testis [8]. Seasonal changes in testicular size and function are regulated through the actions of LH and FSH; LH stimulates the testicular Leydig cells to produce testosterone [8] an essential hormone for the development and maintenance of sexual behavior and libido [2,9].

Besides that, the amino acid glutamate, the main excitatory neurotransmitter in the central nervous system [10], has been also considered a key modulating molecule in reproduction, since its actions are related not only to the onset but maintenance of reproductive activity [11] as well as to the expression of sexual behavior [12,13]. Despite important achievements have been accomplished in different animal species regarding the effect of exogenous glutamate upon metabolic and reproductive function [14], there is a lack of information regarding the probable role of glutamate and its possible synergistic role with testosterone in triggering the sexual behavior in male sheep. We hypothesized that intramuscular treatment with glutamate and/or testosterone are effective to induce sexual behavior in adult rams during the natural season of reproductive arrest at 26° N, (i.e. increased photoperiods). We also aimed to determine whether the introduction of such previously treated males is enough to promote both sexual and reproductive competence of anovulatory-nulliparous ewes through the male effect, evaluating different response variables from breeding until embryonic implantation.

2. Material and methods

All the methods and management of the experimental units used in this study were in strict accordance with accepted guidelines for ethical use, care and welfare of animals in research at international [15] and national [16] levels, with institutional authorization reference number UAAAN-UI/15-510-2.

2.1. Experimental area, environmental conditions and animals

The study was conducted during spring under natural light conditions of increased photoperiods in an intensive sheep production unit in a semi-desert area of Northern Mexico, at 26° N and 103° W, an altitude of 1120 m, and annual average temperature from 22° to 24°C. Dorper rams [n = 20, 2–3 yr-old; 81 ± 0.32 kg live weight (LW) and 3.7 ± 0.05 units of body condition score (BCS)] as well as anovulatory nulliparous Dorper ewes (n = 56, 7–8 mo old; 42 ± 2.36 kg LW; 3.04 ± 0.22 units BCS) were used to perform the study. During the experimental period, which lasted from March to June, rams were fed alfalfa hay, corn silage and corn grain while all ewes were fed with food residues from a Holstein dairy cow unit. Their ration was mainly composed of alfalfa hay, corn silage and corn grain. Both rams and ewes were fed twice daily (1200 and 1800 h) and had *ad libitum* access to clean water, mineral salts and shades. Prior to the onset of the experiment, all ewes and rams were kept isolated from sight and smell of the opposite sex for at least a period of 45 days.

2.2. Rams, management and treatments

Before the onset of treatments, rams were individually identified and the LW, BCS, SC and OI were registered at two-week intervals during the experimental period. The BCS was measured by dorsal palpation, ranging from the scale of 1 (very thin to 5 very fat) [17]. While measurement of the SC considered the measure of widest part of the testes using a flexible tape [18], the odor intensity (OI) was recorded by smelling above the base of the head in the front of the ram at a distance of 8–10 cm, as described by Walken-Brown et al [19], assigning a score of 0 (equal to that of a female odor) to 3 (strong, powerful smell as lanolin). Thereafter, in March, rams were separated into four groups (n = 5 each) homogeneous in terms of LW, BCS, SC and OI (81.3 ± 0.3 kg, 3.8 ± 0.05 units, 35.08 ± 0.23 cm, 0.65 ± 0.02 units, respectively), and groups were randomly assigned to the following four treatments with an experimental period of 30 days (Fig. 1):

- i) Glutamate group (GG, intramuscular injection of 7 mg kg⁻¹ LW of L-glutamate (pH Eur EMPROVE® exp; Merck-C5H9NO4-art-101791, diluted in distilled water); solution was prepared as previously described by Meza-Herrera et al. [14] and applied every 4d × 30d,
- ii) Testosterone group (GT, intramuscular injection of 25 mg of testosterone propionate (Testosterone 50, Lab Brovel Mexico City) every 3d during the last 15d of the experimental period of 30d,
- iii) Glutamate + testosterone group (GGT, intramuscular injection of 7 mg kg⁻¹ LW of L-glutamate every 4d × 30d) + intramuscular injection of 25 mg of testosterone propionate (Testosterone 50, Lab Brovel Mexico City), every 3d during the last 15d of the experimental period of 30d,
- iv) Control group (GC, intramuscular injection of 1 mL of physiological saline every 4d × 30d).

2.3. Sexual behavior of rams: treatment design and evaluated response variables

Treatment design consisted of a 2 × 2 factorial arrangement of treatments with two levels of glutamate (with and without), and two levels of testosterone (with and without). Response variables considered indicators of Appetitive Sexual Behavior (ASB): Flehmen, ano-genital sniffing, approaches, pawing, vocalization, penis extrusion, Consummatory Sexual Behavior (CSB): Mount attempt and mount concluded, and Indicators of Sexual Rest (ISR): Isolation-standing, isolation-lying down, attempt to scape, aggressions and external distractions.

On d0 of the experimental breeding, four rams from each experimental group were randomly selected and immediately introduced to pens with anovulatory-nulliparous ewes [i.e. 4 males: 14 females] in order to evaluate the male effect. Then, records of the male sexual behavior were collected during two consecutive hours (0800–1000 h) during the first two days of the experimental breeding. The records for the ASB, CSB and ISR frequencies were previously described (Table 1). Therefore, the effect to treat the males with glutamate, testosterone and the interaction with respect to the control group, upon the sexual behavior of rams exposed anovulatory nulliparous Dorper ewes, was evaluated.

2.4. Management of the nulliparous ewes exposed to treated rams: in search of the male effect

Prior the experimental breeding to quantify the possible stimulus of the “male effect” throughout those males previously treated

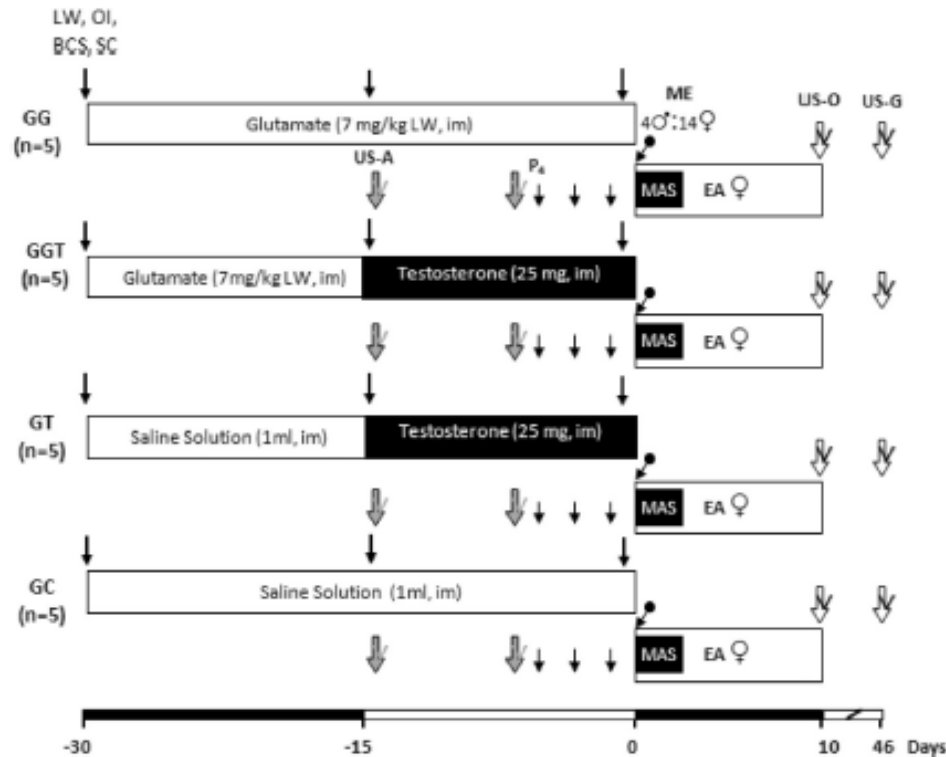


Fig. 1. Dorper rams ($n = 20$) were treated with glutamate (GG), testosterone (GT), glutamate + testosterone (GGT) and saline solution (GC) during 30 days; the live weight (LW), body condition score (BCS), scrotal circumference (SC) and odor intensity (OI) measured across time prior to the onset of treatments and were registered at two-week intervals until the end of treatments. Anovulatory-nuliparous Dorper ($n = 55$) ewes underwent two ultrasound scans (-14 and -7 days) to confirm anovulation, in order to prevent short estrus cycles, a total of 60 mg of progesterone was 20 mg d^{-1} applied on days -6 , -4 and -2 . In order to evaluate the male effect (ME, day 0), and once finished the treatments of rams, the anovulatory-nuliparous ewes were randomly allocated to one of the four male groups ($n = 14$ each) and treated rams ($n = 4$) from each experimental group were randomly selected and immediately introduced to pens where anovulatory-nuliparous Dorper ewes were placed [Multi-anovulatory scenario (MAS); 4 males: 14 females]; records of the male sexual behavior were collected during two consecutive hours thru two days (i.e. $2 \text{ h} \times 48 \text{ h}$). In addition, from the first day upon exposure to males, the female's estrus activity (EA) was determined during ten consecutive days. Then, the ewe's ovulatory response was determined on day 10 throughout a real time transrectal ultrasonographic scanning (US-O) while another ultrasonographic scanning was performed on day 46 to diagnose pregnancy (US-G).

Table 1
Main behaviors related to the appetitive sexual behavior (ASB), consummatory sexual behavior (CSB) and indicators of sexual rest (ISR) of rams.

Behavior	Description
Appetitive Sexual Behavior (ASB)	
Flehmen	Elevating the head and upper lip feedback in response to taste and odor of urine ewe or ambient odor
Ano-genital sniffing	Sniff in the genital region of ewe
Approaches	Rub, licks and/or superficially nibbling the flank of the ewe with intensity and passion
Pawing	The ram stand behind the ewe at a small angle to her and kicks her flank with one of the forelegs
Vocalizations	Emission of swishes regularly during the approaches or kicking in ewe
Extrusion penis	Partial extrusion penis
Consummatory Sexual Behavior (CSB)	
Attempt mounting	Behind the ewe makes movements with the intent to copulate, remain both front legs in the air but not placed way safely on the ewe
Mounting	Intrusion of the penis into vagina of ewe with one or more thrusts and thereby can occur ejaculation characterized by the elevation of the ram's head backward.
Indicators for Sexual Resting, Aggressions & Escapes (SRI)	
Standing isolation	Prostrate standing somewhere in the pen separate of the ewe, and appearing indifferent to the presence of these.
Isolation lying down	Male lies regardless if it away from ewes or there it is beside him
Time lying down	The time that remains lying, if lie down twice or more this it sum to get the total
External distraction	Male remains among the ewes, but there are noises or movements outside the pen that cause your attention
Attempt escape	Looks for an opportunity to exit from sheep pen, gives walks around near the walls of restless way and when it have opportunity get out, jump the fence
Aggressions	Hit to the ewes who approach him or finds in its way

Note: Categories and components of ram sexual behavior of rams have been previously described and detailed [20–25].

with glutamate and/or testosterone, the nulliparous ewes underwent two ultrasound scans 7 days apart to evaluate the ovarian status and to confirm anovulation by using an Aloka SSD-500 with a 7.5-MHz transducer (Aloka; Corometrics Medical Systems, Inc., Wallingford, CT [26–28]. Thereafter, and in order to prevent short cycles, a total of 60 mg of progesterone (Progesterone 50 mg, Lab Brovel, Mexico City) was applied via intravulvar distributed in 3 doses: 20 mg d⁻¹ each on days 6, 4 and 2 before contact with the treated rams [29,30].

Therefore, a total of 56 nulliparous-anestrous Dorper ewes, with homogeneous LW and BC were randomly allocated to four experimental groups (n = 14 each) and were placed in pens 100 m apart from each other. Each group of ewes was exposed to four rams randomly selected from the previously treated males with glutamate (GG), testosterone (GT), glutamate + testosterone (GGT) and saline-control (GC).

2.5. Sexual and reproductive performance of ewes: evaluated response variables

The estrus induction was determined by direct observation of groups, twice daily from 0800 to 0900 and 1800–1900 h during ten consecutive days after ram introduction. The identification number of every ewe that remained quiet and allowed herself to be mounted by the male was recorded (consummatory sexual behavior), all the observations were made by the same trained technician [31]. The estrus onset interval refers to the period of time between the initial male-female contact until the first copulation or mount allowed. Thereafter, the ovulatory activity was quantified registering the number of ewes with the presence of at least one corpus luteum in either ovary and was determined on day 10 after ram introduction throughout a real time transectal ultrasonographic scanning (Aloka SSD-500; Corometrics Medical Systems, Inc., Wallingford, CT) using the 7.5 MHz transducer [32]. While the total number of corpus luteum per experimental group of ewes was registered, ovulation rate was obtained by dividing the number of corpus luteum in either ovary with respect to those ewes ovulating per experimental group. Besides, on days 36 and 46, another ultrasonographic scans were performed to detect the presence of embryos in the uterine cavity in order to confirm if fertilization and pregnancy occurred.

2.6. Statistical analyses

The response variables LW, BCS, SC and OI during the experimental period were analyzed by a split-plot ANOVA for repeated measures across time. The models included treatment in the main plot, which was tested using animal within treatment as the error term. Time and the time × treatment interaction were included in the subplot and were tested by using the residual mean square. Regarding the male sexual behavior, data were analyzed through an ANOVA for a completely random design having a 2 × 2 factorial arrangement of treatments (i.e. glutamate, testosterone and their interaction); previously data of sexual behavior were log transformed since they did not present a normal distribution. In the case of a significant treatment effect, mean separations were achieved using the PDIF option of the GLM procedure. Count variable distribution regarding the anestrous ewe's reproductive outcomes once exposed to the male effect (i.e. estrus induction, estrus onset interval, ovulation rate and pregnancy) between main effects, were compared using the CATMOD procedure of SAS in order to determine the possible effect of the treated males upon the reproductive response of the previously anovulatory Dorper ewes. Since a glutamate × testosterone interaction was observed, both regarding the sexual test and the reproductive outcomes of the nulliparous

ewes, single main effects for both treatment levels are presented. Results are presented as non-transformed means ± s.e.m., and a difference of P < 0.05 was considered as significant. All the analyses were computed using the procedures of SAS (version 9.2; SAS Inst. Inc. Cary, NC, USA).

3. Results

Fig. 2 shows the variables LW (80.83 ± 0.11 kg), BCS (3.62 ± 0.05 units), and SC (35.32 ± 0.14 cm); no differences among treatments occurred neither regarding time nor for the interaction treatment × time. In contrast, OI differed among treatments (P < 0.01); the GGT group generated the highest value (1.5 ± 0.10, P < 0.01) on d15 compared to the GG, GT and GC groups (0.7 ± 0.03, 0.4 ± 0.06 and 0.1 ± 0.07, respectively). However, on d30, no differences were observed among the GGT, GT and GC groups (1.5 ± 0.10, 0.9 ± 0.06 and 0.8 ± 0.03, respectively), yet, the lowest value was detected in the GC group (0.6 ± 0.07, P < 0.05).

Table 2 shows the values for the response variables according to treatments upon the sexual behavior of the rams exposed to the anovulatory-nulliparous Dorper ewes. Since a glutamate × testosterone interaction was observed (P < 0.05), simple main effects values for ASB and CSB (percentages) and their components (frequencies), as well as the total ASB + CSB, are reported. When males were exposed to the anovulatory-nulliparous females, the highest (P < 0.05) ASB percentages favored to the GGT and GG groups, followed by the GC and the GT groups. Besides, while no differences among treatments were observed for the response variables flehmen, pawing and vocalizations, the highest (P < 0.05) percentages for anogenital sniffing favored to the GG and GGT-rams, while the highest value for approaches and penis extrusion occurred in the GGT-group. Although the GGT, GG and GC had the largest CSB percentage values, no differences occurred among treatments regarding the attempt mounting and mounts frequencies. Interestingly, when considering the total sexual behavior (ASB + CSB), the observed results during the first 48 h of the male-to-female contact, favored (P < 0.05) to the GGT and GG treatments, followed by the GC and the lowest values for the GT group. In addition, the largest percentages for the sexual resting indicators were observed in the GG, GGT and GC groups, with the GT group depicting the lowest SRI values; the same trend was true when adding all the variables for the SRI behavior. While the GT rams displayed the lowest ISR frequency, they also had the bottommost frequencies regarding both ASB and CSB.

At the beginning of experimental breeding, one ewe of the GC-group had health problems and was excluded from analyses (i.e. GC; n = 13). Sexual and reproductive responses of ewes exposed to the male effect are shown in Table 3. The largest estrus induction percentages (P < 0.05) were shown by the GGT, GG, and GC groups regarding to the GT group. In addition, the shortest estrus onset interval (P < 0.05) was shown by the GGT and GG groups, followed by the GT treatment with no difference regarding the GG-group; the largest estrus onset interval was depicted by the GC group. Besides, the largest ovulatory activity was observed in the GG (100%) and the GGT (92%) groups, observing the lowest values by the GC and GT groups (83% and 71%, respectively). The observed total corpus luteum number per group occurred in the GGT and GG groups, followed by the GC and GT groups (20, 18, 13 and 12 corpus luteum, respectively). Nonetheless, no differences occurred with respect to ovulation rate among experimental groups. Yet, the largest (P < 0.05) pregnancy rate was shown by the GG and GGT groups, followed by the GC and GT groups, with corresponding percentage pregnancy values of 100, 92, 76 and 71, respectively. The cumulative percentage of ewes showing estrus behavior once exposed to the males from the four experimental groups is shown

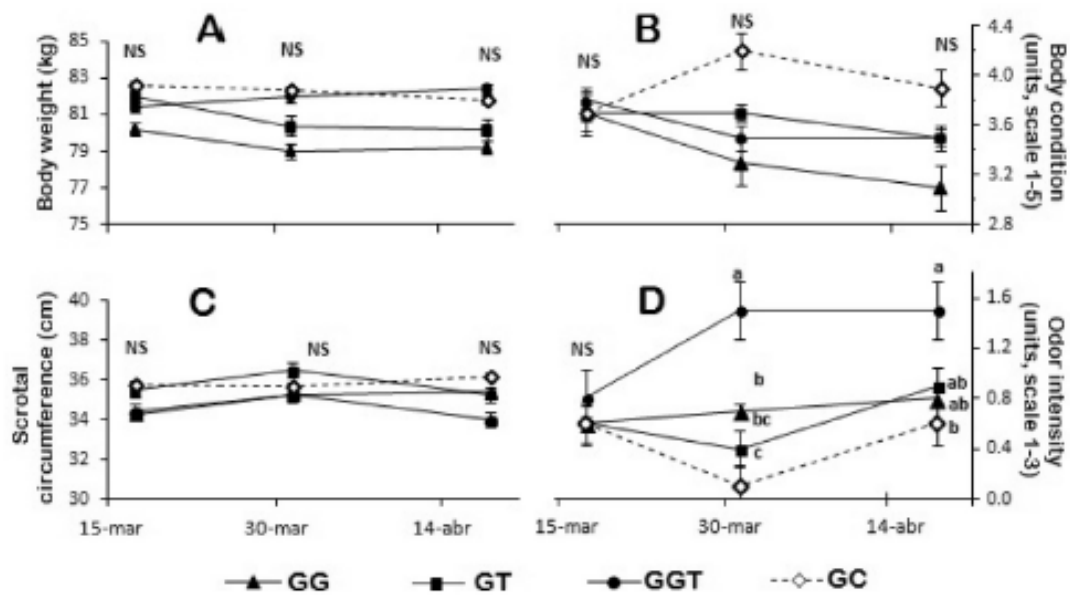


Fig. 2. Least-square means (\pm S.E.M) for A) Live weight (kg), B) body condition score (units 1–5 scale), C) scrotal circumference (cm) and D) odor intensity (units, scale 0–3) (mean \pm S.E.M.) measured across time in Dorper rams ($n = 20$; 5 per experimental group) treated with glutamate (GG), testosterone (GT), glutamate + testosterone (GGT) and saline solution (GC) under natural photoperiod at 26° north latitude. a,b,c = values with different literal differ ($P < 0.05$). NS = not significant ($P > 0.05$).

in Fig. 3. A treatment effect was detected within the first 36 h after male introduction, favoring to the GG and GGT groups ($P < 0.05$).

4. Discussion

Our working hypothesis stated that intramuscular administration of glutamate and/or testosterone would stimulate the sexual behavior (ASB & CSB) of adult rams during the natural male sexual resting season; our results support this hypothesis. Indeed,

significant differences were observed regarding to both the appetitive and consummatory sexual behaviors favoring to the GGT and GG groups when considering that such males were exposed to the nulliparous-anovulatory ewes. Appetitive sexual behavior involves a series of actions directed toward a female waiting for copulation (e.g., courtship), while consummatory sexual behavior consists of a direct sexual contact to the female, concluding with mating or copulation [25]. Both the appetitive and consummatory sexual behaviors, to a large degree, involve mainly the front of the POM for ASB expression

Table 2

Simple main effect least-square means (\pm S.E.M) for sexual behavior [Appetitive (ASB), Consummatory (CSB) and Rest (ISR)] of young Dorper Rams ($n = 16$) treated with glutamate (GG), testosterone (GT), glutamate + testosterone (GGT) and saline (GC) and exposed to adult Dorper anovulatory ewes ($n = 55$) at 26° north latitude.*

Ram (n)	GG (4)	GT (4)	GGT (4)	GC (4)
Appetitive (%)	6.8 \pm 1.2 ab	2.7 \pm 1.4c	10.9 \pm 2.9a	4.6 \pm 2.3bc
Flehmen (n)	9.3 \pm 2.5a	6.5 \pm 4.4a	12.3 \pm 3.9a	11.5 \pm 5.6a
Anogenital sniffing (n)	132.5 \pm 30.4a	56.5 \pm 28.7b	108.0 \pm 19.5 ab	44.0 \pm 21.2b
Approaches (n)	16 \pm 4.2bc	2.8 \pm 2.1c	68.3 \pm 26.0a	29.9 \pm 16.3b
Pawing (n)	7.3 \pm 3.1a	0.3 \pm 0.3a	45.3 \pm 27.5a	3.3 \pm 1.9a
Vocalization (n)	3.8 \pm 3.1a	0.8 \pm 0.8a	34.3 \pm 28.1a	24.5 \pm 13.6a
Penis extrusion (n)	1.8 \pm 0.8 ab	0.8 \pm 0.8b	7.3 \pm 4.0a	2.3 \pm 1.4 ab
Consummatory (%)	9.2 \pm 7.3a	0.8 \pm 0.6b	9.2 \pm 4.6a	5.7 \pm 2.3a
Attempt mounting (n)	2.8 \pm 1.5a	0.5 \pm 0.3a	4.3 \pm 1.9a	2.3 \pm 2.3a
Mounting (n)	5.3 \pm 4.9a	0.3 \pm 0.3a	3.8 \pm 2a	2.8 \pm 2a
Total ASB&CSB (n)	178.5 \pm 26.4b	68.3 \pm 36.1c	283.3 \pm 75.9a	120.3 \pm 59.6bc
ISR (%)	11.6 \pm 7.1 a	0.4 \pm 0.2b	8.6 \pm 2.3a	4.0 \pm 0.4 ab
Standing Isolation (n)	3.0 \pm 0.9a	0.3 \pm 0.3b	1.8 \pm 1.0 ab	1.8 \pm 0.8 ab
Lying isolation (n)	1 \pm 0.4b	0 \pm 0.0c	3.3 \pm 0.6a	3.3 \pm 1.0a
Time Lying (min)	7.8 \pm 4.4bc	0 \pm 0.0c	16.7 \pm 6.3 ab	49 \pm 20.3a
Attempt escape (n)	–	–	–	–
Aggressions (n)	10 \pm 10a	0.3 \pm 0.3a	6.3 \pm 4.3a	0 \pm 0a
External distractions (n)	1.5 \pm 0.3a	0 \pm 0.0b	0 \pm 0.0b	0.5 \pm 0.5b
ISR Total (n)	15.5 \pm 9.2a	0.5 \pm 0.3b	11.3 \pm 3.0a	5.5 \pm 0.5 ab

*Behavioral sexual test was conducted the first 2 h of male-to-females contact, with several anovulatory ewes during 2 consecutive days and under natural photoperiod conditions.

a,b,c=Values with different literal in the same row differ ($p < 0.05$).

Table 3

Simple main effect least-square means (\pm S.E.M) for sexual and reproductive performance of nulliparous ewes Dorper exposed to rams adults previously treated with glutamate (GG), testosterone (GT), glutamate + testosterone (GGT) and saline solution (GC) at 26° north latitude.

Ewes (n)	GG (14)	GT (14)	GGT (14)	GC (13)
Estrus onset interval (h)	38.6 \pm 2.6 ^{ab}	43 \pm 7.6 ^b	36 \pm 2.5 ^a	58.2 \pm 7.0 ^c
Estrus induction (%)	100 ^a	71 ^b	100 ^a	100 ^a
Ovulatory activity (%)	100 ^a	71 ^b	100 ^a	84 ^b
Total corpus luteum (n)	18 ^a	12 ^b	20 ^a	13 ^b
Ovulation rate (n)	1.3 \pm 0.13 ^a	1.2 \pm 0.11 ^a	1.5 \pm 0.18 ^a	1.2 \pm 0.11 ^a
Pregnancy (%)	100 ^a	71 ^b	92 ^a	76 ^b

a,b,c = Values with different literal in the same row differ ($P < 0.05$).

as well as the back of the nucleus for the CSB expression [33,34]. Interestingly, those brain structures located in the medial preoptic area and the median eminence contain most neuronal cell bodies and terminals of GnRH neurons, respectively [3]. Results suggest the potential involvement of glutamate administration upon GnRH neurons as well as on other neuronal and glial cells that regulate neuronal excitability, causing the activation of metabotropic glutamate receptors (mGluRs) and the release of LH [35], and ultimately testosterone, affecting positively the male sexual behavior [13]. Certainly, glutamate actions in the MPOA positively affect both ASB and CSB [12], increasing not only the erectile response but also enhancing ultrasonic vocalizations [36].

Glutamate and its agonists have been involved in the direct and indirect regulation of GnRH secretion, promoting pulsatile release of LH and, consequently, testosterone production in males [13,37,38]. Besides, subcutaneous injections of glutamate stimulated LH release and, consequently, testosterone output in adult male rats. Testosterone levels in these males were elevated after treatment with glutamate, presumably after the release of LH [14,39]. In addition, it has been found that changes in glutamate level during copulation can impact a faster hormone action in the MPOA by an aromatase-dependent effect influencing a faster response (i.e. minutes) in the expression of sexual behavior [12,33]. Moreover, it is likely that glutamate, by the influence of kisspeptin, dopamine, catecholamines and the release of nitric oxide, regulates the androgen production

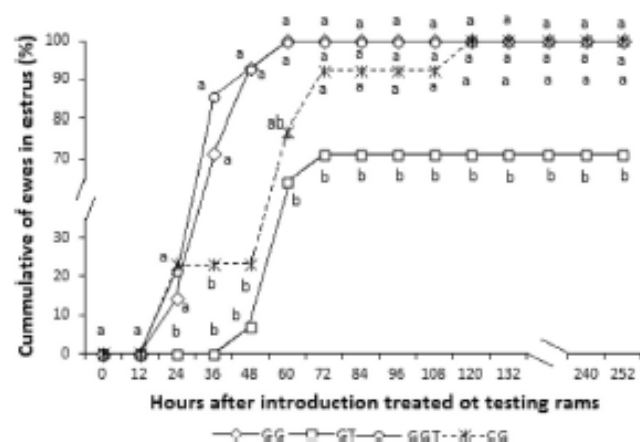


Fig. 3. Cumulative percentage of behavior across the experimental period from anovulatory-nulliparous Dorper ewes ($n = 55$; 14 or 13 per treatment) exposed to Dorper rams ($n = 16$, 4 per treatment) treated with glutamate (GG), testosterone (GT), glutamate + testosterone (GGT) and saline solution (GC) during the traditional male reproductive resting season and the female anestrus season (Spring) under natural photoperiod at 26° north latitude.

a,b,c = values with different literal in the same row differ ($P < 0.05$).

through interactions with GnRH cells in the MPOA, which, in turn, affect the LH release in the anterior pituitary [11,13].

On the other hand, the GGT-treatment caused an increased sexual behavior, suggesting a possible synergistic glutamate + testosterone interaction potentiating the expression of sexual behavior. Certainly, glutamate activates brain areas related to sexual behavior such as the medial amygdala (MEA) and the bed nucleus of stria terminal (BNST) where there are also testosterone receptors. Such scenario suggests that activation of testosterone receptors may help to sensitize androgen stimulation improving the expression of sexual behavior [12,40]. Indeed, testosterone may possibly facilitate sexual behavior, at least in part, because of an increased activation of glutamate releasing neurons, due to an up-regulation of those glutamate receptors located in the MPOA, increasing the interaction of endocrine signals that facilitate sexual behavior expression [12,35].

Nevertheless, another possible synergistic effect of the GGT-treatment probably occurred after aromatization of testosterone to estradiol, since the linkage of estradiol to its ER α receptors subsequently activates the enzyme P13 kinase, promoting the release of glutamate. Additionally, the GGT-treatment may have possibly helped to reduce the sensitivity to the action of the negative feedback of testosterone upon LH, influencing the activity of glutamate, or through an up-regulation in the testicular endocrine function to stimulate sexual behavior [12].

Regarding the results observed in the GT-group, the applied dose of testosterone (25 mg) may not have been enough to trigger a better sexual behavior. On this respect, previous results of our group have demonstrated that sexually inactive male goats receiving 50 mg of testosterone during 3 weeks showed an increased sexual activity [41]. In addition, in male goats, it has been confirmed the effectiveness of intramuscular testosterone in the increase sexual behavior during the non-breeding season [42]. Hence, a different-driven specie response between rams and bucks cannot be discarded. Moreover, administration of exogenous testosterone in castrated animals restored the sexual behavior in rams [24,43]. These results suggest that, in castrated animals and during the season of sexual arrest, testosterone may stimulate specific brain structures involved in the male sexual desire, increasing the libido. However, the rams used in our study may have faced a non-profound reproductive seasonality, so the testosterone treatment did not increase the expression of sexual behavior; these findings are in line with the arguments previously reported [24]. Therefore, a possible explanation for the response of the GC-rams that sowed greater ASB and CSB performance regarding the GT-rams is that in the GC-rams, the sexual arrest was not quite significant, exerting certain sexual behaviors which were enough to provoke a sexual response once exposed to the anovulatory ewes. In addition, previous research evaluating the temporal expression of reproductive activity has classified to the Dorper breed as a genotype with a reduced reproductive seasonality [44]. Besides, the seasonal variation in reproductive behavior observed in sheep production, tends to decrease in a linear way once associated with the degree of domestication and intensive reproduction [45,46].

With respect to the ewe's reproductive outcomes, a fact that confirms the above statements are the enlarged reproductive outcomes shown by the nulliparous ewes exposed to male effect. The obtained reproductive outcomes shown by the most ewes of this study, was probably because the rams from all experimental groups exerted an adequate sexual stimuli from a behavioral view point, triggering both endocrine and sexual responses in the previously anovulatory-nulliparous Dorper ewes. Certainly, the presence of rams increase the tonic LH secretion of the anestrus ewes promoting both estrous response and ovulation within hours or few days after male exposure [47]. In our study, the groups of ewes

exposed to the GG and GGT rams achieved a higher ovulatory activity (100%) with respect to both the control and the testosterone groups (<77.5%), denoting a positive effect of the male effect exerted by the GG and GGT groups.

This high reproductive response observed in these females, could be due to three factors: First, the ewes used in this research were in a shallow anestrus, showing low sensitivity to the inhibitory effects exerted by estradiol during the anestrus season [47]. In the Dorper breed, it has been observed a quite short anestrus period, from one to three months, a scenario that suggests the presence of a non-profound shallow anestrus [44,48]. The last has been associated with a high LH pulse frequency, denoting a poor response to the negative feedback of estradiol, generating in turn, a positive response of these ewes to the male stimulus [47,49]. Second, Dorper rams have been defined as non-very seasonal from a reproductive point of view, therefore, the sexual behavior exerted by these rams should have been enough to induce sexual and reproductive activity of ewes. Third, considering that the ewes used in this study were bred under an intensive production system, a good nutritional level is another key factor that could favorably influence the functionality of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis where some brain areas have nutritional sensors to link and align nutritional status and reproductive function [50]. Certainly, well-nourished females are more sexually responsive to males than underfed ewes [51]. Moreover, cyclic ewes with low food intake and poor body condition can increase the hypothalamic sensitivity to the negative feedback of estradiol [52].

On the other hand, ewes exposed to the GG and GGT males showed a shorter onset of estrus with respect to those ewes exposed to the GT and GC males, a scenario that could be explained because of a more intense sexual behavior, (i.e. increased libido), generating an enlarged stimulation in the exposed females, reducing the onset of estrus regarding to the GG and GGT males. Indeed, previous reports state that the response of ewes to the male effect is influenced by the intensity of sexual behavior emitted by the rams [53,54]. Our results emphasize the importance of the manifestation of an intense sexual activity of males which is a critical point to achieve a rapid and effective sexual stimulation in the anovulatory females [55].

Moreover, the GGT-rams had the highest odor intensity regarding the other groups, a crucial issue in that the ewe's perception of the ram effect is mainly exerted throughout olfactory cues [56]. Previous studies have highlighted that the smell of a sexually active male stimulates the GnRH neurons in anovulatory ewes, inducing a rapid increase in the secretion of LH and, in turn, the ovulatory response both in sheep and goats [57,58]. From these studies, is clear that, from the several sensory stimuli emitted by rams in order to provoke a neuro-endocrine response in the anovulatory ewes, the olfactory stimulation undoubtedly plays a central role.

This is the first report that unveils an interesting and promising role of glutamate + testosterone as a modulating molecules involved in the induction of male sexual behavior considering to the ram as animal model. While the GG and GGT treatments generated encouraging sexual behaviors in males and increased reproductive outcomes in those females exposed to such GG and GGT males, our results are also thought-provoking from a comparative sexual behavior perspective in that may embrace potential important translational applications.

5. Conclusions

The administration of intramuscular glutamate or glutamate + testosterone to Dorper rams facing increased photoperiods during the natural season of male reproductive arrest,

enhanced both the appetitive and consummatory sexual behavior of males. In turn, these treated rams elicited not only a faster estrus response of previously anovulatory ewes but also increased ovulation, total number corpus luteum, ovulation rate and pregnancy rate once these ewes were exposed to these active-treated males.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgement

We recognize the support for the International Collaborative Project ALFA-III-ALAS/ALFA-III-82, supported by the European Union. GCL is a double-degree doctoral student from the Graduate Programs at the UAAAN-UL, Mexico and the UCO, Spain. GCL was supported by a CONACYT-Scholarship Grant, CVU-383468. (In loving memory, Dr. Nissim Silanikove, 1950–2017).

References

- [1] Sarlós P, Egerszegi I, Balogh O, Molnár A, Cseh S, Rátky J. Seasonal changes of scrotal circumference, blood plasma testosterone concentration and semen characteristics in Racka rams. *Small Rumin Res* 2013;111:90–5.
- [2] Roselli CE, Larkin K, Schrank JM, Stormshak F. Sexual partner preference, hypothalamic morphology and aromatase in rams. *Physiol Behav* 2004;83:233–45.
- [3] Migaud M, Butrille L, Batailler M. Seasonal regulation of structural plasticity and neurogenesis in the adult mammalian brain: focus on the sheep hypothalamus. *Front Neuroendocr* 2015;37:146–57.
- [4] Lincoln GA. Reproductive seasonality and maturation throughout the complete life-cycle in the mouflon ram (*Ovis montanus*). *Anim Reprod Sci* 1998;53:87–95.
- [5] Bustos OE, Torres-Díaz L. Reproducción estacional en el macho. *Int J Morphol* 2012;30:1266–79.
- [6] Nowakowski P, Owikla A. Seasonal variation in testes size in Polish merino rams and its relationship to reproductive performance in spring. *Theriogenology* 1994;42:613–22.
- [7] Land RB. The expression of female sex-limited characters in the male. *Nature* 1973;241:208–9.
- [8] Polat H, Gürsel D, Ilkay B, Erkan P. Annual change of the testosterone hormone in male White Goats. *Agr Sci China* 2011;10:312–6.
- [9] Andersen ML, Alvarenga TF, Mazarro-Costa R, Hachul HC, Tufik S. The association of testosterone, sleep, and sexual function in men and women. *Brain Res* 2011;1416:80–104.
- [10] Brann DW, Mahesh VB. Excitatory amino acids: evidence for a role in the control of reproduction and anterior pituitary hormone secretion. *Endocr Rev* 1997;18:678–700.
- [11] Meza-Herrera CA. Puberty, kisspeptin, and glutamate: a ceaseless golden braid. In: Benhardt LV, editor. *Advances in medicine and biology*. New York: Nova Science Publishers Inc; 2012. p. 97–124.
- [12] Domínguez JM. A role for preoptic glutamate in the regulation of male reproductive behavior. *Neuroscientist* 2009;15:11–9.
- [13] Will RG, Hull EM, Domínguez JM. Influences of dopamine and glutamate in the medial preoptic area on male sexual behavior. *Pharmacol Biochem Behav* 2014;121:115–23.
- [14] Meza-Herrera CA, Torres-Moreno M, Lopez-Medrano JL, Gonzalez-Bulnes A, Veliz-PG, Mellado M, et al. Glutamate supply positively affects serum release of triiodothyronine and insulin across time without increases of glucose during the onset of puberty in the female goat. *Anim Reprod Sci* 2011;125:74–80.
- [15] FASS. Guide for the care and use of agricultural animals in agricultural research and teaching, third ed. Savoy, IL, USA: Federation Animal Science Society; 2010.
- [16] NAM. Guide for the care and use of laboratory animals. 1st Edition. Harlan Mexico, DE, Mexico: Co-produced by the National Academy of Medicine-Mexico and the Association for assessment and accreditation of laboratory animal care international; 2002.
- [17] Russel A. Body condition scoring of sheep. *Pract* 1984;6:91–3.
- [18] Braun WF, Thompson JM, Ross CV. Ram scrotal circumference measurements. *Theriogenology* 1980;13:221–9.
- [19] Walkden-Brown SW, Restall BJ, Norton BW, Scaramuzzi RJ, Martin GB. Effect of nutrition on seasonal patterns of LH, PSH and testosterone concentration, testicular mass, sebaceous gland, volume and odour in Australian Cashmere goats. *J Reprod Fertil* 1994;102:351–60.
- [20] Berman G, Clegg MT, Beamer W. Copulatory Behaviour of the ram, *Ovis aries*. I: a normative study. *Anim Behav* 1969;17:700–5.
- [21] Price BD. Practical considerations in the measurement of sexual behavior.

- Methods Neurosci 1993;14:16–31.
- [22] Odagiri K, Matsuzawa Y, Yoshikawa Y. Analysis of sexual behavior in rams (*Ovis aries*). *Exp Anim Tokyo* 1995;44:187–92.
- [23] Maina D, Katz LS. Scent of a ewe: transmission of a social cue by conspecifics affects sexual performance in a male sheep. *Biol Reprod* 1999;60:1373–7.
- [24] Perkins A, Roselli CE. The ram: a model for behavioral neuroendocrinology. *Horm Behav* 2007;52:70–7.
- [25] Ball GF, Balthazart J. How useful is the appetitive and consummatory distinction for our understanding of the neuroendocrine control of sexual behavior? *Horm Behav* 2008;53:307–18.
- [26] Delgado JA, Ungerfeld R, Flores JA, Hernandez H, Fitz-Rodríguez G. The ovulatory response of anoestrous goats exposed to the male effect in the subtropics is unrelated to their follicular diameter at male exposure. *Reprod Domest Anim* 2011;46(4):687–91.
- [27] Tejada LM, Meza-Herrera CA, Rivas-Muñoz R, Rodríguez-Martínez R, Carrillo E, Mellado M, et al. Appetitive and consummatory sexual behaviors of rams treated with exogenous testosterone and exposed to anoestrous Dorper ewes: efficacy of the male effect. *Arch Sex Behav* 2017;46(3):835–42.
- [28] Ramírez S, Bedos M, Chasles M, Hernández H, Flores JA, Vielma J, et al. Fifteen minutes of daily contact with sexually active male induces ovulation but delays its timing in seasonally anoestrous goats. *Theriogenology* 2017;87:148–53.
- [29] Tejada LM, Rivas R, Ángel O, González H, Rodríguez R, Veliz FG. Evaluación de progesterona intravulvar o esponjas vaginales sobre la actividad reproductiva de las ovejas Dorper anoovulatorias del Norte de México. In: XXIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias del 6 al 9 de octubre del; 2014 [La Habana, Cuba].
- [30] Rodríguez-Martínez R, Meza-Herrera CA, Tapia-Robles KL, Alvarado-Espino AS, Luna-Orozco JR, Leyva C, et al. Effect of two routes of administration of human chorionic gonadotropin upon oestrus induction and reproductive outcomes in adult acyclic mix-breed goats. *J Appl Anim Res* 2017;3(3):1–5.
- [31] Perkins A, Roselli CE. The ram as a model for behavioral neuroendocrinology. *Horm Behav* 2007;52:70–7.
- [32] Vintoes C, Meikle A, Forsberg M. Accuracy of evaluation of ovarian structures by transrectal ultrasonography in ewes. *Anim Reprod Sci* 2004;80(1):69–79.
- [33] Balthazart J, Surlemont C. Copulatory behavior is controlled by the sexually dimorphic nucleus of the quail POA. *Brain Res Bull* 1990;25:7–14.
- [34] Balthazart J, Ball GF. Is brain estradiol a hormone or a neurotransmitter? *Trends Neurosci* 2006;29:241–9.
- [35] Brann DW, Mahesh VB. Excitatory amino acid neurotransmission, evidence for a role in neuroendocrine regulation. *Trends Endocrinol Metab* 1992;3:122–6.
- [36] Dominguez JM, Gil M, Hull EM. Preoptic Glutamate Facilitates Male Sex Behav. *J Neurosci* 2006;26:1699–703.
- [37] Dhandapani KM, Brann DW. The role of glutamate and nitric oxide in the reproductive neuroendocrine system. *Biochem Cell Biol* 2000;78:165–79.
- [38] Olney JW, Cicero TJ, Meyer E, DeGubareff T. Acute glutamate-induced elevations in serum testosterone and luteinizing hormone. *Brain Res* 1976;112:420–4.
- [39] Mahesh VB, Brann D. Regulatory role of excitatory amino acids in reproduction. *Endocrine* 2005;28:271–80.
- [40] Simerly RB, Chang C, Muramatsu M, Swanson LW. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an *in situ* hybridization study. *J Comp Neurol* 1990;294:76–95.
- [41] Luna-Orozco JR, Gillen-Muñoz JM, De Santiago-Miramontes MA, García E, Rodríguez-Martínez R, Meza-Herrera CA, et al. Influence of sexually inactive bucks subjected to long photoperiod or testosterone on the induction of estrus in anoovulatory goats. *Trop Anim Health Prod* 2012;44:71–5.
- [42] Ángel-García O, Meza-Herrera CA, Guillen-Muñoz JM, Carrillo-Castellanos E, Luna-Orozco JR, Mellado M, et al. Seminal characteristics, libido and serum testosterone concentrations in mixed-breed goat bucks receiving testosterone during the non-breeding period. *J Appl Anim Res* 2014;43:457–61.
- [43] Orihuela TA. The sexual behavior of ram: a review. *Rev Mex Gen Pec* 2014;5:49–89.
- [44] Cloete SWP, Snyman MA, Herselman MJ. Productive performance of Dorper sheep. *Small Rumin Res* 2000;36:119–35.
- [45] Lincoln GA, Lincoln CE, McNeilly AS. Seasonal cycles in the blood plasma concentration of FSH, inhibin and testosterone, and testicular size in rams of wild, feral and domesticated breeds of sheep. *J Reprod Fertil* 1990;88:623–33.
- [46] Chemineau P, Pellicer-Rubio MT, Lassoued N, Khaldi G, Monniaux D. Male-induced short oestrus and ovarian cycles in sheep and goats: a working hypothesis. *Reprod Nutr Dev* 2006;46:417–29.
- [47] Martin GB, Oldham CM, Cognié Y, Pearce DF. The physiological responses of anoovulatory ewes to the introduction of rams. *Liv Prod Sci* 1986;15:219–47.
- [48] Joubert DM. Sex behaviour of purebred and crossbred merino and blackhead Persian ewes. *J Reprod Fertil* 1962;3:41–9.
- [49] Rosa HJD, Bryant MJ. The "ram effect" as a way of modifying the reproductive activity in the ewe. *Small Rumin Res* 2002;45:1–16.
- [50] Dupont J, Reverchon M, Bertoldo M, Froment P. Nutritional signals and reproduction. *Mol Cell Endocrinol* 2014;382:527–37.
- [51] Scaramuzzi RJ, Martin GB. The importance of interactions among nutrition, seasonality and sociosexual factors in the development of hormone-free methods for controlling fertility. *Reprod Domest Anim* 2008;43:129–36.
- [52] Rhind SM, Bass J, Doney JM, Hunter EA. Effect of litter size on the milk production, blood metabolite profiles and endocrine status of ewes lambing in January and April. *Anim Prod* 1991;53:71–80.
- [53] Martínez-Alfaro JC, Hernández H, Flores JA, Duarte G, Fitz-Rodríguez G, Fernández IG, et al. Importance of intense male sexual behavior for inducing the preovulatory LH surge and ovulation in seasonally anoovulatory female goats. *Theriogenology* 2014;82:1028–35.
- [54] Abecia JA, Chemineau P, Flores JA, Keller M, Duarte G, Forcada F, et al. Continuous exposure to sexually active rams extends estrus activity in the ewes in spring. *Theriogenology* 2015;84:1549–55.
- [55] Flores JA, Veliz FG, Pérez-Villanueva JA, Martínez de la Escalera G, Chemineau P, Poindron P, et al. Male reproductive condition is the limiting factor of efficiency in the male effect during seasonal anoestrus in female goats. *Biol Reprod* 2000;62:1409–14.
- [56] Chanvallon A, Fabre-Nys C. In sexually naive anoestrous ewes, male odour is unable to induce a complete activation of olfactory systems. *Behav Brain Res* 2009;205:272–9.
- [57] Okamura H, Murata K, Sakamoto K, Wakabayashi Y, Ohkura S, Takeuchi Y, et al. Male effect pheromone tickles the gonadotrophin-releasing hormone pulse generator. *J Neuroendocrinol* 2010;22:825–32.
- [58] Fabre-Nys C, Kendrick KM, Scaramuzzi RJ. The "ram effect": new insights into neural modulation of the gonadotropic axis by male odors and socio-sexual interactions. *Front Neurosci* 2015;9:1–16.



Efecto de la administración de glutamato y/o testosterona sobre el comportamiento sexual apetitivo y consumatorio en carneros y su influencia sobre el comportamiento reproductivo de ovejas nulíparas anovulatorias

Effect of glutamate and/or testosterone administration upon appetitive and consummatory sexual behaviors in rams and their influence upon the reproductive performance of nulliparous anovulatory ewes

Calderon-Leyva G., Meza-Herrera C.A., Rodriguez-Martinez R., Rivas-Muñoz R., Delgado-Bermejo J.V., Veliz-Deras F.G. Effect of glutamate and/or testosterone administration upon appetitive and consummatory sexual behaviors in rams and their influence upon the reproductive performance of nulliparous anovulatory ewes. *Hormones and Behavior* 2017.

Manuscript Details

Manuscript number	HB_2017_327
Title	Effect of glutamate and/or testosterone administration upon appetitive and consummatory sexual behaviors in rams and their influence upon the reproductive performance of nulliparous anovulatory ewes.
Article type	Research paper

Abstract

We tested if glutamate and/or testosterone administration to Dorper rams would increase their sexual behavior and, thereafter, evaluate their ability to induce the sexual response of nulliparous-anestrous ewes. In late March, young Dorper rams were distributed in four groups receiving i.v. treatments of: 1). GG; 7 mg kg⁻¹ live weight (LW) of glutamate (every 3d x 28d), 2). GT; 1 ml of saline (every 3d x 15d) and then 25 mg of testosterone (every 3d x 15d), 3). GGT; 7 mg kg⁻¹ LW of glutamate (every 3d x 28d) + 25 mg testosterone (every 3d x 15d) and 4). GC; 1 ml of saline (every 3d x 28d). Thereafter, nulliparous-anestrous Dorper ewes were exposed to these treated males. Upon male-to-female contact, a sexual behavioral test (2d x 2h) was conducted to evaluate the frequencies for appetitive (ASB) and consummatory (CSB) sexual behaviors and indicators of sexual rest (ISR). Thereafter, the female reproductive performance (Interval to estrus onset, estrus response, ovulation response, ovulation rate and pregnancy rate) was quantified. Results of this study indicate that the sexual behavior of young Dorper rams can be improved by frequent treatments with glutamate plus testosterone. In addition, the out-of-season stimulus provided by these treated rams induced estrus and promoted important reproductive outcomes in nulliparous Dorper ewes throughout the male effect. Whereas the GGT treatment generated encouraging sexual and reproductive outcomes, our results are also thought-provoking from a comparative sexual behavior perspective while may embrace potential translational applications.

Keywords	anestrous season; Dorper sheep; glutamate; testosterone; sexual behavior; reproductive performance
Corresponding Author	Cesar A. Meza-Herrera
Corresponding Author's Institution	Universidad Autonoma Chapingo
Order of Authors	G. Calderon-Leyva, Cesar A. Meza-Herrera, R. Rodriguez-Martinez, R. Rivas-Muñoz, J.V. Delgado-Bermejo, F.G. Veliz-Deras
Suggested reviewers	Rami Kridli, Cesar Rosales Nieto

Submission Files Included in this PDF

File Name [File Type]

2017.HB.Calderon-Leyva-article-2-cover letter-1.docx [Cover Letter]

2017.HB.Calderon-Leyva-highlights-1.docx [Highlights]

2017.HB.Calderon-Leyva-article-2.manuscript.ver-1.docx [Manuscript File]

2017.HB.Calderon-Leyva-article-2-figures-1.docx [Figure]

2017.HB.Calderon-Leyva-article-2-tables-1.docx [Figure]

2017.HB.Calderon-Leyva-ethical statement-1.docx [Figure]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.

Research Data Related to this Submission

There are no linked research data sets for this submission. The following reason is given:
Data will be made available on request

1 **Effect of glutamate and/or testosterone administration upon appetitive and consummatory**
2 **sexual behaviors in rams and their influence upon the reproductive performance of nulliparous**
3 **anovulatory ewes**

4
5 Guadalupe Calderón-Leyva^{a,d}, Cesar A. Meza-Herrera^{b,*}, Rafael Rodríguez-Martínez^a,
6 Oscar Ángel-García^a, Raymundo Rivas-Muñoz^c, Juan V. Delgado-Bermejo^d,
7 Francisco G. Véliz-Deras^a,

8
9 *^a Agriculture and Livestock Graduate Program, Antonio Narro Agricultural Autonomous University,*
10 *Torreon, Mexico.*

11 *^b Regional University Unit on Arid Lands, Chapingo Autonomous University, Bermejillo, Durango,*
12 *Mexico.*

13 *^c Technology Institute of Torreon, Torreon, Coahuila, México*

14 *^d Department of Genetics, University of Cordoba, Cordoba, Spain.*

15

16 * Corresponding author at:

17 Environmental Animal Physiology, Graduate Program, UACH-URUZA

18 Galeana 585 Pte. Ciudad Lerdo, Durango, México. 35150.

19 E-mail: cmeza2020@hotmail.com & cmeza2000@gmail.com

20

21

22

23

24 **Effect of glutamate and/or testosterone administration upon appetitive and consummatory**
25 **sexual behaviors in rams and their influence upon the reproductive performance of nulliparous**
26 **anovulatory ewes**

27

28 Guadalupe Calderón-Leyva^{a,d}, Cesar A. Meza-Herrera^{b,*}, Rafael Rodríguez-Martínez^a,
29 Oscar Ángel-García^a, Raymundo Rivas-Muñoz^c, Juan V. Delgado-Bermejo^d,
30 Francisco G. Véliz-Deras^a,

31

32 *^a Agriculture and Livestock Graduate Program, Antonio Narro Agricultural Autonomous University,*
33 *Torreon, Mexico.*

34 *^b Regional University Unit on Arid Lands, Chapingo Autonomous University, Bermejillo, Durango,*
35 *Mexico.*

36 *^c Technology Institute of Torreon, Torreon, Coahuila, México*

37 *^d Department of Genetics, University of Córdoba, Córdoba, Spain.*

38

39 * Corresponding author at:

40 Environmental Animal Physiology, Graduate Program, UACH-URUZA

41 Galeana 585 Pte. Ciudad Lerdo, Durango, México. 35150.

42 E-mail: cmeza2020@hotmail.com & cmeza2000@gmail.com

43

44

45

46

71 **1. Introduction**

72 In small ruminants, mainly under temperate and subtropical conditions, a seasonal pattern of
73 reproductive function has been reported, being more accentuated as genotypes originate from northern
74 latitudes (Goodman et al., 2010). Such reproductive behavior, generates a defined pattern of ovarian
75 activity with most ovulatory cycles occurring in the autumn and winter (breeding season) and a resting
76 reproductive period during spring and summer (anestrous season) (Goodman et al., 2010; Fabre-Nys
77 et al., 2016). One of the main strategies to counter this paucity in the reproductive activity (Menassol
78 et al., 2012; Abecia et al., 2015) is the introduction of a sexually active males to the female's herd
79 (Hawken and Martin 2012; Fabre-Nys et al., 2015).

80 However, the endocrine response of anestrus ewes to the exposure to males depends on the
81 intensity and quality of the ram stimulus upon the anestrous females (Veliz et al., 2006; Ungerfeld et
82 al., 2014). According to Perkins and Fitzgerald (1994), a large percentage of anestrous ewes exposed
83 to rams with high libido do ovulated (95%) regarding rams with low libido (78%). Recently, Tejada et
84 al., (2017) reported that Dorper rams treated with exogenous testosterone increased both the appetitive
85 and consummatory sexual behaviors when exposed to anovulatory ewes during the anestrous season.
86 Interestingly, they also reported increases in estrus activity, up to 85%, as well as an augmented
87 ovulation percentage, up to 80%, once the anestrus ewes were exposed to these rams which were
88 previously exposed to the "female effect".

89 In males, glutamate, the main neurotransmitter in the central nervous system, participates in
90 the expression of sexual behavior because of its action upon GnRH neurons (Iremonger et al., 2010;
91 Meza-Herrera, 2012). This interesting excitatory amino acid, increases the neural activity that
92 facilitates penis erection and mating behavior (Melis et al., 2004) not only in male rats (Olney et al.,
93 1976; Dominguez et al., 2006; Li et al., 2013) but in hamsters (Ebling et al., 1998). In addition, in
94 mice, after two hours of being treated subcutaneously with glutamate, the baseline serum testosterone

95 levels increased from about 1 ng/ml to 4 ng/ml in 3 h, and to 5 ng/ml in 6 h (Olney et al., 1976).
96 Building in these previous findings, we tested the hypothesis that frequent treatments with glutamate
97 and/or testosterone in young Dorper rams would increase their sexual behavior, and if these treated
98 rams would be able, in turn, to induce a reactivation of the ovarian function thru the “male effect” in
99 nulliparous-anestrous Dorper ewes during the anestrous season.

100 **2. Materials and methods**

101 *2.1. General*

102 All the methods and management of the experimental units used in this study were in strict
103 accordance with accepted guidelines for ethical use, care and welfare of animals in research at
104 international (FASS, 2010) and national (NAM, 2002) levels, with institutional approval reference
105 number UAAAN-UL/14-510-400-2.

106 *2.2. Location, environmental conditions animals and management*

107 The research was conducted from April to June, in northern Mexico (Coahuila; 25° 64' LN and
108 103° 26' LO, 1,120 m. altitude) under natural light conditions. During the period of the study, the mean
109 annual rainfall and mean annual temperature were 258 mm and 24°C, respectively, with maximum
110 and minimum temperatures of 41 °C and -1 °C (summer and winter, respectively). Dorper rams and
111 ewes were raised and maintained in a special production unit linked to a Holstein Dairy Cow intensive
112 production system. The animals were fed twice a day (1200 & 1800); the diet was based on 60%
113 sorghum silage and 40% concentrate (14% CP), and a mixture of macro-minerals. The animals had *ad*
114 *libitum* access the food, clean water, mineral salts and shades. The health status of all the experimental
115 units was supervised by an experienced veterinarian during the whole experimental period. Besides,
116 efforts were made to minimize any possible discomfort in the experimental units.

117

118 2.3. *Rams*

119 Pubertal rams (n=20; 11 mo. old) were homogeneously distributed in terms of live weight
120 (LW), body condition score (BCS) and scrotal circumference (SC); LW=55±0.9 kg, BCS=3.2±0.10
121 units, SC=30±0.38 cm; respectively, in four groups (n = 5 each). On March 26, each group received
122 one of the following i.v. treatments: 1). GG; 7 mg kg⁻¹ LW of Glutamate (every 3d x 28d), 2). GT; 1
123 ml of saline every 3 days for 15 days and then 25 mg of testosterone propionate every third day for 15
124 days, 3). GGT; 7 mg kg⁻¹ LW of Glutamate (every 3d x 28d) + 25 mg testosterone propionate (every
125 3d x 15d) and 4). GC; 1 ml of physiological saline solution (every 3d x 28d).

126 2.4. *Ewes*

127 Nulliparous Dorper ewes (n=129; 7-8 mo.) underwent two transrectal ultrasounds to evaluate
128 the status of the ovary (Tejada et al., 2017); ultrasound was performed on days 14 and 7 prior to mating.
129 While 100 ewe (77.5%) of the original population were confirmed in in anovulatory status, 29 ewes
130 (22.5%) were found to have luteal bodies, so they were considered cyclical an eliminated from the
131 study. Once the anovulation status was confirmed, a total of 82 ewes were randomly selected and were
132 completely isolated from the rams contact. These ewes were injected with 60 mg of progesterone i.m.
133 (20 mg on days 6, 4 and 2 before to be exposed to the treated males) in order to avoid the short cycles
134 and that the first ovulation was accompanied by estrus (Chemineau et al., 2006).

135 2.5. *In search of the male effect*

136 The ewes were divided into four homogeneous groups in terms of weight and body condition
137 (42.2±2.3 kg and 3±0.09 units; respectively) 24 h before putting them in contact with the rams and
138 were placed in separate pens (4 x 3 m) at a distance of more than 100 m. On day 0 after the treatment
139 period of the rams (April 26), in each group of ewes were introduced 4 rams belonging to the same
140 treatment which were rotated two by two every 24 h x 20d.

141

189 Figure 2 and Table 2. No differences ($p > 0.05$) among treatments were observed regarding estrus
190 response, ovulation response, and ovulation rate (general averages: 16 ± 0.4 , 19.5 ± 0.25 and 1.25 ± 0.04 ;
191 respectively) during the entire experimental period (d0 to d20). However, the interval to estrus onset
192 did not differ ($p > 0.05$) among treatments during the first 10 days of exposure to males (general
193 average 47.8 ± 3 h). Yet, this trend changed during the following 10 days (d11 to d20; $p < 0.05$),
194 observing the largest interval to estrus onset in those ewes exposed to GC and GG rams (385 ± 7 and
195 370 ± 12 h; respectively). The shortest estrus onset was observed in those ewes exposed to the GT and
196 GGT rams (352 ± 6 , 359 ± 8 ; respectively), with no differences among GG, GT and GGT ($p > 0.05$). The
197 largest pregnancy rate was observed in the GGT group, followed by the GT, GC and GG groups (17%,
198 16%, 16% and 15%; respectively), with no statistical differences ($p > 0.05$).

199 **“INSERT FIGURE 2 AND TABLE 1 HERE”**

200 The cumulative percentage of sheep that presented estrus during the sampling period (every 12
201 hours during the 20 days) is presented in Figure 3. The expression of the estrus response in the ewes
202 of the GGT group was constantly higher than the groups GG, GT and GC, however, only significant
203 differences were found between the GGT and the GC group ($p < 0.05$).

204 **“INSERT FIGURE 3 HERE”**

205 **4. Discussion**

206 Based on our working hypothesis, the central inquiries we sought to answer in this study were:
207 1). Do the intravenous administration of glutamate, testosterone or both will induce both appetitive
208 and consummatory sexual behaviors of young Dorper rams during the natural sexual resting season?,
209 2). Does glutamate and testosterone would act in a synergic fashion to enhance such sexual behaviors?
210 3). These treated young rams would be able to induce, throughout the “male effect”, the reactivation
211 of ovarian function of anestrus-acyclic Dorper ewes?. In regard to the first question, our results
212 demonstrate that frequent treatments with glutamate plus testosterone in young Dorper rams increased

213 both the appetitive and consummatory sexual frequencies. Since such increased sexual behavior was
214 notably observed in the GGT group, this upshot denotes a possible synergistic action of glutamate +
215 testosterone, providing elements to answer the second query. With respect to the third inquire, the
216 treated males were able to induce reactivation of ovarian function throughout the stimulus of the “male
217 effect”. Therefore, these treated GGT-rams can be an attractive alternative to reduce the estrus paucity
218 in anovulatory ewes through the male effect.

219 In the present study, the sexual behavior of the GGT rams was not only 17% superior to the
220 control group but also 13% greater when adding the CSB & CSC sexual frequency behaviors regarding
221 the control group. Simultaneously, Dorper ewes exposed to these GGT-rams had respective increases
222 of 13% and 5% in estrus and ovulatory responses with respect to those ewes exposed to the control-
223 rams. These encouraging sexual responses of those females exposed to GGT-rams can be attributed to
224 the enhanced sexual behavior performed by these rams. In fact, previous studies state that the number
225 of females responding to the male effect is strongly influenced by the intensity of sexual behavior and
226 the quality of the stimulatory signals provided by males such as pheromones, in addition to a
227 combination of visual and tactile signals (Perkins and Fitzgerald, 1994; Pellicer-Rubio et al., 2013;
228 Martínez-Alfaro et al., 2014; Orihuela, 2014). Interestingly, more than 50% of ewes exposed to GGT
229 rams exhibited standing estrus during the first 96 h compared to GG, GT and GC (Fig. 3). This could
230 be due to the socio-sexual interaction between rams and ewes, a scenario that may had diminish the
231 negative feedback of steroids responsible for the state of anestrus, promoting in turn, a positive
232 stimulus upon the GnRH secretion and reactivating the reproductive cycle in a sooner fashion (Fabre-
233 Nys et al., 2015). Therefore, the observed results backing to the GGT group, suggest a synergistic
234 action of glutamate plus testosterone, and not necessarily to the individual action of either glutamate
235 or testosterone alone.

236 Hence, the obtained results in the present work provides evidence that glutamate potentiates its
237 effect upon sexual behavior in the treated males when exogenous testosterone is added. The above can

238 be explained by the existence of the hormone-glutamate interaction that may reflect bidirectional
239 influences in that some hormones regulate glutamate activity and glutamate also regulates endocrine
240 function by stimulating sexual behavior (Estienne, 2000; Dominguez, 2009). Certainly, since
241 glutamate receptors are located in a myriad of hypothalamic nuclei (Durand et al., 2008; Meza-Herrera
242 et al., 2014) this excitatory amino acid may have acted upon the GnRH neurons (Iremonger et al., 2010)
243 which are responsible to initiate the hormonal cascade that leads to the hormone synthesis by the testes
244 (Hull and Dominguez, 2006; Will et al., 2014).

245 Besides, the administration of glutamate may have acted also in an indirect fashion, by
246 promoting the activation of the androgen receptors, and in turn, stimulate copulatory behaviors (Will
247 et al., 2014). In rodents, glutamate has shown to elicit sexual behaviors such as erection and ultrasonic
248 vocalizations that occur during mating and facilitates socio-sexual contact (Brudzynski and Pniak,
249 2002; Fu and Brudzynski, 1994). In addition, glutamate has been involved in the expression of
250 copulation behaviors (Ebling et al., 1998; Melis et al., 2004; Dominguez et al., 2006; Li et al., 2013).
251 Furthermore, in many species, the activation of male copulatory behaviors seem to depend on the
252 central aromatization of testosterone. Certainly, it has previously shown that the aromatase activity is
253 present in some brain areas that control the male sexual behavior while the enzymatic activity along
254 the steroidogenic pathway seems to be regulated by testosterone (Balthazart and Foidart, 1993).

255 According to other studies, glutamate indirectly influences the expression of sexual behavior,
256 specifically at brain level in the medial preoptic area, by modulating the male's sexual behavior through
257 its effect upon dopamine action; indeed, testosterone is required to maintain basal dopamine levels in
258 order to increase copulatory ability (Dominguez and Hull, 2005; Mahesh and Brann, 2005; Will et al.,
259 2014). On the other hand, rams treated only with testosterone had 42% more indicators of sexual rest.
260 A possible response to such endocrine scenario is that when applying exogenous testosterone, the
261 negative feedback system diminished the production of this hormone and, as a result, a reduction in
262 the libido expression was motivated, decreasing its ability to express sexual behavior (Henley et al.,

263 2010; Bustos et al., 2012). Finally, although the ewes were treated with 20 mg i.m. of progesterone to
264 eliminate the presence of short cycles once exposed to males, silent ovulations were not completely
265 abolished, suggesting that with the aim of observe an evident standing estrus, a greater level of
266 progesterone should be applied to block the synthesis of prostaglandins, thus affecting luteolysis
267 (Chemineau et al., 2006).

268 Our study, seems to be the first report that demonstrate that sexual behavior of young Dorper
269 rams can be improved throughout i.v. administration of glutamate + testosterone (GGT), since we are
270 not aware of any previous study scrutinizing such possibility. Subsequently, such GGT treated males
271 were able to promote encouraging reproductive outcomes from those previously anestrus-acyclic
272 Dorper ewes throughout the male effect. Therefore, our study unveils a possible synergistic stimulus
273 provided by the administration of glutamate + testosterone upon both the sexual behavior and
274 performance of the anestrous ewes once exposed to these treated rams. Such socio-sexual response can
275 be an important reproductive alternative to induce reactivation of the ovarian response of acyclic ewes
276 not only under out-of-season scenarios but also in a shorter period of time. Whereas the GGT treatment
277 generated encouraging sexual and reproductive outcomes, our main outcomes are also thought-
278 provoking from a comparative sexual behavior perspective while may embrace potential translational
279 applications.

280 **Contributors**

281 CAMH, GCL & FGVD conceived and designed the experiments, GCL, OAG & RRM performed the
282 experiments, CAMH, FGVD, JVRB & OAG contributed reagents, material and analysis tools, CAMH,
283 GCL & FGVD analyzed data and wrote the paper. All authors have participated in the critical revision
284 of the manuscript and approved of the final version.

285 **Acknowledgments**

286 The authors are thankful to the National Council of Science and Technology (CONACYT-
287 Mexico) for the scholarship granted to the first author to obtain her Doctoral degree. Appreciation is

288 also expressed to the Universidad de Cordoba, Spain which also supported to the first author in order
289 to get the double doctoral degree (UCO Spain & UAAAN Mexico). We also acknowledge the technical
290 assistance and support from the students enrolled in the Agriculture and Livestock Graduate Program,
291 UAAAN-UL, Torreon Coahuila, Mexico, in the development of this study.

292

293 **References**

- 294 Abecia J.A., Chemineau P., Flores J.A., Keller M., Duarte G., Forcada F., Delgadillo J.A. 2015.
295 Continuous exposure to sexually active rams extends estrus activity in the ewes in spring.
296 *Theriogenology*. 84, 1549-1555.
- 297 Balthazart J., Foidart A. 1993. Brain aromatase and the control of male sexual behavior. *J. Steroid*
298 *Biochem. Mol. Biol.* 44, 521-540.
- 299 Bedos, M., Velázquez, H., Fitz-Rodríguez, G., Flores, J.A., Hernández, H., Duarte, G., Vielma, J.,
300 Fernández, I.G., Retana-Márquez, M.S., Muñoz-Gutiérrez, M., Keller, M., Delgadillo, J.A.
301 2012. Sexually active bucks are able to stimulate three successive groups of females per day with
302 a 4-hour period of contact. *Physiol. Behav.* 106, 259-263
- 303 Brudzynski S.M., Pniak A. 2002. Social contacts and production of 50-kHz short ultrasonic calls in
304 adult rats. *J. Comp. Psychol.* 116, 73-82.
- 305 Bustos O.E., Torres-Díaz, L. 2012. Reproducción estacional en el macho. *J. Morphol. Intern.* 30, 1266-
306 1279.
- 307 Carlussio A., Contri A., Amendola S., De Angelis E., De Amicis I., Mazzatenta A. 2013. Male
308 isolation: A behavioral representation of the pheromonal “female effect” in donkey (*Equus*
309 *asinus*). *Physiol. Behav.* 118, 1-7.
- 310 Chemineau P., Pellicer-Rubio M.T., Lassoued N., Khaldi G., Monniaux D. 2006. Male-induced short
311 oestrus and ovarian cycles in sheep and goats: a working hypothesis. *Reprod. Nutr. Dev.* 46,
312 417-429.

313 Dominguez J.M. 2009. A role for preoptic glutamate in the regulation of male reproductive behavior.
314 *Neurosci. Update.* 1, 11-19.

315 Dominguez J.M., Hull E.M. 2005. Dopamine, the medial preoptic area, and male sexual behavior.
316 *Physiol. Behav.* 86, 356-368.

317 Dominguez J.M., Gil M., Hull, E.M. 2006. Preoptic glutamate facilitates male sexual behavior. *J.*
318 *Neurosci.* 26, 1699-1703.

319 Durand D., Pampillo M., Caruso C., Lasaga M. 2008. Role of metabotropic glutamate receptors in the
320 control of neuroendocrine function. *Neuropharmacol.* 55, 577-583.

321 Ebling F.J., Owen J.A., Ben W.T., Cronin A.S. 1998. Seasonal neuroendocrine rhythms in the male
322 siberian hamster persist after monosodium glutamate-induced lesions of the arcuate nucleus in
323 the neonatal period. *J. Neuroendocrinol.* 10, 701-712.

324 Estienne M.J., Broughton D.S., Barb C.R. 2000. Serum concentrations of luteinizing hormone, growth
325 hormone, testosterone, estradiol, and leptin in boars treated with n-methyl-D,L-aspartate1. *J.*
326 *Anim. Sci.* 78, 365-370.

327 FASS, 2010. Guide for the care and use of agricultural animals in agricultural research and teaching.
328 3rd edition, Federation Animal Science Society, Savoy, IL, USA.

329 Fabre-Nys C., Chanvallon A., Dupont J., Lardic L., Lomet D., Martinet S., Scaramuzzi R.J. 2016. The
330 "Ram Effect": A "non-classical" mechanism for inducing LH surges in sheep. *PlosOne.* 11, 1-
331 22.

332 Fabre-Nys C., Kendrick K.M., Scaramuzzi R.J. 2015. The "ram effect": new insights into neural
333 modulation of the gonadotropic axis by male odors and socio-sexual interactions. *Front.*
334 *Neurosci.* 9, 1-16.

335 Fu X.W., Brudzynski S.M. 1994. High-frequency ultrasonic vocalization induced by intracerebral
336 glutamate in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 49, 835-841.

- 337 Guillén-Muñoz J.M., Meza-Herrera C.A., Santos-Jimenez Z., Rivas-Muñoz R., Luna-Orozco J.R.,
338 Mellado M., Véliz-Deras F.G. 2016. Exposure of sexually inactive males to estrogenized females
339 increased the investigative and consummatory sexual behavior. *Anim. Reprod. Sci.* 173, 97-103.
- 340 Goodman R.L., Jansen H.T., Billings H.J., Coolen L.M., Lehman M.N. 2010. Neural systems
341 mediating seasonal breeding in the ewe. *J. Neuroendocrinol.* 22, 674-681.
- 342 Hawken P.A.R., Martin, G.B. 2012. Socio-sexual stimuli and gonadotropin-releasing
343 hormone/luteinizing hormone secretion in sheep and goats. *Dom. Anim. Endocrinol.* 43, 85-94.
- 344 Henley C.L., Nunez A.A., Clemens L.G. 2010. Exogenous androgen during development alters adult
345 partner preference and mating behavior in gonadally intact male rats. *Horm. Behav.* 57, 488-495.
- 346 Hull E.M., Dominguez J.M. 2006. Getting his act together: Roles of glutamate, nitric oxide, and
347 dopamine in the medial preoptic area. *Brain Res.* 1126, 66-75.
- 348 Iremonger K.J., Constantin S., Liu X., Herbison A.E. 2010. Glutamate regulation of GnRH neuron
349 excitability. *Brain Res.* 1364, 35-43.
- 350 Li X., Higley A., Song R., Xi Z.X. 2013. Effects of metabotropic glutamate receptor ligands on male
351 sexual behavior in rats. *Neuropharmacol.* 66, 373-381.
- 352 Mahesh V.B., Brann D.W. 2005. Regulatory role of excitatory amino acids in reproduction. *Endocrine.*
353 28, 271-280.
- 354 Martínez-Alfaro J.C., Hernández H., Flores J.A., Duarte G., Fitz-Rodríguez G., Fernández I.G., Bedos
355 M., Chemineau P., Keller M. Delgadillo J.A., Vielma, J. 2014. Importance of intense male sexual
356 behavior for inducing the preovulatory LH surge and ovulation in seasonally anovulatory female
357 goats. *Theriogenology.* 82, 1028-1035.
- 358 Melis M.R., Succu S., Mascia M.S., Cortis L., Argiolas A. 2004. Extracellular excitatory amino acids
359 increase in the paraventricular nucleus of male rats during sexual activity: main role of N-methyl-
360 D-aspartic acid receptors in erectile function. *European J. Neurosci.* 19, 2569-2575.

361 Menassol J.B., Collet A., Chesneau D., Malpaux B., Scaramuzzi R.J. 2012. The interaction between
362 photoperiod and nutrition and its effects on seasonal rhythms of reproduction in the ewe. *Biol.*
363 *Reprod.* 86, 1-12.

364 Meza-Herrera C.A. 2012. Puberty, kisspeptin and glutamate: A ceaseless golden braid. In: *Advances*
365 *in Medicine and Biology*. Ed: Berhardt L.V. Nova Science Publishers Inc. Hauppauge, NY,
366 USA., Vol. 52, Chapter 3, 97-124.

367 Meza-Herrera C.A., Calderon-Leyva G., Soto-Sanchez M.J., Serradilla J.M., Garcia-Martinez A.,
368 Mellado M., Veliz-Deras F.G. 2014. Glutamate supply positively affects cholesterol
369 concentrations without increases in total protein and urea around the onset of puberty in goats.
370 *Anim. Reprod. Sci.* 147, 106-111.

371 NAM 2002. Guide for the care and use of laboratory animals. Co-produced by the National Academy
372 of Medicine-Mexico and the Association for assessment and accreditation of laboratory animal
373 care international. 1st. Edition, Harlan Mexico, DF, Mexico.

374 Olney J.W., Cicero T.J., Meyer E., De Gubareff T. 1976. Acute glutamate-induced elevations in serum
375 testosterone and luteinizing hormone. *Brain Res.* 112, 420-424.

376 Orihuela T.A. 2014. The sexual behavior of ram: A review. *Rev. Mex. Cien. Pec.* 5, 49-89.

377 Pellicer-Rubio M.T., Touzé J.L., Baril G., Malpaux B. 2013. The luteal outcome of anoestrus ewes
378 induced to ovulate by the male effect is not related to the population of ovarian antral follicles
379 before male exposure. *Anim. Reprod. Sci.* 137, 23-30.

380 Perkins A., Fitzgelald J.A. 1994. The behavioral component of the ram effect: the influence of ram
381 sexual behavior on the induction of estrus in anovulatory ewes. *J. Anim. Sci.* 72, 51-55.

382 Perkins A., Roselli C.H.E. 2007. The ram as a model for behavioral neuroendocrinology. *Horm.*
383 *Behav.* 52, 70-77.

384 Tejada U.L., Meza-Herrera C.A., Rivas-Muñoz R., Rodriguez-Martinez R., Carrillo E., Mellado M.,
385 Véliz-Deras F.G. 2017. Appetitive and consummatory sexual behaviors of rams treated with

386 exogenous testosterone and exposed to anestrus Dorper ewes: efficacy of the male effect. Arch.
387 Sex. Behav. 46, 835-842.

388 Ungerfeld R., Clemente N., Bonjoura L., Orihuela A. 2014. Equine chorionic gonadotrophin
389 administration to rams improves their effectiveness to stimulate anoestrous ewes (the “ram
390 effect”). Anim. Reprod. Sci. 149, 194-198.

391 Véliz F.G., Poindron P., Malpoux B., Delgadillo J.A. 2006. Maintaining contact with bucks does not
392 induce refractoriness to the male effect in seasonally anestrus female goats. Anim. Reprod. Sci.
393 92, 300-309.

394 Viñoles C., Meikle A., Forsberg M. 2004. Accuracy of evaluation of ovarian structures by transrectal
395 ultrasonography in ewes. Anim. Reprod. Sci. 80, 69-79.

396 Will R.G., Hull E.M., Dominguez J.M. 2014. Influences of dopamine and glutamate in the medial
397 preoptic area on male sexual behavior. Pharmacol. Biochem. Behav. 121, 115-123.

398

399

400

401

402

403

404

405

406

407

408 **Table 1.** Frequencies for appetitive and consummatory sexual behaviors and indicators of sexual rest
 409 (ASB, CSB and ISR; respectively) in Dorper rams treated with glutamate (GG), testosterone (GT),
 410 glutamate + testosterone (GGT) and saline (GC) and subsequently exposed to anovulatory nulliparous
 411 Dorper ewes groups (2 days x 2 h) to test the sexual behavior under the natural anestrus season (April-
 412 May, 25° North)

Rams (n)	GG	GT	GGT	GC	SEM
	4	4	4	4	
ASB (n)	1230 ^b	782 ^d	1866 ^a	1024 ^c	232
CSB (n)	113 ^b	197 ^a	122 ^b	151 ^{ab}	19
ASB & CSB (n)	1343 ^b	979 ^d	1988 ^a	1175 ^c	219
ISR (n)	22 ^b	52 ^a	11 ^b	12 ^b	10

413 ^{a, b, c} Values with different superscript within response variable and among treatments, differ ($P < 0.05$).
 414 SEM: Most conservative standard error of the mean is presented.
 415 Note: Frequencies for ASB, CSB, ASB + CSB and ISR, are the summation of behavioral events per male
 416 within treatment; to test differences among treatments, frequencies were compared according to the
 417 procedure proposed by Bedos et al., 2012.
 418
 419
 420
 421
 422
 423
 424
 425
 426
 427
 428
 429
 430
 431
 432

433 **Table 2.** Sexual and reproductive outcomes of anovulatory nulliparous Dorper ewes once being
 434 exposed to the stimulus of rams previously treated with glutamate (GG), testosterone (GT), glutamate
 435 + testosterone (GGT) and saline (GC) under the natural anestrus season (April-May, 25° North)

	GG	GT	GGT	GC
Ewes (n)	20	20	19	21
Estrus response (n)				
Day 0 to 10	7/20 ^a	6/20 ^a	10/19 ^a	6/21 ^a
Day 11 to 20	12/20 ^a	12/20 ^a	11/19 ^a	11/21 ^a
Day 0 to 20	15/20 ^a	16/20 ^a	17/19 ^a	16/21 ^a
Repeated estrus	4/15 ^a	2/16 ^b	4/17 ^a	1/16 ^b
Ovulation response (n)				
Day 0 to 10	18/20 ^a	18/20 ^a	17/19 ^a	18/21 ^a
Day 11 to 20	12/20 ^a	13/20 ^a	12/19 ^a	11/21 ^a
Day 0 to 27	19/20 ^a	20/20 ^a	19/19 ^a	20/21 ^a
Silent ovulations				
Day 0 to 10	11/20 ^a	12/20 ^a	7/19 ^a	12/21 ^a
Day 11 to 20	0/20 ^a	1/20 ^a	0/19 ^a	0/21 ^a
Interval to estrus onset (h)				
Day 0 to 10	53±17 ^a	50±24 ^a	48±11 ^a	40±7 ^a
Day 11 to 20	370±12 ^{ab}	352±6 ^b	359±8 ^b	385±7 ^a
Ovulation rate				
Day 0 to 10	1.4±0.21 ^a	1.4±0.16 ^a	1.2±0.15 ^a	1.1±0.13 ^a
Day 11 to 20	1.2±0.13 ^a	1.2±0.11 ^a	1.3±0.17 ^a	1.2±0.11 ^a
Pregnancy rate (n)				
Day 54	15/20 ^a	16/20 ^a	17/19 ^a	16/21 ^a

436 ^{a, b, c} Values with different superscript within response variable and among treatments, differ (P < 0.05).

437

438

439

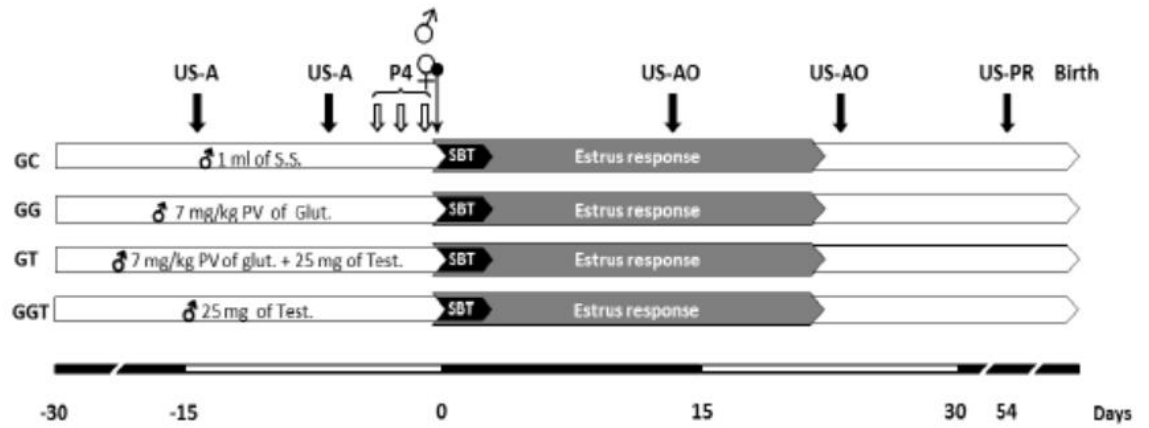
440

441 Fig. 1.

442

443

444



445

446

447

448

449

450

451 **Figure 1.** Experimental design of Dorper rams treated with glutamate (GG), testosterone (GT),
452 glutamate + testosterone (GGT) and saline solution (GC) and later exposed to anovulatory nulliparous
453 Dorper ewes groups. **US-A**= Ultrasound for detected anovulation at day 14 and 7 before contact with
454 rams; **P4**= Application of 60 mg of progesterone divided into 3 doses of 20 mg each and supplied 6, 4
455 and 2 days before contact with the treated rams; **SBT 4♂:20♀**=Tests of sexual behavior with exposure
456 of 4 rams with the same treatment to 20 anovulatory nulliparous sheep, 2 rams the first 2 hours of
457 contact with the ewes and the first 2 hours of the following day. **Estrus response**= Monitoring of
458 estrous activity for 20 days every 12 h, **US-AO**= Ultrasound to detect ovulatory activity on days 6, 13
459 and 23 after the introduction of rams to ewes, **US-PR**= Ultrasound to determine implantation rate on
460 days 54 after introduction of rams.

461

462

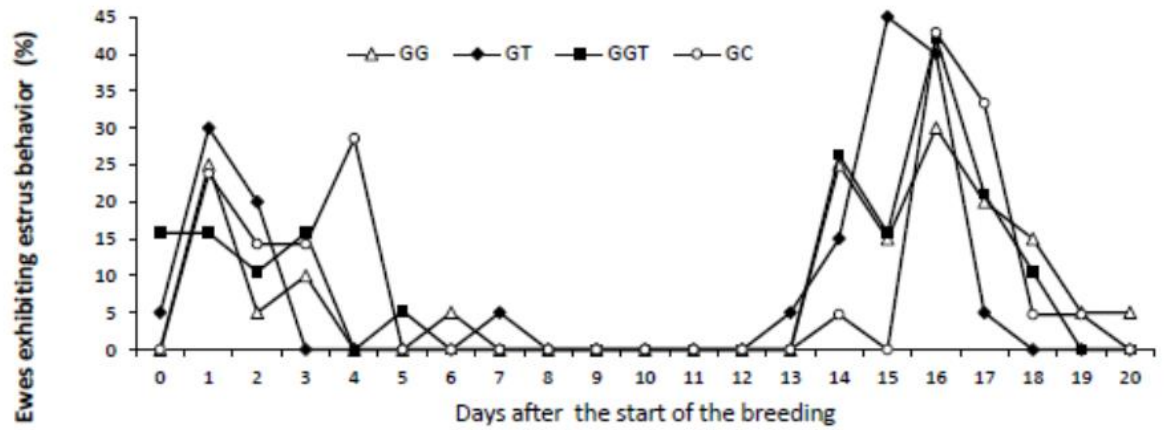
463

464

465

466

467 Fig. 2.



468 **Figure 2.** Percentage of ewes exhibiting estrus behavior when exposed during an experimental breeding (20
469 days) to Dorper rams treated with glutamate (GG), testosterone (GT), glutamate + testosterone (GGT) and
470 saline (GC) under the natural anestrus season (April-May, 25° north).

471

472

473

474

475

476

477

478

479

480

481

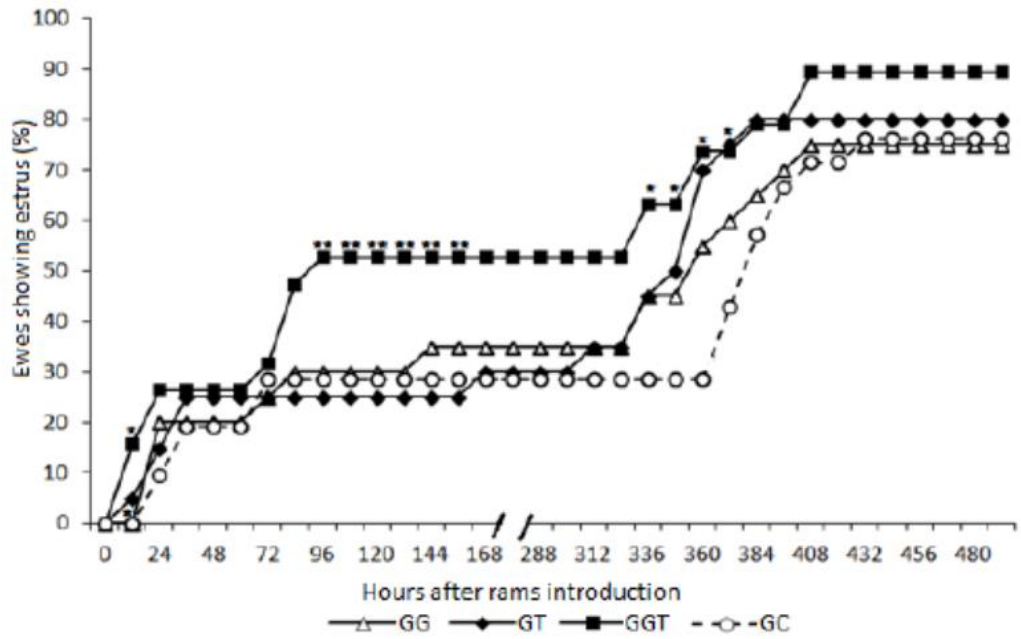
482

483

484

485

486 Fig. 3.



487

488 **Figure 3.** Cumulative percentage of ewes that exhibited estrus behavior when exposed during an experimental
489 breeding (20 days) to Dorper rams treated with glutamate (GG), testosterone (GT), glutamate + testosterone
490 (GGT) and saline solution (GC) under the natural anestrus season (April-May, 25° north).

491 * = Statistical differences among GGT vs GC ($P < 0.05$); ** = statistical differences among GGT vs GC ($P < 0.07$).

492

493

494

495

496

497

498

499

500

501

**Efecto de la suplementación de glutamato sobre la calidad seminal de
carneros jóvenes Dorper con inactividad sexual estacional**

***Effect of glutamate supplementation upon semen quality of Young
seasonally sexual-inactive Dorper rams***

Calderón-Leyva G, Meza-Herrera C.A., Arellano Rodríguez G., Gaytan-Alemán L.R., Alvarado-Espino A.S., Gonzalez-Graciano E.A., Delgado-Bermejo J.V. and Véliz-Deras F.G. Effect of glutamate supplementation upon semen quality of young seasonally sexual-inactive Dorper rams. *Journal of Animal Research* 2017 7(3), 419-424.

DOI: 10.5958/2277-940X.2017.00062.6



Effect of Glutamate Supplementation upon Semen Quality of Young Seasonally Sexual-Inactive Dorper Rams

M.G. Calderón-Leyva^{1,3,*}, C.A. Meza-Herrera², G. Arellano-Rodríguez¹, L.R. Gaytan-Alemán¹, A.S. Alvarado-Espino¹, E.A. Gonzalez-Graciano², J.V. Delgado-Bermejo³ and F.G. Véliz-Deras¹

¹Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Unidad Laguna, Posgrado en Ciencias en Producción Agropecuaria, Periférico Raúl López Sánchez y Carretera a Santa Fe, Torreón, Coahuila, MÉXICO

²Universidad Autónoma Chapingo, Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas, Bermejillo, Durango, MÉXICO.

³Universidad de Córdoba, Programa de Doctorado en Recursos Naturales y Medio Ambiente de Zonas Áridas. Departamento de Genética, Campus Rabanales, Edificio C-5, Córdoba, ESPAÑA

*Corresponding author: MG Calderon-Leyva; Email: gcalderon06@hotmail.com

Received: 11 April, 2017

Revised: 06 May, 2017

Accepted: 07 May, 2017

ABSTRACT

The aim of this study was to determine if exogenous administration of glutamate to young Dorper rams is able to enhance semen quality under long-day photoperiods in northern Mexico (25° north). Dorper rams (n=10) with homogeneous live weight (LW; 56±0.9 kg), body condition score (BCS; 3.2±0.1 units) and scrotal circumference (SC; 31.9±0.38 cm) were randomly divided into two experimental groups and treated with: i) GLUT (n=5; 7 mg kg⁻¹ LW of glutamate, every 3d × 28d, im.) and ii) CONT (n=5; 1 mL of saline, every 3d × 28d, im.). At the end of the experimental period (d28), semen was collected throughout the use of an artificial vagina; different quality and quantity parameters were evaluated. The ANOVA revealed treatment differences (P<0.05) regarding sperm concentration with the largest value observed in the GLUT-rams (4,260±95.9 × 10⁶ cells) regarding to the CONT-rams (2,828±209.2 × 10⁶ cells). Yet, when considering the rest of the response variables which included ejaculation latency (47 ± 15.8 sec), seminal volume (1.1 ± 0.15 ml), total number of ejaculated sperms (4024.5 ± 696.5 × 10⁶ cells), mass motility (2.1 ± 0.3 units) and the percentage of sperms alive (57.5 ± 9.4 %), no statistical differences (P>0.05) were observed between treatments. Results of this study unveils to glutamate as an interesting molecule positively affecting the spermatogenesis process by increasing the sperm concentration of young Dorper rams during photo-inhibitory reproductive schemes. Results also denote interesting outcomes not only to other animal industries but may also embrace translational applications.

Keywords: Ram, Dorper, reproductive arrest, glutamate, seminal quality

Several environmental factors affect small ruminant reproductive activity, not only in females but also in males (D'Alessandro and Martemucci, 2003; Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2011; Escareño *et al.*, 2013). Certainly, in rams from some breeds and/or developed in certain areas, not only the libido but also the reproductive activity across the year is modified, being the photoperiod one of the main environmental cues affecting testicular function, reproductive behavior and seminal quality (Roselli *et al.*, 2004; Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2011; Bravo *et al.*, 2014). To generate such seasonal reproduction pattern, small ruminants are able to perceive the day length through

retinal photic receptors which translate this photic input to an endocrine output in the pineal gland throughout the synthesis and secretion of melatonin. In turn, the specific endocrine pattern of melatonin release is a signal perceived at hypothalamic level, activating or deactivating the GnRH pulse generator (Meza-Herrera *et al.*, 2011a; Meza-Herrera and Tena-Sempere, 2012; Schlatta and Ehmcke, 2014).

Certainly, once day length increases, a phase of reproductive arrest is observed: the hypothalamic centers become exquisitely sensitive to the negative retroaction from the gonadal steroids, promoting the long day

pattern release of melatonin which inhibits the secretion of the hypothalamic GnRH, compromising, in turn, the hypophyseal release of gonadotropins (Polat *et al.*, 2011; Meza-Herrera and Tena-Sempere, 2012). Upon reduction of gonadal testosterone secretion, the male reproductive function is suppressed, generating a decrease in testicular volume, spermatogenesis output and libido (Bustos and Torres-Diaz, 2012). Because of that, long-day photoperiods during spring and summer are related to a reduction in both quality and quantity of semen production (Gastel *et al.*, 1995; Ibrahim, 1997; Andersen *et al.*, 2011).

On the other hand, the excitatory amino acid glutamate, is considered the main neurotransmitter in the central nervous system (Brann and Mahesh, 1997; Meza-Herrera, 2008). Glutamate influences GnRH secretion because of the action of glutamatergic neurons which trigger a hormonal cascade affecting the hypothalamic-pituitary-gonadal axis (Meza-Herrera, 2012). Such neuroendocrine scenario has been linked to an enhancement in reproductive efficiency in females (Meza-Herrera *et al.*, 2014a,b) as well as in the sexual behavior of males (Andersen *et al.*, 2011), promoting an endocrine milieu prone to an amplified sexual behavior at courtship (Walkden-Brown *et al.*, 1999). Interestingly, the expression not only of ionotropic and metabotropic glutamate receptors (Takarda *et al.*, 2004) but also the presence of multiple glutamate transporters (Lee *et al.*, 2011) at testicular level, suggest that glutamate homeostasis must be critical in the mammalian testis. Nonetheless, the possible action of glutamate supplementation upon the seminal quality and quantity in male sheep under sexual photo-inhibitory schemes is still elusive; this study was designed to respond such research question.

MATERIALS AND METHODS

All the methods and management of the experimental units used in this study were in strict accordance with accepted guidelines for ethical use, care and welfare of animals in research at international (FASS, 2010) and national (NAM, 2002) levels, with institutional approval reference number UAAAN-UL: 1330-8241-2903.

Experimental area and environmental conditions

The study was conducted during spring under natural light conditions of increased photoperiods in an intensive sheep

production unit in a semi-desert area of Northern Mexico, at 25° 64' N and 103° 26' W, an altitude of 1,120 m, and annual average temperature from 22° to 24°C.

Management and experimental treatments

Dorper rams (n=10, 11 mo.) were fed alfalfa hay, corn silage and corn grain twice daily (12:00 and 18:00h). Once rams were individually identified and prior to the onset of treatments, LW, BCS and SC were registered; while the BCS was measured by dorsal palpation (Russel, 1984) ranging from the scale of 1 (very thin) to 5 (very fat), the SC considered the measure of widest part of the testes using a flexible tape (Braun *et al.*, 1980). In March, rams, which were homogeneous in terms of live weight (LW; 56±0.9 kg), body condition score (BCS; 3.2±0.1 units), and scrotal circumference (SC; 31.9±0.38 cm), were randomly assigned to one of two experimental treatments: i). Glutamate group (GLUT; intramuscular injection of 7mg kg⁻¹ LW of L-glutamate (pH Eur EMPROVE® exp; MERCK-C₆H₉NO₄-art-101791, diluted in distilled water); the solution was prepared as previously described by Meza-Herrera *et al.* (2011) and applied every 3d × 30d, and ii). Control group (CONT, intramuscular injection of 1 mL of physiological saline every 3 d × 30 d). During the experimental period, which lasted from March to April, rams had *ad libitum* access to clean water, shades and mineral salts.

Response variable: measurements of semen quality

On day 28 of the experimental period, semen was collected with the use of an estrus female treated with 2 mg estradiol cypionate (Laboratorios NORVET, Mexico) in order to be mounted by rams. Yet, to proceed with the collection of semen, a standard sheep artificial vagina was used at a 42° C temperature. Previously, the artificial vagina was pre-heated from 30 to 41°C. Once collected, the tubes with the recuperated fresh semen were immediately submerged in a plastic container with water heated at 38°C and transported to the lab for its posterior analyses during the following 10 minutes. The measurements of semen quality considered:

- i. Latency to ejaculation (seconds), considered the period of time from the moment at which the ram was exposed to an estrus ewe up to the moment in which the ram ejaculated inside the artificial vagina.

- ii. Ejaculated volume (ml), was quantified directly in the graduated collection conic tube with 0.1 ml optically visible intervals.
- iii. Sperm concentration was determined through photometric analysis (Spermacue®, 12300/0500 Minitub, Landshut, Germany; Olivera-Muzante *et al.*, 2011) using non-diluted semen and expressed as 10^6 cells per ml.
- iv. Total number of ejaculated sperms (units) was calculated considering the sperm concentration per ml and multiplied by the total ejaculated volume, and expressed as 10^6 cells.
- v. Mass motility (%), was assessed with the use of an arbitrary 1 to 5 scale; 1=25% to 5=100% motile sperms) as suggested by Mahsud *et al.* (2013). Sperm motility was determined with the use of a pre-heated platform (37°C) using a phase contrast microscopy, X400.
- vi. Live sperms (%), sperm viability was assessed by using the eosine-nigrosine staining technique as described by Kafi *et al.* (2004). At least 200 spermatozoa were recorded per slide by light microscopy (1000X), and the percentage of dead (colored pink) and live (unstained) cells were quantified. All the evaluations were made by the same skilled operator.

Statistical analyses

Data were normalized by square root transformation, and the least squares means were analyzed by the General Linear Model (GLM) ANOVA procedure of SAS (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA, V9.1). The statistical model to analyze the response variables include the effect of treatment; the results are presented as non-transformed means \pm SEM and were considered statistically significant at $P < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Our working hypothesis stated that the i.m. administration of glutamate would promote a positive effect upon semen quality and quantity of young Dorper rams treated during the natural sexual resting season; our results partially support such hypothesis. Analysis of variance revealed that treatments were not a significant source of variation for

most response variables. Nonetheless, the greatest number of sperms per ml (sperm concentration), favored to the GLUT group regarding the CONT group ($P < 0.05$; $4,260 \pm 96.5 \times 10^6$ cells vs. $2,828 \pm 597.2 \times 10^6$ cells).

Certainly, although most variables were not affected because of glutamate administration, the number of ejaculated sperms per ml favored to the GLUT treated rams, obtaining a 66.4% sperm concentration increase in those young Dorper rams treated with glutamate. To the best of our knowledge, this is the first report that document such findings. A possible explanation of such performance is the previously documented results regarding the positive action of glutamate upon not only the GnRH neurons (Meza-Herrera, 2012), being GnRH the common triggering hormone activating the hypothalamic-pituitary-gonadal function (Andersen *et al.*, 2011) but also because of the presence of both ionotropic and metabotropic glutamate receptors and glutamate transporters in the testicular tissue (Takarda *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 2011). Here, the interesting situation is that such testicular output triggered by glutamate supplementation, was promoted under long-day photoperiods which inhibit reproductive function at this latitude (25° north).

On this respect, Olney *et al.* (1976) stated that subcutaneous administration of glutamate in mice incremented both frequency and amplitude of GnRH acting in a positive fashion not only on the hypophyseal release of LH and FSH but also regarding the release of gonadal testosterone (Polat *et al.*, 2011). Besides, in the testicular Sertoli cells, both FSH and testosterone are responsible for initiate the spermatogenesis process and testosterone completes the sperm development until it is released to the rete testis (Bustos and Torres-Días, 2012; Dong *et al.*, 2016). Therefore, merging such neuroendocrine and cellular events, our results suggest that in the establishment of both previous scenarios, glutamate treatment may had triggered an increased spermatogenesis output, augmenting the observed sperm concentration in the glutamate-treated rams. Besides, it has been demonstrated the presence of glutamate in the seminal plasma while the seminal amino acid content could serve as oxidizable substrate in the sperm metabolism (Pruneda *et al.*, 2007).

Table 1 shows the results for the classical semen quality parameters. General averages for seminal volume (1.1 ± 0.15 ml), mass motility (2.1 ± 0.3 units) and the percentage

Table 1: Least square means \pm standard error for different parameters for sexual behavior and semen quality in young Dorper rams (n=10) supplemented with Glutamate (GLUT) or Control (CONT) under natural photoperiodic conditions during the natural sexual resting season (March to April) in northern Mexico (25° North)

Item	GLUT (n=5)	CONT (n=5)
Latency to ejaculation (s)	29 \pm 8.7 ^a	65 \pm 23 ^a
Volume ejaculated (ml)	1.1 \pm 0.1 ^a	1.1 \pm 0.2 ^a
Sperm concentration per ml, ($\times 10^6$ cells)	4,260 \pm 96.5 ^a	2,828 \pm 597.2 ^b
Total number of spermatozoa ejaculated ($\times 10^6$ cells)	4,397 \pm 500.9 ^a	3,652 \pm 893.9 ^a
Mass motility, (1-5 units)	2.1 \pm 0.3 ^a	2.1 \pm 0.3 ^a
Live sperms, (%)	62 \pm 7.9 ^a	53 \pm 10.9 ^a

^{a,b} Values in the same line with different superscript, differ (P<0.05).

of sperms alive (57.5 \pm 9.4 %), without observing statistical differences (P>0.05) between treatments. Regarding the total number of sperms per ejaculation, despite the GLUT treated group got the largest value (4397 \pm 95.9 vs 3652 \pm 609.2), such differences did not reach significance (P>0.05). Yet, it is worth to mention that such lack of significance was probably due to the huge variability of the standard error of the CONT group that, compared to the GLUT group, was greater than 620%. Certainly, while the observed reproductive response was quite homogeneous in the GLUT-treated rams, an extremely large variation for such response variable occurred in the CONT-group. A similar figure can be mentioned with respect to the latency to ejaculation that although no statistical differences observing (P>0.05) between treatments (general averages 47 \pm 15.8 s), a 264% increase in the standard error was observed in the CONT-rams regarding those treated with glutamate. Therefore, in some non-defined way, glutamate administration served to reduce the large variation in the sexual and reproductive responses observed in the CON-rams.

At this point, two ideas must be highlighted. The first is that regarding to the length of the experimental period which only considered 28 days. Although we got promising results when considering the positive effect of glutamate administration upon sperm concentration, as previously stated, the other response variables were not affected because of the glutamate inclusion. On this respect, future studies should consider to increase the length of the experimental period (i.e. 40-60 days), especially when considering the duration of the epithelial seminiferous

cycle, from the first A1-spermatogonial mitosis up to the release of the spermatozoon to the rete testis (Cardoso and Queiroz, 1988). A second interesting point is that the Dorper rams most of the time display a quite short period of seasonal reproductive arrest (Malejane *et al.*, 2014). Both mentioned situations may had impede to observe statistical differences for the other response variables defining semen quality. Indeed, we would expect to observe a more defined effect of glutamate administration in some response variables, (i.e. sperm motility), since glutamate has shown to positively affect ATP production which plays a relevant role in the sperm metabolism as energy source to promote sperm motility (Susetyarini, 2015).

Different research groups have demonstrated a crucial role of glutamate upon sexual behavior. In adult male rats, increases in cellular glutamate have been related to an enlarged number of ejaculations, a reduced reaction time to ejaculation as well as a diminished period of time to accomplish the next ejaculation (latency to ejaculation) (Dominguez *et al.*, 2006). Moreover, it has been stated that both the frequency of ejaculations and the libido are positively correlated with sperm concentration (Mahsud *et al.*, 2013). Such findings can be considered in line with the positive effect of glutamate administration upon sperm concentration observed in this study.

Results of this study unveils to glutamate as an interesting molecule which potentially affected the spermatogenesis process, observing in turn an increased sperm concentration of those young Dorper rams treated with glutamate even under photo-inhibitory reproductive schemes. Although further studies should be designed to

evaluate any possible effect of glutamate supplementation upon sperm morphology, results obtained in this study are promising while also denote interesting outcomes not only to other animal industries but may also embrace interesting translational applications.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are pleased with the Mexican National Council for the Science and Technology (CONACYT) for the scholarship through the Doctor degree. Thanks are also given to graduate students from the Agriculture Production Graduate Program of the Autonomous Agrarian University Antonio Narro, Laguna Unit, for their technical assistance during the study.

REFERENCES

- Andersen, M.L., Alvarenga, T.F., Mazaro-Costa, R., Hachul, H.C. and Tufik, S. 2011. The association of testosterone, sleep, and sexual function in men and women. *Brain Res.*, **1416**: 80-104.
- Bramm, D.W. and Mahesh, V.B. 1997. Excitatory amino acids: evidence for a role in the control of reproduction and anterior pituitary hormone secretion. *Endocr. Rev.*, **18**: 678-700.
- Bravo, J.A., Montanero, J., Calero, R. and Roy, T.J. 2014. Influence of season and reproductive management on the morphometry of ram sperm head. *Small Ruminant Res.* **119**:114-119.
- Bustos, O.E. and Torres-Díaz, L. 2012. Reproducción estacional en el macho. *Int. J. Morphol.*, **30**(4): 1266-1279.
- Cardoso, F.M. and Queiroz, G.F. 1988. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium and daily sperm production of Brazilian hairy rams. *Anim. Reprod. Sci.*, **17**: 77-84.
- D'Alessandro, A.G. and Martemucci, G. 2003. Evaluation of seasonal variations of semen freezability in Leccese ram. *Anim. Reprod. Sci.*, **79**: 93-102.
- Dominguez, J.M., Gil, M., and Hull, E.M., 2006. Preoptic Glutamate Facilitates Male Sexual Behavior. *J. Neurosci.*, **26**(6): 1699-1703.
- Dong, H-J., Wu, D., Xu, S-Y., Li, Q., Fang, Z-F., Che, L-Q., Wu, C-M., Xu, X-Y and Lin, Y. 2016. Effect of dietary supplementation with aminoacids on boar sperm quality and fertility. *Anim. Reprod. Sci.*, **172**: 182-189.
- Escareño, L., Salinas-Gonzalez, H., Wurzinger, M., Iñiguez, L., Sölkner, J. and Meza-Herrera, C.A. 2013. Dairy goat production systems. Status quo, perspectives and challenges. *Trop. Anim. Health Pro.*, **45**: 17-34.
- FASS, 2010. Guide for the care and use of agricultural animals in agricultural research and teaching. 3rd edition, Federation Animal Science Society, Savoy, IL, USA.
- Gastel, T., Bielli, A., Perez, R., Lopez, A., Castrillejo, A., Tagle, R., Franco, J., Laborde, D., Forsberg, M., and Rodriguez-Martinez, H. 1995. Seasonal variations in testicular morphology in Uruguayan Corriedale rams. *Anim. Reprod. Sci.*, **40**: 59-75.
- González-Bulnes, A., Meza-Herrera, C.A., Rekik, M., Ben Salem, H., and Kridli, R.T. 2011. Limiting factors and strategies for improve reproductive outputs of small ruminants reared in semiarid environments. In: *Semi-Arid Environments Agriculture, Water Supply and Vegetation*. Degenovine K.N. (ed.) Nova Science Publishers, Inc. USA. Chapter II, 22 pp.
- Ibrahim, S.A. 1997. Seasonal variations in semen quality of local and crossbred rams raised in the United Arab Emirates. *Anim. Reprod. Sci.*, **49**: 161-167.
- Kafi, M., Safdarian, M. and Hashemi, M. 2004. Seasonal variations in semen characteristics, scrotal circumference and libido of Persian Karakul rams. *Small Ruminant Res.*, **53**: 133-139.
- Lee, A., Anderson, A.R., Barnett, A.C., Chan, A., and Pow, D.V. 2011. Expression of multiple glutamate transporter splice variants in the rodent testis. *Asian J. Androl.*, **13**: 254-265.
- Mahsud, T., Jamil, H., Qureshi, Z.I., Asi, M.N., Lodhi, L.A., Waqas, M.S. and Ahmad, A. 2013. Semen Quality parameters and selected bio-chemical constituents level in plasma of Lohi rams. *Small Ruminant Res.*, **113**: 175-178.
- Malejane, C.M., Greyling, J.P.C. and Ratio, M.B. 2014. Seasonal variation in semen quality of Dorper rams using different collection techniques. *S. Afr. J. Anim. Sci.*, **44**(1): 26-32.
- Malpoux, B., Viguie, C., Skinner, D.C., Thiery, J.C. and Chemineau, P. 1997. Control of the circannual rhythm of reproduction by melatonin in the ewe. *Brain Res. Bull.*, **44**(4): 431-438.
- Meza-Herrera, C.A. 2008. Mecanismos reguladores de la pubertad en la cabra: Actualización de Algunos Conceptos. *Trop. Subtrop. Agroecosy.*, **9**: 29-38.
- Meza-Herrera, C.A., Torres-Moreno, M., Lopez-Medrano, J.I., Gonzalez-Bulnes, A., Veliz, F.G., Mellado, M., Wurzinger, M., Soto-Sanchez, M.J., and Calderon-Leyva, M.G. 2011. Glutamate supply positively affects serum release of triiodothyronine and insulin across time without increases of glucose during the onset of puberty in female goats. *Anim. Reprod. Sci.*, **125**: 74-80.
- Meza-Herrera, C.A., Gonzalez-Bulnes, A., Kridli, R., Mellado, M., Arechiga-Flores, C.F., Salinas, H., Luginbuhl, J.M., 2011a. Neuroendocrine, metabolic and genomic cues

- signaling the onset of puberty in females. *Reprod. Domest. Anim.*, **45**: e495-e502.
- Meza-Herrera, C.A. 2012. Puberty, kisspeptin and glutamate: A ceaseless golden braid. In: Benhardt, LV, editor. *Advances in Medicine and Biology*, Nova Science Publishers, NY, USA, **52**, 97-124.
- Meza-Herrera, C.A. and Tena-Sempere, M. 2012. Interface between nutrition and reproduction: the very basis of production. In: Astiz S, Gonzalez-Bulnes A, editors. *Animal Reproduction in Livestock, Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*, under the auspices of the UNESCO, Eolss Publishers, Oxford, UK, [<http://www.eolss.net>].
- Meza-Herrera, C.A., Calderon-Leyva, G., Soto-Sanchez, M.J., Serradilla, J.M., Garcia-Martinez, A., Mellado, M., Veliz-Deras, F.G. 2014. Glutamate supply positively affects cholesterol concentrations without increases in total protein and urea around the onset of puberty in goats. *Anim. Reprod. Sci.*, **147**: 106-111.
- Meza-Herrera, C.A., Gonzalez-Velazquez, A., Veliz-Deras, F.G., Rodriguez-Martinez, R., Arellano-Rodriguez, G., Serradilla, J.M., Garcia-Martinez, A., Avendaño-Reyes, L., Macias-Cruz, U. 2014b. Short-term glutamate administration positively affects the number of antral follicles and the ovulation rate in cycling adult goats. *Reprod. Biol.*, **13**: 298-301.
- NAM, 2002. *Guide for the care and use of laboratory animals*. Co-produced by the National Academy of Medicine-Mexico and the Association for assessment and accreditation of laboratory animal care international. 1st. Edition, Harlan Mexico, DF, Mexico.
- Olivera-Muzante, J., Gil, J., Fierro, S., Menchaca, A. and Rubianes, E. 2011. Alternatives to improve a prostaglandin-based protocol for timed artificial insemination in sheep. *Theriogenology*, **76**: 1501-1507.
- Olney, J.W., Cicero, T.J., Meyer, E. and DeGubareff, T. 1976. Acute glutamate-induced elevations in serum testosterone and luteinizing hormone. *Brain Res.*, **112**: 420-424
- Polat, H., Gürsel, D., Ilkay, B. and Erkan, P. 2011. Annual change of the testosterone hormone in male White Goats. *Agr. Sci. China*, **10**(2): 312-316.
- Pruneda, A., Yeung, Ching-Hei, Bonet, S., Pinart, E. and Cooper, T.G. 2007. Concentrations of carnitine, glutamate and myo-inositol in epididymal fluid and spermatozoa from boars. *Anim. Reprod. Sci.*, **97**: 344-355.
- Roselli, C.E., Larkin, K., Schrunk, J.M. and Stormshak, F. 2004. Sexual partner preference, hypothalamic morphology and aromatase in rams. *Physiology and Behavior*. **83**: 233-245.
- Schlatt, S. and Ehmcke, J. 2014. Regulation of spermatogenesis: An evolutionary biologist's perspective. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **29**: 2-16.
- Susetyarini, E. 2015. The Level of Glutamic Acid in the Semen of Male White Rat (*Ratus norvegicus*) after Being Treated with Tanning of *Pluchea indica*. *Procedia Chem.*, **14**: 152-156.
- Takarda, Y., Hinoi, E., Balcar, V.J., Taniura, H., and Yoneda, Y. 2004. Possible expression of functional glutamate transporters in the rat testis. *J. Endocrinol.*, **181**: 233-244.
- Walkden-Brown, S.W., Martin, G.B. and Restall, B.J. 1999. Role of male-female interaction in regulating reproduction in sheep and goats. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, **52**: 243-257.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Tesis en Régimen de Co-tutela

Control de la actividad sexual de ovejas nulíparas mediante
carneros Dorper tratados con testosterona y/o glutamato:
comportamiento sexual y efecto macho

VII.

CONCLUSIONES

Doctorado en Ciencias en Producción Agropecuaria
Doctorado en Recursos Naturales y Gestión Sostenible

Conclusiones específicas

1 y 2. La administración de glutamato o glutamato más testosterona en carneros adultos de la raza Dorper durante el reposo sexual reproductivo, incrementó la intensidad de olor como uno de los indicadores de actividad reproductiva. De la misma manera dichos tratamientos en machos jóvenes como en adultos incrementan la frecuencia del comportamiento sexual apetitivo y consumatorio de manera significativa durante fotoperiodos crecientes.

A través del efecto macho, carneros jóvenes y adultos de la raza Dorper previamente tratados con glutamato y glutamato más testosterona, son capaces de promover la manifestación de estro más rápida y una mayor activación ovárica, reflejada en la tasa ovulatoria y de preñez, en las ovejas nulíparas anovulatorias. Esta respuesta socio-sexual puede ser una importante alternativa reproductiva a la inducción de la respuesta ovárica de las ovejas acíclicas no sólo en los escenarios de fuera de temporada, sino también en un período de tiempo más corto.

3. Tratamientos con glutamato en carneros jóvenes de la raza Dorper bajo fotoperiodos inhibitorios de los esquemas reproductivos afectan potencialmente el proceso de la espermatogénesis, los resultados se reflejan en que estos carneros mostraron una mayor concentración espermática que los carneros del grupo testigo. Sin embargo, otros estudios deben ser diseñados para evaluar cualquier posible efecto de la suplementación con glutamato sobre la morfología espermática.

Conclusiones generales

De los tratamientos (glutamato y/o testosterona) evaluados en machos ovinos Dorper jóvenes y adultos durante fotoperiodos crecientes, la administración con glutamato y glutamato + testosterona incrementan los indicadores de la actividad reproductiva y de comportamiento sexual, y estos machos tienen la capacidad para incrementar la respuesta sexual de las ovejas nulíparas anovulatorias a través del efecto macho.

Nuestro estudio, parece ser el primer informe que demuestra que el comportamiento sexual de los carneros jóvenes de la raza Dorper se puede mejorar a través de la administración de glutamato más testosterona, ya que ningún estudio previo ha investigado tal posibilidad. Por lo tanto, está investigación revela un posible estímulo sinérgico proporcionado por la administración de glutamato más testosterona tanto en el comportamiento sexual de los carneros jóvenes y adultos de la raza Dorper y la actividad ovárica de las ovejas nulíparas anovulatorias, una vez expuestas a estos carneros previamente tratados. En el mismo sentido, los resultados de esta investigación revelan al glutamato como una molécula que potencialmente afecta de manera positiva el proceso de la espermatogénesis.

Los tratamientos de glutamato y glutamato más testosterona generaron resultados sexuales y reproductivos alentadores, que pueden abarcar aplicaciones potenciales transmisibles a otras especies y a otros sistemas de producción pecuaria.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Tesis en Régimen de Co-tutela

Control de la actividad sexual de ovejas nulíparas mediante
carneros Dorper tratados con testosterona y/o glutamato:
comportamiento sexual y efecto macho

VIII.

REFERENCIAS

Doctorado en Ciencias en Producción Agropecuaria
Doctorado en Recursos Naturales y Gestión Sostenible

- ABECIA, J., CHEMINEAU, P., FLORES, J., KELLER, M., DUARTE, G., FORCADA, F., and DELGADILLO, J. Continuous exposure to sexually active rams extends estrous activity in ewes in spring. *Theriogenology* 2015 84(9), 1549-1555.
- ABECIA, J., CHEMINEAU, P., GÓMEZ, A., KELLER, M., FORCADA, F. and DELGADILLO, J. Presence of photoperiod-melatonin-induced, sexually-activated rams in spring advances puberty in autumn-born ewe lambs. *Animal Reproduction Science* 2016 170, 114-120.
- Álvarez, L. and Zarco, L.A. Los fenómenos de bioestimulación sexual en ovejas y cabras. *Vet. Méx.* 2001 32(2), 117-129.
- AMIRIDIS, G., and CSEH, S. (2012). Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants. *Animal Reproduction Science* 2012 130 (3-4), 152-161.
- ANDERSEN, M.L., ALVARENGA, T.F., MAZARO-COSTA R., HACHUL H.C. and TUFIK, S. The association of testosterone, sleep, and sexual function in men and women. *Brain Research* 2001 1416, 80-104.
- ANDRADE, J., NALÉRIO, E., GIONGO, C., DE BARCELLOS, M., ARES, G. and DELIZA, R. Consumer perception of dry-cured sheep meat products: Influence of process parameters under different evoked contexts. *Meat Science* 2017 130, 30-37.
- ARROYO, J. Estacionalidad reproductiva de la oveja en México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 2011 14, 829-845.
- ARROYO, J., GALLEGOS-SANCHEZ, J., VILLA, A. and VALENCIA, J. Sistemas neurales de retroalimentación durante el ciclo reproductivo anual de la oveja: una revisión. *Interciencia* 2006 31(1), 8-15.
- ATTILA, M., OKSALA, R., and ÅGMO, A. Sexual incentive motivation in male rats requires both androgens and estrogens. *Hormones and Behavior* 2010 58(2), 341-351.
- BALTHAZART, J. and BALL, G. New insights into the regulation and function of brain estrogen synthase (aromatase). *Trends In Neurosciences* 1998 21(6), 1-6.
- BALTHAZART, J. and BALL, G. Is brain estradiol a hormone or a neurotransmitter?. *Trends In Neurosciences* 2006 29(5), 241-249.
- BALTHAZART, J., BAILLIEN, M., CORNIL, C. and BALL, G. Preoptic aromatase modulates male sexual behavior: slow and fast mechanisms of action. *Physiology & Behavior* 2004 83(2), 247-270.
- BALTHAZART, J., BAILLIEN, M. and BALL, G. Rapid control of brain aromatase activity by glutamatergic inputs. *Endocrinology* 2006 147(1), 359-366.

- BARTLEWSKI, P., BABY, T. and GIFFIN, J. Reproductive cycles in sheep. *Animal Reproduction Science* 2011 124(3-4), 259-268.
- BARTLEWSKI, P., BEARD, A. and RAWLINGS, N. Ovarian function in ewes during the transition from breeding season to anoestrus. *Animal Reproduction Science* 1999 57(1-2), 51-66.
- BERGLES, D.E., DIAMOND, J.S. and JAHR, C.E. Clearance of glutamate inside the synapse and beyond. *Current Opinion in Neurobiology* 1999 9, 293-298.
- BERMANT, G., CLEGG, M. and BEAMER, W. Copulatory behaviour of the ram, *Ovis aries*. I: A normative study. *Animal Behaviour* 1969 17(4), 700-705.
- BILASPURI, G.S. and GURAYA, S.S. The seminiferous epithelial cycle and spermatogenesis in rams (*Ovis aries*). *Theriogenology* 1986 25(4), 485-505.
- BORJA, F. and FABRE-NYS, C. Brain structures involved in the sexual behaviour of Ile de France rams with different sexual preferences and levels of sexual activity. *Behavioural Brain Research* 2012 226(2), 411-419.
- BRANN, D. and MAHESH, V. Excitatory amino acid neurotransmission evidence for a role in neuroendocrine regulation. *Trends In Endocrinology & Metabolism* 1992 3(4), 122-126.
- BRANN, D. and MAHESH, V. Excitatory Amino Acids: Evidence for a Role in the Control of Reproduction and Anterior Pituitary Hormone Secretion. *Endocrine Reviews* 1997 18(5), 678-700.
- BRONSON, F. Climate change and seasonal reproduction in mammals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2009 364, 3331-3340.
- BUSTOS, E. and TORRES-DÍAZ, L. Reproducción Estacional en el Macho. *International Journal of Morphology* 2012 30(4), 1266-1279.
- CARRILLO, E., TEJADA, L., MEZA-HERRERA, C., ARELLANO-RODRÍGUEZ, G., GARCIA, J., and DE SANTIAGO-MIRAMONTES, M. et al. Response of sexually inactive French Alpine bucks to the stimulus of goats in oestrus. *Livestock Science* 2011 141(2-3), 202-206.
- CASAO, A., PÉREZ-PÉ, R., ABECIA, J., FORCADA, F., MUIÑO-BLANCO, T. and CEBRIÁN-PÉREZ, J. The effect of exogenous melatonin during the non-reproductive season on the seminal plasma hormonal profile and the antioxidant defence system of Rasa Aragonesa rams. *Animal Reproduction Science* 2013 138(3-4), 168-174.
- CLOETE, S., SNYMAN, M. and HERSELMAN, M. Productive performance of Dorper sheep. *Small Ruminant Research* 2000 36(2), 119-135.

- CORNIL, C., BALL, G. and BALTHAZART, J. Rapid control of male typical behaviors by brain-derived estrogens. *Frontiers in Neuroendocrinology* 2012 33(4), 425-446.
- COSS, D. Regulation of reproduction via tight control of gonadotropin hormone levels. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2017, 1-15.
- CHANVALLON, A., BLACHE, D., CHADWICK, A., ESMAILI, T., HAWKEN, P., and MARTIN, G. et al. Sexual experience and temperament affect the response of Merino ewes to the ram effect during the anoestrous season. *Animal Reproduction Science* 2010 119(3-4), 205-211.
- CHARLIER, T., SEREDYNSKI, A., NIESSEN, N. and BALTHAZART, J. Modulation of testosterone-dependent male sexual behavior and the associated neuroplasticity. *General and Comparative Endocrinology* 2013 190, 24-33.
- CHEMINEAU, P., MORELLO, H., DELGADILLO, J.A. y MALPAUX, B. Estacionalidad reproductiva en pequeños rumiantes: mecanismos fisiológicos y técnicas para la inducción de una actividad sexual s contra estación. 3er Congreso ALEPRYCS, Viña del Mar, Chile 2003. Pp 1-18.
- CHEMINEAU, P., PELLICER-RUBIO, M., LASSOUED, N., KHALDI, G. and MONNIAUX, D. Male-induced short oestrous and ovarian cycles in sheep and goats: a working hypothesis. *Reproduction Nutrition Development* 2006 46(4), 417-429.
- DARDENTE, H., LOMET, D., ROBERT, V., DECOURT, C., BELTRAMO, M. and PELLICER-RUBIO, M. Seasonal breeding in mammals: From basic science to applications and back. *Theriogenology* 2016 86(1), 324-332.
- DAYALU, E. and KITTOK, R. Negative feedback on luteinizing hormone secretion requires infrequent exposure to testicular androgens. *Animal Reproduction Science* 1996 44(1), 55-69.
- DE SANTIAGO-MIRAMONTES, M.A, MARCELINO-LEÓN, S., LUNA-OROZCO, J.M., RIVAS-MUÑOZ, R., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, R., MELLADO-BOSQUE, M. and VÉLIZ-DERAS, F.G. La presencia de hembras estrogenizadas al momento del efecto macho induce la actividad estral de cabras en el semidesierto mexicano. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 2011 XVII 77-85.
- DEKRETSER, D., MCLACHLAN, R., ROBERTSON, D. and WREFORD, N. Control of spermatogenesis by follicle stimulating hormone and testosterone. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism* 1992 6(2) 335-354.
- DELGADILLO, J., CARRILLO, E., MORÁN, J., DUARTE, G., CHEMINEAU, P. and MALPAUX, B. Induction of sexual activity of male creole goats in subtropical northern Mexico using long days and melatonin. *Journal of Animal Science* 2001 79, 2245-2252.

- DHANDAPANI, K. and BRANN, D. The role of glutamate and nitric oxide in the reproductive neuroendocrine system. *Biochemistry and Cell Biology* 2000 78(3), 165-179.
- DICKSON, K. and SANFORD, L. Breed diversity in FSH, LH and testosterone regulation of testicular function and in libido of young adult rams on the southeastern Canadian prairies. *Small Ruminant Research* 2005 56(1-3), 189-203.
- DIVYA V., KUMAR G.V., NANDI S., RAMCHANDRA, S.G. and SURIN, W.R. Scrotal-testicular biometry, sperm quality and quantity in rams (*Ovis aries*). *Asian Pacific Journal of Reproduction* 2013 2(4), 301-303.
- DLUZEN, D. and RAMÍREZ, V. Measurement of hormonal and neural correlates of reproductive behavior. *Methods in Neurosciences* 1993 14, 76-97.
- DOMINGUEZ, J. A Role for Preoptic Glutamate in the Regulation of Male Reproductive Behavior. *The Neuroscientist* 2009 15(1), 11-19.
- DOMINGUEZ, J. and HULL, E. Dopamine, the medial preoptic area, and male sexual behavior. *Physiology & Behavior* 2005 86(3), 356-368.
- DOMINGUEZ, J., GIL, M. and HULL, E. Preoptic Glutamate Facilitates Male Sexual Behavior. *Journal of Neuroscience* 2006 26(6), 1699-1703.
- DONG, H., WU, D., XU, S., LI, Q., FANG, Z. and CHE, L. et al. Effect of dietary supplementation with amino acids on boar sperm quality and fertility. *Animal Reproduction Science* 2016 172, 182-189.
- DUGGAVATHI, R., BARTLEWSKI, P., AGG, E., FLINT, S., BARRETT, D. and RAWLINGS, N. The Effect of the Manipulation of Follicle-Stimulating Hormone (FSH)-Peak Characteristics on Follicular Wave Dynamics in Sheep: Does an Ovarian-Independent Endogenous Rhythm in FSH Secretion Exist?. *Biology of Reproduction* 2005 72(6), 1466-1474.
- DURAND, D., PAMPILLO, M., CARUSO, C. and LASAGA, M. Role of metabotropic glutamate receptors in the control of neuroendocrine function. *Neuropharmacology* 2008 55(4), 577-583.
- EBLING, F. The role of glutamate in the photic regulation of the suprachiasmatic nucleus. *Progress In Neurobiology* 1996 50(2-3), 109-132.
- EBLING, F., CRONIN, A. and HASTINGS, M. Resistance of gonadotropin-releasing hormone neurons to glutamatergic neurotoxicity. *Brain Research Bulletin* 1998 47(6), 575-584.
- EL-ALAMY, M., FOOTE, R. and HARE, E. Sperm output and hormone concentrations in finn and dorset rams exposed to long- and short-day lighting. *Theriogenology* 2001 56(5), 839-854.
- ESTIENNE, M., BROUGHTON, D. and BARB, C. Serum concentrations of luteinizing hormone, growth hormone, testosterone, estradiol, and leptin in

- boars treated with n-methyl-D,L-aspartate. *Journal of Animal Science* 2000 78, 365-370.
- FABRE-NYS, C., KENDRICK, K. and SCARAMUZZI, R. The “ram effect”• : new insights into neural modulation of the gonadotropic axis by male odors and socio-sexual interactions. *Frontiers in Neuroscience* 2015 9(111), 1-16.
- FAOSTAT (2017). Food and Agriculture Organization of the United Nations 2017. Consultada: 16 agosto 2017. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QA>.
- FITZGERALD, J. and STELLFLUG, J. Effects of melatonin on seasonal changes in reproduction of rams. *Journal of Animal Science* 1991 69, 264-275.
- FOURIE, P., SCHWALBACH, L., NESER, F. and GREYLING, J. Relationship between body measurements and serum testosterone levels of Dorper rams. *Small Ruminant Research* 2005 56(1-3), 75-80.
- FU, X. and BRUDZYNSKI, S. High-frequency ultrasonic vocalization induced by intracerebral glutamate in rats. *Pharmacology Biochemistry And Behavior* 1994 49(4), 835-841.
- FUSANI, L., BARSKE, J., DAY, L., FUXJAGER, M. and SCHLINGER, B. Physiological control of elaborate male courtship: Female choice for neuromuscular systems. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 2014 46, 534-546.
- GELEZ, H., and FABRE-NYS, C. Neural pathways involved in the endocrine response of anestrus ewes to the male or its odor. *Neuroscience*, 2006 140(3), 791-800.
- GELEZ, H., ARCHER, E., CHESNEAU, D., LINDSAY, D. and FABRE-NYS, C. Role of experience in the neuroendocrine control of ewes' sexual behavior. *Hormones and Behavior* 2004 45(3), 190-200.
- GERLACH, T. and AURICH, J. Regulation of seasonal reproductive activity in the stallion, ram and hamster. *Animal Reproduction Science* 2000 58(3-4), 197-213.
- GILL, S., MUELLER, R., MCGUIRE, P. and PULIDO, O. Potential Target Sites in Peripheral Tissues for Excitatory Neurotransmission and Excitotoxicity. *Toxicologic Pathology* 2000 28(2), 277-284.
- GINTHER, O., KOT, K. and WILTBANK, M. Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. *Theriogenology* 1995 43(3), 689-703.
- GÓMEZ-CHANG E., LARREA F. y MARTÍNEZ-MONTES F. 2012. Vías de señalización asociadas a la esteroidogénesis. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 2012 15(1), 24-36.

- GONZÁLEZ-GODÍNEZ, A., URRUTIA-MORALES, J. y GÁMEZ-VÁZQUEZ, H.G. Comportamiento reproductivo de ovejas Dorper y Katahdin empadradas en primavera en el norte de México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 2014 17, 123-127.
- GOODMAN, R.L. and INSKEEP, E.K. "Neuroendocrine control of the Ovarian Cycle of the Sheep". En: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Third Edition. Edited by Jimmy D. Neill, Virginia, USA. Elsevier ©, 2006. pp 2389-2446.
- GRISWOLD, M.D. and MCLEAN, D. "The Sertoli Cell". En: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Third Edition. Edited by Jimmy D. Neill, Washington, USA. Elsevier ©, 2006. pp. 949-974.
- GÜNDOĞAN, M., BAKI, D., and YENI, D. Reproductive seasonality in sheep. *Animal Science* 2003 53, 175-179.
- HALES, D., DIEMER, T. and HALES, K. Role of cytokines in testicular function. *Endocrine* 1999 10(3), 201-217.
- HAWKEN, P. and MARTIN, G. Sociosexual stimuli and gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone secretion in sheep and goats. *Domestic Animal Endocrinology* 2012 43(2), 85-94.
- HULL, E.M., WOOD, R.I. and MCKENNA, K.E. "Neurobiology of Male Sexual Behavior". En: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Third Edition. Edited by Jimmy D. Neill, Florida, USA. Elsevier ©, 2006. P. 1729-1824.
- IREMONGER, K., CONSTANTIN, S., LIU, X. and HERBISON, A. Glutamate regulation of GnRH neuron excitability. *Brain Research* 2010 1364, 35-43.
- KAUR, G., THOMPSON, L. and DUFOUR, J. Sertoli cells-Immunological sentinels of spermatogenesis. *Seminars In Cell & Developmental Biology* 2014 30, 36-44.
- KILGOUR, R., COUROT, M., PISSELET, C., DUBOIS, M. and SAIRAM, M. Inhibition of FSH but not LH affects spermatogenesis in the mature ram. *Animal Reproduction Science* 1994 34(3-4), 253-263.
- KILGOUR, R., COUROT, M., PISSELET, C., DUBOIS, M. and SAIRAM, M. Inhibition of FSH affects spermatogenesis in the mature ram. *Animal Reproduction Science* 1993 32(3-4), 213-225.
- KNIGHT, T., GHERARDI, S. and LINDSAY, D. Effects of sexual stimulation on testicular size in the ram. *Animal Reproduction Science* 1987 13(2), 105-115.
- LANGFORD, G., SANFORD, L., MARCUS, G. and SHRESTHA, J. Seasonal cyclic pituitary and testicular activities in rams. *Small Ruminant Research*, 1999 33(1), 43-53.

- Li, X., HIGLEY, A., SONG, R. and XI., Z.X. Effects of metabotropic glutamate receptor ligands on male sexual behavior in rats. *Neuropharmacology* 2013 66, 373-381.
- LIMÓN-MORALES, O., SORIA-FREGOZO, C., ARTEAGA-SILVA, M., HERNÁNDEZ GONZÁLEZ, M., VÁZQUEZ-PALACIOS, G. and BONILLA-JAIME, H. Hormone replacement with 17 β -estradiol plus dihydrotestosterone restores male sexual behavior in rats treated neonatally with clomipramine. *Hormones and Behavior* 2014 66(5), 820-827.
- LINCOLN, G. Reproductive seasonality and maturation throughout the complete life-cycle in the mouflon ram (*Ovis musimon*). *Animal Reproduction Science* 1998 53(1-4), 87-105.
- LINDSAY, D. Environment and reproductive behaviour. *Animal Reproduction Science* 1996 42(1-4), 1-12.
- LÓPEZ-MEDRANO, J., MEZA-HERRERA, C., GONZÁLEZ-BULNES, A., TORRES-MORENO, M., MELLADO-BOSQUE, M., WURZINGER, M., TREJO-CALZADA, R. Effect of exogenous glutamate supply on the onset of puberty in goats: II. Serum levels of triiodothyronine. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 2009 11, 197-200.
- LUNA-OROZCO, J., GUILLEN-MUÑOZ, J., DE SANTIAGO-MIRAMONTES, M., GARCÍA, J., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, R., MEZA-HERRERA, C., MELLADO, M. and VÉLIZ, F. Influence of sexually inactive bucks subjected to long photoperiod or testosterone on the induction of estrus in anovulatory goats. *Tropical Animal Health and Production* 2012 44(1), 71-75.
- MAHESH, V. and BRANN, D. Regulatory Role of Excitatory Amino Acids in Reproduction. *Endocrine* 2005 28(3), 271-280.
- MAINA, D. and KATZ, L. Scent of a Ewe: Transmission of a Social Cue by Conspecifics Affects Sexual Performance in Male Sheep. *Biology of Reproduction* 1999 60(6), 1373-1377.
- MALPAUX, B. "Seasonal Regulation of Reproduction in Mammals". En: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Third Edition. Edited by Jimmy D. Neill, Nouzilly, France. Elsevier ©, 2006. P. 2231-2281.
- MALPAUX, B., VIGUIÉ, C., SKINNER, D., THIÉRY, J. and CHEMINEAU, P. Control of the Circannual Rhythm of Reproduction by Melatonin in the Ewe. *Brain Research Bulletin* 1997 44(4), 431-438.
- MANDIKI, S., DERYCKE, G., BISTER, J. and PAQUAY, R. Influence of season and age on sexual maturation parameters of Texel, Suffolk and Ile-de-France rams. *Small Ruminant Research* 1998 28(1), 67-79.
- MARINO, R., ATZORI, A., D'ANDREA, M., IOVANE, G., TRABALZA-MARINUCCI, M. and RINALDI, L. Climate change: Production

- performance, health issues, greenhouse gas emissions and mitigation strategies in sheep and goat farming. *Small Ruminant Research* 2016 135, 50-59.
- MARTIN, G., OLDHAM, C., COGNIÉ, Y. and PEARCE, D. The physiological responses of anovulatory ewes to the introduction of rams-A review. *Livestock Production Science* 1986 15(3), 219-247.
- MAS, M. Neurobiological correlates of masculine sexual behavior. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 1995 19(2), 261-277.
- MELIS, M., SUCCU, S., COCCO, C., CABONI, E., SANNA, F. and BOI, A. et al. Oxytocin induces penile erection when injected into the ventral subiculum: Role of nitric oxide and glutamic acid. *Neuropharmacology* 2010 58(7), 1153-1160.
- MEZA-HERRERA, C.A. Mecanismos reguladores de la pubertad en la cabra: actualización de algunos conceptos. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 2008 9, 29-38.
- MEZA-HERRERA, C., GONZALEZ-BULNES, A., KRIDL, R., MELLADO, M., ARECHIGA-FLORES, C., SALINAS, H., and LUGINBUHL, J. Neuroendocrine, Metabolic and Genomic Cues Signalling the Onset of Puberty in Females. *Reproduction In Domestic Animals* 2009 45(6), e495-e502.
- MEZA-HERRERA, C., TORRES-MORENO, M., LÓPEZ-MEDRANO, J., GONZÁLEZ-BULNES, A., VELIZ, F., MELLADO-BOSQUE, M., WURZINGER, M., SOTO-SANCHEZ, M. and CALDERÓN-LEYVA, G. Glutamate supply positively affects serum release of triiodothyronine and insulin across time without increases of glucose during the onset of puberty in female goats. *Animal Reproduction Science* 2011 125, 74-80.
- MEZA-HERRERA, C.A. Puberty, kisspeptin and glutamate: A ceaseless golden braid. En: *Advances in Medicine and Biology*, Ed: Benhardt, L.V. Nova Science Publishers, NY, USA, 2012 97-124.
- MEZA-HERRERA, C., GONZÁLEZ-VELÁZQUEZ, A., VELIZ-DERAS, F., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, R., ARELLANO-RODRIGUEZ, G., and SERRADILLA, J. et al. Short-term glutamate administration positively affects the number of antral follicles and the ovulation rate in cyclic adult goats. *Reproductive Biology*, 2014a 14(4), 298-301.
- MEZA-HERRERA, C., CALDERÓN-LEYVA, G., SOTO-SANCHEZ, M., SERRADILLA, J.M., GARCÍA-MARTINEZ, A., MELLADO-BOSQUE, M. and VELIZ, F. Glutamate supply positively affects serum cholesterol concentrations without increases in total protein and urea around the onset of puberty in goats. *Animal Reproduction Science* 2014b 147, 106-111.

- MICHAELIS, E.K. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Progress in Neurobiology* 1998 54, 369-415
- MONTOSSI, F., FONT-I-FURNOLS, M., DEL CAMPO, M., SAN JULIÁN, R., BRITO, G. and SAÑUDO, C. Sustainable sheep production and consumer preference trends: Compatibilities, contradictions, and unresolved dilemmas. *Meat Science* 2013 95(4), 772-789.
- NG, Y., WOLFE, A., NOVAIRA, H. and RADOVICK, S. Estrogen regulation of gene expression in GnRH neurons. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2009 303(1-2), 25-33.
- OLNEY, J., CICERO, T., MEYER, E. and DE GUBAREFF, T. Acute glutamate-induced elevations in serum testosterone and luteinizing hormone. *Brain Research* 1976 112(2), 420-424.
- OPENDAK, M., BRIONES, B. and GOULD, E. Social behavior, hormones and adult neurogenesis. *Frontiers in Neuroendocrinology* 2016 41, 71-86.
- ORIHUELA, A. La conducta sexual del carnero. Revisión. *Rev Mex Cienc Pecu* 2014 5(1), 49-89.
- PARTIDA, J.A., BRAÑA, D., JIMÉNEZ, H., RÍOS, F.G. y BUENDÍA, G. *Producción de carne ovina*. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal. Primera edición. Querétaro, México: BM editores, 2013. Pp. 107. ISBN: 978-607-37-0036-8.
- PERKINS, A. and FITZGERALD, J. The behavioral component of the ram effect: the influence of ram sexual behavior on the induction of estrus in anovulatory ewes. *Journal of Animal Science* 1994 72, 51-55.
- PERKINS, A. and ROSELLI, C. The ram as a model for behavioral neuroendocrinology. *Hormones and Behavior* 2007 52(1), 70-77.
- PFAUS, J., MARCANGIONE, C., SMITH, W., MANITT, C. and ABILLAMAA, H. Differential induction of Fos in the female rat brain following different amounts of vaginocervical stimulation: modulation by steroid hormones. *Brain Research*, 1996 741(1-2), 314-330.
- PIET, R., DE CROFT, S., LIU, X. and HERBISON, A. Electrical properties of kisspeptin neurons and their regulation of GnRH neurons. *Frontiers In Neuroendocrinology* 2015 36, 15-27.
- PINCKARD, K., STELLFLUG, J., RESKO, J., ROSELLI, C. and STORMSHAK, F. Review: brain aromatization and other factors affecting male reproductive behavior with emphasis on the sexual orientation of rams. *Domestic Animal Endocrinology* 2000 18(1), 83-96.
- POLAT, H., DELLAL, G., BARITCI, I. and PEHLIVAN, E. Annual Change of the Testosterone Hormone in Male White Goats. *Agricultural Sciences In China* 2011 10(2), 312-316.

- PORRAS, A., ZARCO, L.A. y VALENCIA, J. Estacionalidad reproductiva en las ovejas. *Ciencia veterinaria* 2003 9, 1-33.
- PRICE, E., BENCH, C., BORGWARDT, R. and DALLY, M. Sexual performance of twin ram lambs and the effect of number and sex of contemporary siblings. *Applied Animal Behaviour Science* 2000 68(3), 199-205.
- PRUNEDA, A., YEUNG, C., BONET, S., PINART, E. and COOPER, T. Concentrations of carnitine, glutamate and myo-inositol in epididymal fluid and spermatozoa from boars. *Animal Reproduction Science* 2007 97(3-4), 344-355.
- RAMÍREZ, S., BEDOS, M., CHASLES, M., HERNÁNDEZ, H., FLORES, J. and VIELMA, J. et al. Fifteen minutes of daily contact with sexually active male induces ovulation but delays its timing in seasonally anestrous goats. *Theriogenology* 2017 87, 148-153.
- RHIM, T., KUEHL, D. and JACKSON, G. Seasonal Changes in the Relationships between Secretion of Gonadotropin-Releasing Hormone, Luteinizing Hormone, and Testosterone in the Ram1. *Biology of Reproduction* 1993 48(1), 197-204.
- ROJAS, F., MANZO, J., SOTO-CID, A.H., ARANDA-ABREU, G.E., JUÁREZ, E., CORIA-ÁVILA, G.A., TOLEDO, R., LOCIA, J. y HERNÁNDEZ, M.A. El receptor de andrógenos en la fisiopatología prostática. *eNeurobiología*, 2015 2(2), 1-15.
- ROSA, H. and BRYANT, M. Seasonality of reproduction in sheep. *Small Ruminant Research* 2003 48(3), 155-171.
- ROSA, H., JUNIPER, D. and BRYANT, M. The effect of exposure to oestrous ewes on rams' sexual behavior, plasma testosterone concentration and ability to stimulate ovulation in seasonally anoestrous ewes. *Applied Animal Behaviour Science* 2000 67(4), 293-305.
- ROSA, H., SILVA, C. and BRYANT, M. The effect of melatonin treatment in rams on seasonal variation of testicular size and semen production parameters. *Small Ruminant Research* 2012 102(2-3), 197-201.
- ROSELLI, C. and STORMSHAK, F. The neurobiology of sexual partner preferences in rams. *Hormones and Behavior* 2009 55(5), 611-620.
- ROSELLI, C., LARKIN, K., SCHRUNK, J. and STORMSHAK, F. Sexual partner preference, hypothalamic morphology and aromatase in rams. *Physiology & Behavior* 2004 83(2), 233-245.
- SANFORD, L., PRICE, C., LEGGEE, D., BAKER, S. and YARNEY, T. Role of FSH, numbers of FSH receptors and testosterone in the regulation of inhibin secretion during the seasonal testicular cycle of adult rams. *Reproduction* 2002 123(2), 269-280.
- SANFORD, L., VOGLMAYR, J., VALE, W. and ROBAIRE, B. Photoperiod-Mediated Increases in Serum Concentrations of Inhibin, Follicle-

- Stimulating Hormone, and Luteinizing Hormone are Accentuated in Adult Shortened-Scrotum Rams without Corresponding Decreases in Testosterone and Estradiol. *Biology of Reproduction* 1993 49(2), 365-373.
- SARLÓS, P., EGERSEGI, I., BALOGH, O., MOLNÁR, A., CSEH, S. and RÁTKY, J. Seasonal changes of scrotal circumference, blood plasma testosterone concentration and semen characteristics in Racka rams. *Small Ruminant Research* 2013 111(1-3), 90-95.
- SCHLATT, S. and EHMCKE, J. Regulation of spermatogenesis: An evolutionary biologist's perspective. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2014 29, 2-16.
- SENGER, P. *Pathways to pregnancy & parturition*. Washington State University. 2nd ed. Washington, USA.: Current Conceptions, Inc, 2003. Pp. 215-230.
- SIMERLY, R., SWANSON, L., CHANG, C. and MURAMATSU, M. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: An in situ hybridization study. *The Journal of Comparative Neurology* 1990 294(1), 76-95. (dx.doi.org/10.1002/cne.902940107)
- SMITH, R. and DOBSON, H. Hormonal interactions within the hypothalamus and pituitary with respect to stress and reproduction in sheep. *Domestic Animal Endocrinology* 2002 23(1-2), 75-85.
- SPITZER, S., VOLBRACHT, K., LUNDGAARD, I. and KÁRADÓTTIR, R. Glutamate signalling: A multifaceted modulator of oligodendrocyte lineage cells in health and disease. *Neuropharmacology* 2016 110, 574-585.
- STOCCO, D.M., and McPHAUL, M.J. "Physiology of Testicular Steroidogenesis". En: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Third Edition. Edited by Jimmy D. Neill, Texas, USA. Elsevier ©, 2006. pp 977-1016.
- SUSETYARINI, R. The Level of Glutamic Acid in the Semen of Male White Rat (*Ratus Norwegicus*) after Being Treated with Tannin of *Pluchea Indica*. *Procedia Chemistry* 2015 14, 152-156.
- TEJADA, L., MEZA-HERRERA, C., RIVAS-MUÑOZ, R., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, R., CARRILLO, E., MELLADO, M. and VÉLIZ-DERAS, F. Appetitive and Consummatory Sexual Behaviors of Rams Treated with Exogenous Testosterone and Exposed to Anestrus Dorper Ewes: Efficacy of the Male Effect. *Archives of Sexual Behavior* 2016 46(3), 835-842.
- TORRES-MORENO, M., MEZA-HERRERA, C., GONZÁLEZ-BULNES, A., LÓPEZ-MEDRANO, J., MELLADO-BOSQUE, M., WURZINGER, M. and TREJO-CALZADA, R. Effect of exogenous glutamate supply on the onset of puberty in goats: I. Serum levels of insulin. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 2009 11, 193-196.

- UNGERFELD, R., CLEMENTE, N., BONJOUR, L. and ORIHUELA, A. Equine chorionic gonadotrophin administration to rams improves their effectiveness to stimulate anoestrous ewes (the “ram effect”). *Animal Reproduction Science* 2014 149(3-4), 194-198.
- VÁZQUEZ-GARCÍA, V. Sheep production in the mixed-farming systems of Mexico: where are the women?. *Rangelands* 2013 35(6), 41-46.
- WALKDEN-BROWN, S., RESTALL, B. and HENNIAWATI. The male effect in the Australian Cashmere goat. 3. Enhancement with buck nutrition and use of oestrous females. *Animal Reproduction Science* 1993 32(1-2), 69-84.
- WALKDEN-BROWN, S.W., MARTIN, G.B. and RESTALL, B.J. Role of male-female interaction in regulating reproduction in sheep and goats. *J Reprod Fertil Suppl* 1999 54, 241-255.
- WATKINS, J.C. and JANE, D.E. The glutamate story. *British Journal of Pharmacology* 2006 147, S100-S108.
- WEEMS, P., GOODMAN, R. and LEHMAN, M. Neural mechanisms controlling seasonal reproduction: Principles derived from the sheep model and its comparison with hamsters. *Frontiers in Neuroendocrinology* 2015 37, 43-51.
- WILL, R., HULL, E. and DOMINGUEZ, J. Influences of dopamine and glutamate in the medial preoptic area on male sexual behavior. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2014 121, 115-123.
- YOUNG, K. and NELSON, R. Mediation of seasonal testicular regression by apoptosis. *Reproduction* 2001 122(5), 677-685.
- ZARROUF, F., ARTZ, S., GRIFFITH, J., SIRBU, C. and KOMMOR, M. Testosterone and Depression. *Journal of Psychiatric Practice* 2009 15(4), 289-305.
- ZELEKE, M., GREYLING, J., SCHWALBACH, L., MULLER, T. and ERASMUS, J. Effect of progestagen and PMSG on oestrous synchronization and fertility in Dorper ewes during the transition period. *Small Ruminant Research* 2005 56(1-3), 47-53.
- ZISHIRI, O., CLOETE, S., OLIVIER, J. and DZAMA, K. Genetic parameters for growth, reproduction and fitness traits in the South African Dorper sheep breed. *Small Ruminant Research* 2013 112(1-3), 39-48.