



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



Facultad de Veterinaria  
Universidad de la República  
Uruguay

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**Programa de posgrados**

Efecto de la cópula y el factor de crecimiento neurológico  $\beta$  sobre la fase  
folicular y ovulación en ovejas

Juan Pedro Bottino

TESIS DE MAESTRÍA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL  
URUGUAY

2020



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**Programa de posgrados**

Efecto de la cópula y el factor de crecimiento neurológico  $\beta$  sobre la fase  
folicular y ovulación en ovejas

Juan Pedro Bottino

---

**Dr. Rodolfo Ungerfeld**

**Director de Tesis**

---

**Dr. Marcelo Ratto**

**Co-director**

**TESIS DE MAESTRÍA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL**

**URUGUAY**

**2020**

## INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS

Jorge Gil; DVMT, MS, PhD  
Facultad de Veterinaria  
Universidad de la República - Uruguay

José Delgadillo; MVZ, Dipl., PhD  
Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro - México

Glaucia Mota Bragança; DMV; MS, PhD  
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - Brasil

## ACTA DE EXAMEN

**CURSO:** Defensa de Tesis de Maestría

**LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA:** Sala Virtual de Plataforma Zoom, Facultad de Veterinaria, UdelaR, jueves 11 de febrero de 2021

**Tribunal:** Dr. Jorge Gil (Presidente), Dr. José Delgadillo, Dra. Gláucia Mota Bragança

CI ESTUDIANTE	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
4.175.341-8	BOTTINO GONZÁLEZ, Juan Pedro	SSS	12

PRESENTADOS	NO PRESENTADOS	APROBADOS	APLAZADOS	INSCRIPTOS
1	0	1	0	1

### TRIBUNAL

Dr. Jorge Gil (Presidente)

Dr. José Delgadillo

Dra. Gláucia Mota Bragança

### FIRMA



Gláucia Mota Bragança

**NOTA:** Las calificaciones de aprobación de la Tesis de Maestría pueden ser:  
B.B.B. – 6, o S.S.S. – 12

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer en primer lugar a mi tutor el Dr. Rodolfo Ungerfeld por su tiempo, dedicación, apoyo y generosidad en compartir sus conocimientos. También a mi co-tutor el Dr. Marcelo Ratto por toda la ayuda brindada, el conocimiento compartido y por recibirme tan bien en su laboratorio. Quisiera agradecerle al Dr. César Ulloa Leal quien me ayudó a realizar las mediciones hormonales y tan pacientemente compartió su conocimiento. Me gustaría agradecer también a la Dra. Mariana Kako, quien me enseñó y ayudó a realizar las ecografías en la parte experimental de este trabajo, así como a los bachilleres Maria Jesús Frisch, Monserrat Costa, Belen Gomez, Laura Blanco, Rodrigo Dematté, Micaela Moreira y Nicole Piquerez quienes me brindaron su ayuda en los trabajos experimentales. Agradezco también a la Dra. Rosa María Garcia, quien me brindó una gran ayuda durante el segundo trabajo experimental.

Quisiera agradecer y dedicar este trabajo a mi familia y amigos por el apoyo incondicional en todos los momentos y por hacer de este camino algo agradable.

A Dios, sin el cual nada de esto tendría propósito.

## ÍNDICE

RESÚMEN.....	8
ABSTRACT .....	9
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	10
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	10
2.1. El comportamiento estral .....	10
2.2. El pico preovulatorio de LH.....	11
2.2.1. Rol de los estrógenos .....	12
2.2.2. Rol de la progesterona .....	12
2.3. Desarrollo folicular.....	13
2.4. La ovulación.....	14
2.4.1. La ovulación inducida.....	14
2.5. Efecto de la cópula sobre la dinámica del estro en rumiantes .....	16
2.6. Inseminación artificial y ovulación.....	17
3. HIPÓTESIS .....	18
4. OBJETIVOS .....	18
5. EXPERIMENTO 1 .....	19
5.1 Materiales y métodos.....	19
5.1.1 Animales y su manejo.....	19
5.1.2. Examen ovárico mediante ecografía.....	20
5.1.3. Colecta de muestras de sangre y medición de las concentraciones de LH y 17 $\beta$ -estradiol .....	20
5.1.4. Definiciones y análisis estadístico .....	20
5.2. RESULTADOS.....	21
5.3. DISCUSIÓN .....	22
6. EXPERIMENTO 2 .....	23
6.1. Materiales y métodos.....	23
6.1.1. Animales y su manejo.....	23
6.1.2. Tratamientos.....	23
6.1.3. Examen ecográfico de los ovarios .....	24
6.1.4. Colecta de muestras de sangre y medición de las concentraciones de progesterona .....	24
6.1.5. Análisis estadístico .....	24
6.2 RESULTADOS.....	25
6.3. DISCUSIÓN .....	26
7. DISCUSIÓN GENERAL .....	28
8. CONCLUSIONES GENERALES .....	29

9. BIBLIOGRAFÍA .....	30
10. ANEXOS.....	40

## Anexo

El siguiente artículo está enviado a publicación, e incluido como Anexo 1 al final del documento:

Bottino JP, Pérez-Clariget R, Rodriguez MGK, Ratto M, Ungerfeld R. 2020. Multiple matings shortens ewes' estrous length and modifies the moment of ovulation, estradiol and LH secretion. Enviado a publicación. (Anexo 1).



## RESÚMEN

La cópula reduce la duración del celo y adelanta la ovulación en varias especies de rumiantes, aunque el mecanismo que desencadena esta respuesta no ha sido dilucidado. En cabras se ha propuesto que el estímulo mecánico del pene contra el fórnix vaginal es el responsable de este efecto; por otra parte, en especies de ovulación inducida como la llama, la presencia de una proteína en el plasma seminal del macho (factor de crecimiento neurológico beta;  $\beta$ NGF) desencadena el mecanismo ovulatorio. Este factor también está presente en el plasma seminal de especies de ovulación espontánea como los ovinos, pero se desconoce su rol en estas especies. Por tanto, la hipótesis de esta propuesta fue que la cópula reduce la duración del celo, adelanta la ovulación y modifica la secreción hormonal en el periodo periovulatorio. Además, que el tratamiento con  $\beta$ NGF induce la ovulación en la oveja. Se realizaron dos experimentos. En el primero se sincronizó el celo de 20 ovejas Corriedale y el comienzo de la receptividad se monitoreo cada 3 h con carneros, evitando la cópula. Al comienzo del estro, las ovejas fueron asignadas a dos grupos experimentales: 1) el estro fue monitoreado cada 3 h con carneros evitando la cópula (grupo CON), y 2) el estro fue monitoreado con carneros a los que se les permitió realizar la cópula cada 3 h (grupo COP). En cada control de celo se realizó una ecografía transrectal hasta detectar la ovulación, y se tomaron muestras de sangre para determinar  $17\beta$ -estradiol y LH mediante radioinmunoanálisis. La cópula acortó el celo ( $24,7 \pm 1,5$  h vs.  $30,4 \pm 1,5$  h,  $p=0,02$ ) y disminuyó la proporción de animales que ovularon antes del final del celo (9/10 vs. 3/10,  $p=0,009$ ). El área bajo la curva (ABC) de LH fue mayor en el grupo COP que en el CON ( $36,1 \pm 3,5$  ng<sup>h</sup>-1.mL<sup>-1</sup> vs.  $24,9 \pm 3,5$  ng<sup>h</sup>-1.mL<sup>-1</sup>  $p=0,03$ ), pero el ABC de  $17\beta$ -estradiol fue menor en el grupo COP ( $41,0 \pm 4,9$  pg<sup>h</sup>-1.mL<sup>-1</sup> vs.  $59,4 \pm 4,9$  pg<sup>h</sup>-1.mL<sup>-1</sup>  $p=0,01$ ). El segundo experimento se realizó durante la estación no reproductiva con 24 ovejas cruce Milchschaft X Finish Landrace a las que se le colocaron dispositivos intravaginales impregnados con progesterona que se mantuvieron durante 7 días. Al momento del retiro de los dispositivos las ovejas fueron asignadas a tres grupos experimentales: 1) no recibió ningún tipo de tratamiento (grupo Control, n = 8); 2) tratado con una dosis de GnRH (control positivo, grupo GEN, n = 7) y 3) tratado con una dosis de un purificado de  $\beta$ NGF (grupo BET, n = 9). Desde la aplicación de los tratamientos se realizaron ecografías transrectales luego cada 12 h para determinar el desarrollo folicular y la ovulación. A los 8 días de detectada la ovulación se realizaron ecografías para determinar la presencia del cuerpo lúteo (CL) y se tomaron muestras de sangre para determinar la concentración de progesterona. Solamente se detectaron ovulaciones en el grupo BET (8/9 vs 0/9 y 0/9;  $p = 0,001$ ) y la cantidad de folículos grandes por día fue mayor en este grupo respecto a los otros dos ( $1,14 \pm 0,08$  vs  $0,47 \pm 0,08$  y  $0,87 \pm 0,08$ ;  $p<0,001$ ). En las ovejas que ovularon se detectaron estructuras luteales pequeñas (<5 mm) y pobremente irrigadas; y solamente en una oveja del grupo GEN se detectó niveles luteales de progesterona. En síntesis, la cópula redujo la duración del celo, indujo una mayor secreción de LH, pero una menor secreción total de  $17\beta$ -estradiol y, además, la ovulación ocurrió mayormente luego del final del celo. El tratamiento con  $\beta$ NGF indujo la ovulación y aumentó la cantidad de folículos grandes, aunque no se formaron cuerpos luteos de duración normal.

## ABSTRACT

Mating reduces the estrous length and advances ovulation in several species of ruminants, although the mechanism that triggers this response has not been elucidated. In goats it has been proposed that the mechanical stimulation of the penis against the vaginal fornix is responsible for this effect; on the other hand, in species with induced ovulation as the llama, the presence of a protein in the seminal plasma of the male (neural growth factor beta;  $\beta$ NGF) triggers the ovulation. This protein is also synthesized into the seminal plasma of spontaneously ovulating species such as sheep, but its role in these species is still unknown. Therefore, the hypothesis of this thesis was that mating reduces the estrous length, advances ovulation and modifies the hormonal secretion in the periovulatory period. Furthermore, that the treatment with  $\beta$ NGF induces ovulation in anestrus sheep. Two experiments were performed. In the first, the estrus cycle of 20 Corriedale ewes was synchronized and the receptiveness began, monitoring it every 3 h with rams, avoiding copulation. When ewes came into estrus were assigned to two experimental groups: 1) estrus was monitored every 3 h with rams avoiding copulation (CON group), and 2) estrus was monitored with rams that were allowed to perform copulation every 3 h (COP group). In all these moments, and until ovulation was detected, ovaries were scanned with transrectal ultrasound was performed, and blood samples were collected to measure  $17\beta$ -estradiol and LH concentrations. Mating shortened estrous length ( $24.7 \pm 1.5$  h vs.  $30.4 \pm 1.5$  h,  $p = 0.02$ ) and decreased the proportion of animals that ovulated before the end of estrus (9/10 vs. 3/10,  $p = 0.009$ ). The area under the curve (AUC) of LH was greater in COP than in CON ewes ( $36.1 \pm 3.5$  ng.h<sup>-1</sup>.mL<sup>-1</sup> vs.  $24.9 \pm 3.5$  ng.h<sup>-1</sup>.mL<sup>-1</sup>  $p = 0.03$ ), but the AUC of  $17\beta$ -estradiol was lower in COP ewes ( $41.0 \pm 4.9$  pg.h<sup>-1</sup>.mL<sup>-1</sup> vs.  $59.4 \pm 4.9$  pg.h<sup>-1</sup>.mL<sup>-1</sup>  $p = 0.01$ ). The second experiment was performed during the non-reproductive season with 24 Milchschaaf and Finish Landrace crossbred ewes. Intravaginal devices impregnated with progesterone were inserted to all ewes and maintained for 7 days. At the time of device removal, the sheep were assigned to three experimental groups: 1) no treatment (Control group,  $n = 8$ ); 2) treated with GnRH (positive control, GEN group,  $n = 7$ ) and 3) treated with a purified  $\beta$ NGF (BET group,  $n = 9$ ). The ovaries were scanned with transrectal ultrasound from this moment until ovulation or a maximum of 84 h. Eight days later, ultrasound scans were performed to determine the presence of the corpus luteum (CL) and blood samples were collected to measure progesterone concentration. Ovulations were only detected in BET ewes (8/9 vs 0/9 and 0/9;  $p = 0.001$ ), and the number of large follicles per day was higher in this group compared to the other two ( $1.14 \pm 0.08$  vs  $0.47 \pm 0.08$  and  $0.87 \pm 0.08$ ;  $p < 0.001$ ). Small (<5 mm) and poorly perfused luteal structures were detected in those ewes that ovulated, and only one GEN ewe had luteal progesterone levels. In summary, mating reduced estrous length, induced a greater secretion of LH, but a lower total secretion of  $17\beta$ -estradiol and, furthermore, ovulation occurred mostly after the end of estrus. Treatment with  $\beta$ NGF induced ovulation and increased the number of large follicles, although corpora lutea of normal duration did not form.

## 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El ciclo estral en la oveja tiene una duración de 16 a 17 días, con pequeñas variaciones de acuerdo con la raza y la edad. Cada ciclo estral puede ser dividido en una etapa folicular (2-3 días) y una etapa luteal (13-14 días); en la etapa folicular normalmente está presente uno o varios folículos dominantes que secretan estrógenos, mientras que la etapa luteal está marcada por la presencia de un cuerpo lúteo (CL) que secreta progesterona. El final de la etapa folicular y comienzo de la luteal está marcado por una serie de eventos sucesivos que comprenden el pico de LH, la ovulación y la formación del CL. Durante el ciclo, cada evento ocurrido desencadena el evento siguiente, por lo que para su descripción se puede considerar arbitrariamente cualquier punto del ciclo como el comienzo. En la práctica se considera como día 0 del ciclo el momento en el que la oveja manifiesta el comportamiento sexual (estro) porque se puede detectar fácilmente.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. El comportamiento estral

El comportamiento de celo tiene tres componentes: atractividad, proceptividad y receptividad. La atractividad es un comportamiento pasivo, marcado por las características de la hembra que la hacen más o menos atractiva al macho; la proceptividad se caracteriza por una mayor movilidad y búsqueda activa de la hembra hacia el macho; y la receptividad implica la “inmovilidad activa” de la hembra cerca del macho permitiendo que el carnero realice la monta (Alexander et al., 1980). Esta última es, en la oveja, probablemente la única etapa en que es evidente que la oveja está en celo. Para que se desencadene el comportamiento estral en la oveja es necesaria la acción de la progesterona, seguida de una disminución de la concentración de la misma y un aumento de los estrógenos (Fabre-Nys & Gelez, 2007), hormonas que actúan sobre centros comportamentales situados en el hipotálamo.

Los estrógenos y la progesterona son hormonas esteroideas producidas a partir del colesterol. Los primeros son producidos fundamentalmente por los folículos en desarrollo mediante un proceso de aromatización de los andrógenos en las células de la capa de la granulosa (Goodman & Inskeep, 2006). Por otro lado, la progesterona es sintetizada en las células de la teca y de la granulosa del folículo, pero no es secretada en grandes cantidades ya que es utilizada como sustrato para la producción de los andrógenos que luego serán aromatizados a estrógenos. Luego del pico preovulatorio de LH existe un aumento importante en la secreción de progesterona debido a que estas células sufren cambios funcionales inducidos por la LH, proceso que se denomina luteinización y genera el CL (Hauger et al., 1977; Goodman & Inskeep, 2006). La relación temporal en la secreción entre estas hormonas es imprescindible para la manifestación del estro. Se ha observado que el tratamiento previo con progesterona, durante 3 días, aumenta la cantidad

de hembras en estro solo luego de la inyección de estrógenos. Además, reduce el tiempo necesario para la manifestación del comportamiento estral e incrementa su duración e intensidad (Fabre-Nys & Martin, 1991). Sin embargo, la administración simultánea de progesterona y estradiol no desencadena el comportamiento estral (Fabre-Nys & Gelez, 2007). Estos resultados indican que es necesario un período prolongado de concentraciones altas de progesterona, seguido de una disminución brusca de las mismas, y un aumento de la concentración sanguínea de estradiol. Lo anteriormente dicho es lo que ocurre durante el ciclo estral normal de la oveja, en el que la luteólisis y la caída de progesterona precede el aumento máximo de estradiol inducido por el folículo en desarrollo que va a ovular.

Algunos autores han propuesto que el núcleo ventromedial del hipotálamo (NVM) es el sitio de acción donde los estrógenos desencadenan el comportamiento estral (Blache et al., 1991; Goodman et al., 2006). En este sentido se ha observado que la progesterona induce un aumento en la cantidad de receptores de estrógenos en esta región, lo que explicaría la necesidad de un tratamiento previo con la misma para facilitar la acción de los estrógenos (Blache et al., 1994). La información actual apunta a que el control del comportamiento estral por parte del estradiol estaría mediado por la interacción de tres neurotransmisores: la dopamina, la GnRH y la oxitocina (Fabre-Nys & Gelez, 2007). La GnRH extiende la duración del comportamiento estral desencadenado por los estrógenos (Caraty et al., 2002), mientras que la oxitocina podría ejercer un efecto inhibitorio sobre este, ya que la administración local de la misma directamente en esta región del hipotálamo suprime la receptividad en la oveja (Fabre-Nys & Gelez, 2007).

El comportamiento estral comienza entre 6 y 16 h antes del pico preovulatorio de LH (Fabre-Nys et al., 2007). Este evento endócrino determina la ovulación y la luteinización de las células secretoras de estrógenos del folículo dominante, con lo que finaliza la secreción de estradiol al bloquearse la expresión de la aromatasa, enzima que transforma los andrógenos en estrógenos (Goodman & Inskeep, 2006). Además, la progesterona que comienza a secretar el cuerpo lúteo recién formado inhibe la secreción pulsátil de GnRH (Goodman et al., 2002). Teniendo en cuenta que los estrógenos son responsables de desencadenar el comportamiento estral y la GnRH de mantenerlo en el tiempo, la dinámica con la que ocurran los eventos ocurridos al final de la fase folicular y al comienzo de la fase luteal determinan el fin de dicho comportamiento.

## 2.2. El pico preovulatorio de LH

El pico de LH es una descarga masiva de esta hormona desde la hipófisis, que dura aproximadamente 12 h. En ese momento la secreción de LH se caracteriza por un aumento rápido de su concentración (4 – 8 h) hasta un nivel que es entre 20 y 80 veces superior al basal (Thiery & Martin, 1991), seguido de una rápida disminución. Este evento es clave durante el ciclo estral ya que, como se mencionó anteriormente, es la señal endocrina que desencadena la ovulación. Por lo tanto, debe ser cuidadosamente regulado por señales

endócrinas que determinan que este ocurra en sincronía con el comienzo del estro e induzca la ovulación de un folículo maduro. En las especies de ovulación espontánea, los esteroides ováricos son las hormonas que proveen las señales para que el pico preovulatorio de LH ocurra en el tiempo correcto.

### *2.2.1. Rol de los estrógenos*

La descarga masiva de LH producida durante el pico es desencadenada por las altas concentraciones circulantes de estradiol en la fase folicular tardía (Goodman & Inskeep, 2015). Como se mencionó anteriormente, este esteroide es secretado por las células de la granulosa (Goodman & Inskeep, 2006) y el aumento en la concentración de esta hormona que pasa a ser 5 a 10 veces mayor que en la etapa luteal (Hauger et al., 1977; Baird & Scaramuzzi, 1976), es resultado de la secreción por parte del/los folículo/s destinado/s a ovular (Baird et al., 1976; Hauger et al., 1977; Souza et al., 1998). La estimulación de la secreción de LH por parte de los estrógenos ocurre a dos niveles: hipofisario (Reeves et al., 1971; Aiyer, 1974) e hipotalámico (Caraty, 1989; Moenter, 1990). A nivel hipofisario, la acción de estos en las células gonadotropas facilita la acción estimuladora de la GnRH, incrementa la síntesis de LH y estimula el movimiento de los gránulos secretorios hacia la membrana celular (Goodman & Inskeep, 2006; Clarke, 2002).

En el hipotálamo el aumento de la concentración de estrógenos circulantes induce el pico preovulatorio de LH mediante un cambio en el patrón de la secreción de GnRH, que pasa de ser episódica a continua (Moenter et al., 1992; Evans et al., 1995a; Evans et al., 1995b). Un estudio en el que se utilizaron microimplantes de estradiol demostró que estos actúan en el núcleo ventromedial (VMN) y el arco (ARC) para inducir el pico de GnRH (Caraty et al., 1998). El aumento agudo en la secreción de GnRH es el responsable de desencadenar el pico de LH (Caraty et al., 2002).

### *2.2.2. Rol de la progesterona*

De manera similar a lo que ocurre con el comportamiento sexual, el pico de LH está regulado por una acción conjunta entre los estrógenos y la progesterona (Fabre-Nys, 1991; Caraty & Skinner, 1999). Algunos autores sugieren que el rol de esta hormona sería sincronizar la respuesta endócrina y comportamental, a la acción de los estrógenos (Karsch et al., 1980; Caraty & Skinner, 1999). La progesterona inhibe la secreción de LH en la oveja (Scaramuzzi et al., 1971), lo que podría estar mediado por una inhibición de la capacidad del estradiol de inducir el pico de GnRH y LH (Karsch et al., 1980; Evans et al., 2002a). En este sentido se ha observado que la progesterona disminuye la expresión de receptores para los estrógenos en las regiones hipotalámicas vinculadas a la secreción de GnRH (Blaustein & Brown, 1984; Bethea et al., 1996), indicando que este sería el mecanismo por el cual la progesterona inhibe la descarga de GnRH-LH. Un tiempo de exposición breve o una baja concentración de progesterona durante la fase luteal podría

resultar en la aparición de un pico de LH prematuro, lo cual induciría la ovulación de un folículo inmaduro (Skinner et al., 2000). Consecuentemente, el CL desarrollado podría no ser totalmente funcional. En este sentido, se ha visto que la ocurrencia prematura del pico de LH y, por tanto, de la ovulación reduce la secreción de progesterona en la etapa luteal siguiente, comprometiendo así la viabilidad de la gestación (McLeod et al., 1982; Murdoch & van Kirk, 1998). Además, la magnitud de la secreción de GnRH y por ende de LH inducida por los estrógenos, se ve afectada por la ausencia de un impacto previo de la progesterona (Caraty & Skinner, 1999). Aparentemente, este efecto estaría mediado por neuronas no secretoras de GnRH ubicadas en el área preóptica media (APM) (Richter et al., 2001). Estas neuronas proporcionarían un estímulo adicional a la liberación de GnRH inducida por el estradiol (Goodman & Inskoop, 2006).

### 2.3. Desarrollo folicular

El desarrollo de los folículos en la oveja ocurre en ondas. Estas ondas pueden ser definidas si se considera el crecimiento de los folículos a partir de los 3 hasta los 5 mm de diámetro (Evans, 2003), antes de su regresión u ovulación (Toosi et al., 2010). La dominancia folicular en la oveja se ha cuestionado por mucho tiempo, ya que el folículo destinado a ovular no genera una dominancia directa sobre los demás folículos y la supresión de nuevas ondas foliculares (Toosi et al., 2010), como ocurre en la vaca (Armstrong & Webb, 1997). En ovejas con ovulaciones dobles se ha observado que este evento es resultado de la reducción del proceso de atresia sobre los folículos grandes y chicos (Landau et al., 1996), lo que permite especular que la “dominancia” del folículo está más relacionada a la ausencia de dicho proceso. Sin embargo, se ha demostrado que los folículos de una onda comienzan a crecer solamente cuando el folículo mayor de la onda anterior detiene su crecimiento (Evans et al., 2000). Además, se ha observado que la ablación del folículo mayor permite el mantenimiento y crecimiento del segundo folículo mayor, el incremento en los niveles de FSH y el crecimiento de folículos pequeños (Evans et al., 2002b). Estas evidencias apoyan la teoría de que existe dominancia folicular en la oveja y que esta es responsable del desarrollo folicular en ondas. El crecimiento de folículos hasta los 2 mm de diámetro ocurre durante todo el ciclo estral ya que estos son independientes de la acción de las gonadotropinas (Goodman & Inskoop, 2006). A medida que los folículos crecen tanto las células de la teca como las de la granulosa adquieren receptores para LH, además de que aumentan considerablemente los niveles de aromatasa en las células de la granulosa. Estos folículos pasan a ser dependientes de las gonadotropinas y si la concentración circulante de estas disminuye u ocurre el pico de LH, estos folículos son pasibles de sufrir atresia u ovular, respectivamente.



## 2.4. La ovulación

La ovulación es un proceso mediante el cual el ovocito maduro es liberado por la ruptura del folículo ovulatorio. En las especies de ovulación espontánea como la oveja, el momento de la ovulación está cuidadosamente regulado por una retroalimentación positiva entre la GnRH hipotalámica, la LH hipofisaria y los estrógenos secretados en el ovario. Esta interacción endócrina sincroniza muy bien la ovulación con el comportamiento estral. En la oveja la ovulación ocurre entre 22 y 26 h luego del pico del LH (Cumming et al., 1973), y entre 24 y 36 h luego del comienzo del estro (Robertson, 1969).

El proceso ovulatorio comparte muchas características con el proceso inflamatorio (Espey, 1980). El pico de LH bloquea la conversión de progesterona a estrógenos mediante el aumento del AMPc en las células de la granulosa (Goodman & Inskeep, 2006), lo que resulta en un aumento de la primera en el tejido folicular (Lipner & Greep, 1971; Brannstrom & Janson, 1989). Estos autores han propuesto que el aumento de progesterona ocurrido luego del pico de LH es esencial para que se desencadene el proceso ovulatorio. La progesterona actúa a nivel folicular aumentando la secreción de prostaglandinas (PGE2 y PGF2 $\alpha$ ), lo que contribuye a producir hiperemia, aumentar la actividad proteolítica y estimular la contracción de células similares a las del músculo liso de la pared folicular. Además, el pico de LH induce la activación de una serie de factores y enzimas que resulta en un aumento de la colagenolisis favoreciendo el debilitamiento y la ruptura de la pared folicular (Goodman & Inskeep, 2006). Por lo tanto, la ovulación es un proceso que no ocurre por un estallido del folículo, sino que es gracias a la ruptura de la pared folicular (Rondell, 1970).

### 2.4.1. La ovulación inducida

El aumento de GnRH – LH preovulatorio puede darse de forma espontánea, o puede ser inducido por la cópula, según la especie que se trate. En las especies de ovulación espontánea los esteroides secretados por el folículo maduro son los responsables de desencadenar el pico de GnRH y consecuentemente de LH. Por otra parte, en las especies de ovulación inducida los estrógenos de por sí solos no son suficientes para desencadenar el pico de GnRH – LH, sino que este se desencadena por estímulos asociados a la cópula (Bakker & Baum, 2000). Estos estímulos pueden ser físicos o químicos: en la mayoría de las especies de ovulación inducida la intromisión peneana en el tracto femenino es la responsable de desencadenar el pico de LH (Bakker & Baum, 2000). En estas especies la cópula podría inducir señales neuroendocrinas que resultan en la descarga de GnRH. Existe escasa información sobre este efecto, pero en conejos (Spies et al., 1997; Kauffman & Raissman, 2005) y hurones (Lambert et al., 1990; Wersinger & Baum, 1997) neurotransmisores como el neuropéptido Y, la norepinefrina y los opioides endógenos

están implicados como mediadores entre el estímulo vagino - cervical y el pico preovulatorio de GnRH.

En los camélidos (camellos bactrianos, llamas, alpacas) existe una proteína presente en el plasma seminal de los machos que es la responsable de inducir el pico de LH y la ovulación luego de la cópula (Ratto et al., 2010). Esta proteína fue purificada a partir del plasma seminal de llamas macho y se comprobó que su inyección intramuscular desencadena el pico de LH y la ovulación, seguida de la formación de un CL en las llamas (Ratto et al., 2011). Posteriormente, en llamas y alpacas se determinó que esta proteína es el factor de crecimiento neurológico beta ( $\beta$ NGF, por sus siglas en inglés) (Kershaw-Young et al., 2012; Ratto et al., 2012). En estas especies la eyaculación es intrauterina y la cópula tiene una duración de 30 a 50 min (Bravo et al., 1990). La observación de que la cópula resulta en una abrasión e inflamación del endometrio uterino ocasionados por el pene permitió concluir que este hecho permite la absorción de  $\beta$ NGF desde el útero hacia la circulación (Ratto et al., 2005). En camélidos, el tratamiento con plasma seminal desencadena un pico de LH similar al observado luego de la cópula (Bravo et al., 1990; Bravo et al. 1991), aunque la duración del pico parecería ser más prolongada (Adams et al., 2005). No está claro como esta proteína ejerce su acción desencadenante del pico de LH, aunque Silva et al. (2011) sugieren que este efecto se da por una acción directa o indirecta sobre las células secretoras de GnRH. Sin embargo, en otros estudios se demostró que podría existir un efecto directo de  $\beta$ NGF sobre la hipófisis. Por ejemplo, el tratamiento con  $\beta$ NGF aplicado a cultivos de células pituitarias de llamas y bovinos induce la secreción de LH (Bogle et al., 2012). El  $\beta$ NGF ejerce su acción mediante la unión a receptores específicos y no específicos denominados trkA y p75, respectivamente (Adams et al., 2016). Se ha demostrado la presencia de receptores trkA en el hipotálamo de llamas (Carrasco et al., 2016) y en la hipófisis anterior de ratas (Patterson & Childs, 1994), lo que refuerza la idea de una doble acción en estas estructuras.

A partir de los resultados de algunos trabajos sobre  $\beta$ NGF se ha sugerido que esta proteína tiene un efecto luteotrófico. En llamas, el tratamiento con este factor resulta en la formación de CL más grandes, que duran más tiempo activos y secretan mayores cantidades de progesterona (Adams et al., 2005). Se ha sugerido que este efecto podría estar relacionado a la secreción prolongada de LH que ocurre durante el pico en animales tratados con esta proteína (Ratto et al., 2011; Silva et al., 2011; Tanco et al., 2011; Fernandez et al., 2014; Silva et al., 2014; Ulloa-Leal et al., 2014). Asimismo, algunos de estos autores proponen que el  $\beta$ NGF podría tener un efecto estimulador de la angiogénesis durante la formación del CL (Ulloa-Leal et al., 2014). En este estudio se demostró que las llamas tratadas con  $\beta$ NGF presentan un CL con mayor flujo sanguíneo y, además, mayor concentración plasmática de progesterona, que las tratadas con GnRH. Este efecto se ha demostrado también en especies de ovulación espontánea como los bovinos (Tanco et al., 2012; Tribulo et al., 2015), aunque, en este caso, parecería que el efecto luteotrófico es ejercido directamente a nivel ovárico. En esta especie se sugiere que hay una interacción entre  $\beta$ NGF y su receptor trkA en las células de la granulosa y teca del folículo dominante y en el CL desarrollado (Carrasco et al., 2016).



También se ha detectado la presencia de  $\beta$ NGF en el plasma seminal en especies de ovulación espontánea como los equinos, porcinos, bovinos, caprinos y ovinos (Harper et al., 1982; Druart et al., 2013), aunque no está claro que rol cumple esta proteína en estas especies. En vacas el tratamiento con  $\beta$ NGF purificada no indujo la ovulación (Tanco et al., 2012), pero afectó la dinámica de las ondas foliculares a través de la supresión del folículo dominante. Además, en esta especie el tratamiento con plasma seminal bovino resultó en una sincronización de la ovulación y tuvo un efecto luteotrófico (Tribulo et al., 2015).

## 2.5. Efecto de la cópula sobre la dinámica del estro en rumiantes

En varias especies de rumiantes se ha observado que la cópula disminuye la duración del celo y adelanta la ovulación respecto al comienzo del estro. Por ejemplo, la cópula de machos vasectomizados acorta el estro en las cabras (Romano et al. 1994; Romano et al., 1997; Romano et al., 2016), lo que aparentemente sería independiente de la cantidad de montas realizadas (Romano et al. 1994). Además, la cópula con machos vasectomizados también adelanta la ovulación en esta especie (Romano et al., 2016). En vacas también se ha visto que el estímulo cervical ocasionado por la penetración adelanta la descarga preovulatoria de LH (Randel et al., 1973). La monta también adelanta el pico preovulatorio de LH y, por lo tanto, la ovulación, en vacas (Marion et al., 1950), aunque otros autores no pudieron confirmar este hallazgo (Zalesky et al. 1985). En ovinos, si bien la información es escasa, se ha observado que el contacto con machos que puedan montar a las ovejas reduce la duración del celo (Fletcher et al., 1971) y adelanta el pico de LH y la ovulación, aunque sin modificar el tiempo entre estos dos últimos (Lindsay et al., 1975). Sin embargo, en estos trabajos no se registró la cópula, limitando la interpretación de la información.

El mecanismo mediante el que la cópula reduce la duración del celo y adelanta la ovulación en estas especies no ha sido claramente dilucidado. Se ha establecido un paralelismo entre estos efectos y los que ocurre en especies de ovulación inducida, por lo que se propuso que el principal determinante sería el estímulo mecánico del pene contra el fórnix vaginal (Romano, 1994, Romano & Benech, 1995). Por otra parte, debido a que en especies de ovulación espontánea se ha reportado la presencia de  $\beta$ NGF en el plasma seminal y de receptores para esta proteína en el eje hipotálamo-hipofiso-ovarico, la presencia de este factor podría ser el estímulo desencadenante de los efectos de la cópula.

En ovinos se ha prestado poca atención al efecto de la cópula, aunque se observó que la misma estimula la liberación de oxitocina a nivel hipotalámico y que esta hormona inhibe la receptividad sexual en la oveja (Fabre-Nys & Gelez, 2007). Este efecto inhibitorio de la oxitocina, inducido por la cópula podría explicar la reducción de la duración del celo en ovejas expuestas de forma continua a los machos.

## 2.6. Inseminación artificial y ovulación

La inseminación artificial (IA) es una biotecnología ampliamente usada en diferentes sistemas productivos para introducir nuevas razas o lograr el mejoramiento genético del rebaño de forma rápida. El éxito en la utilización de esta herramienta depende, entre otras cosas, del momento en el cual se realiza, ya que el momento de inseminación debe ajustarse en relación al momento en el que ocurre la ovulación. La mayor probabilidad de fertilizar se logra cuando la IA se realiza entre 12 y 18 luego del comienzo del celo (Ax et al., 2000), por lo que la detección de celos en forma eficiente es determinante del resultado obtenido. En nuestros sistemas productivos el celo de las ovejas es detectado mediante el uso de machos vasectomizados (retarjos) o castrados (capones) androgenizados (tratados con testosterona) (Fulkerson et al., 1981), y ocasionalmente con ovejas androgenizadas (Clarke, 1979). En cada caso se ejercen estímulos diferentes: cuando el celo se detecta con retarjos hay un estímulo físico del pene y a su vez, la eyaculación de plasma seminal (aunque de acuerdo a nuestro conocimiento, su composición no ha sido estudiada); cuando se detecta con capones, únicamente hay un estímulo físico, y cuando se usan ovejas androgenizadas no existe ningún estímulo vinculado a la cópula. Por lo tanto, es importante llevar a cabo estudios que permitan entender si la cópula tiene un efecto sobre la duración del celo, el pico de LH y el momento de la ovulación en ovinos y en que magnitud lo hace. Además, de ser así, se debería determinar si estas modificaciones podrían afectar el resultado de la IA cuando se detecta el celo con retarjos, capones u ovejas androgenizadas.

### 3. HIPOTESIS

En base a lo anteriormente mencionado se plantea la siguiente hipótesis general:

La cópula realizada frecuentemente afecta la duración del celo y modifica la secreción hormonal en el periodo periovulatorio con consecuencias sobre la ovulación. Además, el tratamiento con  $\beta$ NGF induce la ovulación y mejora el proceso de luteogénesis en la oveja.

Por lo tanto, se plantean las siguientes hipótesis específicas:

- la cópula (con penetración y eyaculación) realizada frecuentemente reduce la duración del celo, adelanta la ovulación y modifica el patrón de secreción de  $17\beta$ -estradiol y LH en la oveja;
- la administración intravenosa de  $\beta$ NGF a ovejas durante la estación no reproductiva, induce la ovulación.

### 4. OBJETIVOS

Los objetivos generales de la tesis fueron:

Determinar el efecto de la cópula sobre la duración del celo, la secreción hormonal en el período periovulatorio y la ovulación, y si el  $\beta$ NGF induce la ovulación en la oveja.

Los objetivos específicos de los trabajos realizados fueron los siguientes:

- determinar si la cópula modifica la duración del celo, el momento de la ovulación y la secreción de LH y estrógenos en ovejas;
- determinar si la administración de  $\beta$ NGF induce el desarrollo folicular y la ovulación en ovejas en anestro.

## 5. EXPERIMENTO 1

### 5.1 Materiales y métodos

#### 5.1.1 Animales y su manejo

El primer experimento se llevó a cabo en la Estación Experimental “Bernardo Rossengurt” de la Facultad de Agronomía, Universidad de la República (Cerro Largo, Uruguay) durante el mes de marzo, en la estación reproductiva de los ovinos. El protocolo experimental fue aprobado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) de la Facultad de Agronomía (n° 020300-002982-19). Se utilizaron 30 ovejas multíparas de la raza Corriedale (4 – 6 años,  $51.9 \pm 2,2$  kg, media  $\pm$  EEM) a las que se realizó un examen clínico y ginecológico y una ecografía transrectal mediante el uso de un transductor lineal de 7,5 MHz acoplado a un monitor IUStar (United Imaging, IUStar 160 Vet model, Beijing, China), 21 días antes del comienzo del experimento para confirmar su salud y aptitud reproductiva. Durante el período de estudio las ovejas fueron mantenidas a campo natural y suplementadas con afrechillo de arroz ( $300 \text{ g.animal}^{-1}.\text{día}^{-1}$ ). Se utilizaron, además, cuatro carneros de la raza Corriedale (4 – 6 años,  $49,8 \pm 3,3$  kg, media  $\pm$  EEM) con experiencia sexual previa, a los que se les realizó un examen andrológico un mes antes del comienzo del estudio.

Para reducir la cantidad de animales que fueron examinados simultáneamente, el estudio incluyó dos repeticiones, con un intervalo de 5 días entre cada una, utilizando 15 ovejas en cada repetición. El ciclo estral de las ovejas fue sincronizado utilizando dos dosis de un análogo de la PGF2-alfa (clorprostenol sódico;  $2,53 \mu\text{g/kg}$ ; Ciclase DL, Zoetis, Buenos Aires, Argentina), separadas por un intervalo de 14 días. El comienzo del celo fue controlado en corrales pequeños cada 3 h, desde las 24 h luego de administrada la segunda dosis en los que se introdujo un carnero al que se le colocó un bozal. Al mismo se le permitió montar a las ovejas teniendo especial cuidado de evitar la penetración, retirando al carnero una vez que se confirmaba la receptividad (cuando la hembra permaneció inmóvil aceptando la monta del macho).

En cada control en el que hubo un número par de ovejas en celo, cada una de ellas fue asignada al azar a uno de dos grupos experimentales hasta totalizar 10 ovejas por tratamiento. En un grupo, el celo fue controlado mediante el mismo sistema cada 3 h, determinando la receptividad de las ovejas, pero impidiendo la cópula (grupo CON, n=10, 5 en cada repetición). Para ello se controló el celo de la misma forma mencionada anteriormente. Las ovejas del otro grupo recibieron una cópula en cada momento de control, es decir, cada 3 h, verificando la ocurrencia de la eyaculación mediante la observación del golpe de riñón (grupo COP, n=10, 5 en cada repetición). El control de celo continuó hasta que cada oveja no aceptó más la monta del macho. Los carneros fueron utilizados rotativamente en cada control en ambos grupos.

### *5.1.2. Examen ovárico mediante ecografía*

Luego de confirmar la receptividad y antes de asignar cada oveja a un grupo experimental, los ovarios fueron examinados mediante ecografía transrectal utilizando un transductor lineal de 7,5 MHz acoplado a un monitor (United Imaging, IUStar 160 Vet model, Beijing, China), para determinar el tamaño del/de los folículo/s preovulatorio/s cada 3 h. Para esto el animal se mantuvo de pie, introduciéndole la sonda previamente lubricada con un gel en base a carboximetilcelulosa en el recto. Luego de localizar el útero, se buscaron y localizaron los ovarios y se determinó el diámetro de todos los folículos mayores a 3 mm. Se midieron dos diámetros de cada folículo y se calculó el promedio entre ambos. Esos folículos se midieron nuevamente en cada control para determinar su regresión u ovulación. Solamente fueron considerados como preovulatorios aquellos folículos cuyo diámetro superó los 5 mm y se consideró una ovulación cuando un folículo mayor a 5 mm desapareció. Las ecografías se llevaron a cabo cada 3 h desde que se detectó el celo hasta 3 h después de la ovulación.

### *5.1.3. Colecta de muestras de sangre y medición de las concentraciones de LH y 17 $\beta$ -estradiol*

Luego de realizada la ecografía, se tomaron muestras de sangre mediante punción de la vena yugular para determinar la concentración sérica de 17 $\beta$ -estradiol y LH. Las muestras fueron colocadas en tubos secos sin anticoagulantes, centrifugadas a 3000 rpm por 15 min y el suero fue separado y congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta realizar las mediciones hormonales. Las concentraciones séricas de LH fueron medidas utilizando un radioinmunoensayo de doble anticuerpo con LH ovina radioiodinada (LER 1374-A), anticuerpos ovinos CSU-204 y LH ovina estándar oLH-S25 (proporcionada por NIADDK, USA) en duplicados de 200  $\mu\text{L}$ , de acuerdo con el procedimiento descrito por Recabarren et al. (1996). El coeficiente de variación intraensayo fue de 3,6 % y el valor mínimo detectable del ensayo fue de 0,10 ng/mL. La concentración sérica de 17 $\beta$ -estradiol fue determinada mediante el uso del kit comercial DIAsource E2-RIA-CT (DIAsourceImmunoAssays S.A., Louvain-la-Nauve, Bélgica). El coeficiente de variación intraensayo fue de 5,5 % y el valor mínimo detectable del ensayo fue de 0,01 pg/mL.

### *5.1.4. Definiciones y análisis estadístico*

El comienzo del celo fue considerado como el tiempo medio entre el último control en el que la oveja no aceptó la monta y el primero en el que se constató la receptividad. El final del celo se definió como el tiempo medio entre el último control en el que la oveja aceptó la monta y el siguiente en el que ya no fue receptiva al macho. La duración del celo se consideró como el tiempo transcurrido entre el comienzo y el final del celo. El momento de la ovulación se consideró como el tiempo medio entre el último control en el que se observó el folículo preovulatorio y el siguiente en el que ya no se lo observó. El comienzo

del pico de LH se consideró como el momento en el que el primer valor fue mayor a 3 ng/mL, seguido de aumentos en la concentración hasta alcanzar un valor máximo, el cual se consideró como el momento del pico.

Dado que la duración de estas variables difirió entre animales, para la comparación de la secreción de estas hormonas se calcularon las áreas bajo la curva (ABC). Las ABC de LH y 17 $\beta$ -estradiol fueron calculadas utilizando el programa GraphPadPrism Demo (GraphPad Software Inc., San Diego, EEUU). La duración del pico de LH se definió como el intervalo de tiempo entre el comienzo del pico de LH y el momento en el que los valores retornaron a las concentraciones basales (valores similares a los registrados antes del comienzo del pico).

La duración del celo y del pico de LH, los intervalos comienzo del celo – ovulación, fin del celo – ovulación, comienzo del celo – comienzo del pico de LH, comienzo del pico de LH – fin del celo, comienzo del pico de LH – ovulación, el ABC de LH y 17 $\beta$ -estradiol y la relación AUC LH/17 $\beta$ -estradiol se compararon utilizando un modelo mixto (SAS University Edition). El modelo incluyó el tratamiento como efecto fijo y las repeticiones como efecto aleatorio. La cantidad de ovejas que ovularon antes o después del final del celo fue comparada mediante una prueba de probabilidad exacta de Fisher. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando  $p \leq 0,05$ , y tendencias cuando  $0,05 < p \leq 0,1$ .

## 5.2. Resultados

El celo fue más corto en las ovejas, lo que determinó que la ovulación se retrasara en relación al final del celo en las ovejas del grupo COP ( $p=0,02$  y  $p=0,03$ , respectivamente) (Tabla 1). La proporción de animales que ovularon antes del final del celo fue mayor en el grupo CON que en el COP (9/10 vs. 3/10, respectivamente;  $p=0,009$ ).

El ABC de LH fue mayor en las ovejas del grupo COP que en las del CON ( $p=0,03$ ); pero el ABC de 17 $\beta$ -estradiol fue mayor en las ovejas del CON que en las del COP ( $p=0,01$ ) (Tabla 2). La relación LH/17 $\beta$ -estradiol fue mayor en las ovejas del COP que en las del CON ( $p=0,04$ ).

Tabla 1. Media de mínimos cuadrados, EEM pooleado, valor de P y de F de diferentes variables reproductivas e intervalos registrados durante el período de detección de celo en ovejas control (CON) y copuladas (COP). En las ovejas del grupo CON el celo fue monitoreado cada 3 h, con un macho al que se le permitió montar, pero evitando la penetración mientras que en el grupo COP fue monitoreado con un carnero al que se le permitió realizar la penetración con eyaculación.

	CON	COP	EEM	P	F
Duración del celo (h)	30,4	24,7	1,5	0,02	6,53

Duración del pico de LH (h)	8,9	9,0	1,4	ns	0,00
Intervalos					
Comienzo del celo - ovulación (h)	25,8	26,8	1,6	ns	0,28
Fin del celo - ovulación (h)	-4,6	2,1	2,0	0,03	5,28
Comienzo del celo - pico de LH (h)	1,5	3,5	2,3	ns	1,86
Pico de LH - fin del celo (h)	22,8	16,6	2,3	ns	3,71
Pico de LH - ovulación (h)	19,4	18,7	2,1	ns	0,06

Tabla 2. Media de mínimos cuadrados, EEM pooleado, valor de P y de F del área bajo la curva (ABC) de LH y 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) y la relación LH/E<sub>2</sub> en los grupos control (CON) y copula (COP) durante el período de detección del celo. En las ovejas del grupo CON el celo fue monitoreado cada 3 h, con un macho al que se le permitió montar, pero evitando la penetración mientras que en el grupo COP fue monitoreado con un carnero al que se le permitió realizar la penetración con eyaculación.

	CON	COP	EEM	P	F
ABC LH (ng <sup>h</sup> -1.mL <sup>-1</sup> )	24,9	36,1	3,5	0,03	4,93
ABC E <sub>2</sub> (pg <sup>h</sup> -1.mL <sup>-1</sup> )	59,4	41,0	4,9	0,01	6,93
LH/E <sub>2</sub> (ng/pg)	0,5	0,9	0,1	0,04	4,89

### 5.3. Discusión

La cópula redujo la duración del celo sin modificar el intervalo comienzo del celo – ovulación, pero resultando en que las ovulaciones ocurrieran mayormente luego de finalizado el período de receptividad. Este hecho lleva a cuestionar que la ovulación en la oveja ocurra como norma antes del final de celo (Jainudeen et al., 2016). En este sentido, la mayor cantidad de LH secretada en el grupo COP podría iniciar el proceso de luteinización del folículo preovulatorio de forma temprana, y por tanto determinar que la cantidad de estradiol secretada fuera menor en estas ovejas. Este hecho podría tener un impacto en la viabilidad del ovocito ya que el ambiente por el cual transitaría en el oviducto podría verse modificado por estos cambios en la relación de hormonas periovulatorias.

La secreción de LH se da mediante una retroalimentación positiva entre esta y los estrógenos ováricos, aunque en el grupo COP, la menor secreción total de estradiol parece no haber afectado la secreción de LH. Más aún, la cantidad de LH secretada fue mayor que en el grupo CON. El estímulo vagino-cervical también induce la secreción de oxitocina (Kendrick et al., 1986), hormona que, en otras especies, se ha demostrado que estimula la secreción hipofisaria de LH (ratas, humanos y perros: Shibusawa et al., 1955; ratones: Robinson et al., 1985; monos: O’Byrne et al., 1990; caballos: Alexander et al., 1995), lo que podría ser una explicación de lo que ocurre en la oveja.

El efecto de la cópula sobre la duración del celo podría tener implicancias importantes en el proceso de selección sexual. Durante la competencia sexual, la progenie individual

producida por diferentes carneros no estaría influenciada solamente por el comportamiento social sino también por las dinámicas de la cópula. En condiciones de campo se ha visto que los carneros prefieren determinadas hembras y que diferentes carneros seleccionan las mismas ovejas para copular (Tilbrook & Lindsay, 1987). Esos carneros con cópulas preferenciales y repetidas determinarían una reducción del periodo estral. Así, en ovejas receptivas, la cópula repetida de un mismo macho (Ungerfeld & Gonzalez-Pensado, 2009; Ungerfeld & Lacuesta, 2015), reduciría la duración del período de receptividad, aumentando la probabilidad de que la descendencia producida sea del carnero que más cópulas realiza.

## 6. EXPERIMENTO 2

### 6.1. Materiales y métodos

#### 6.1.1. Animales y su manejo

El segundo experimento se llevó a cabo en la Estación Experimental “Wilson Ferreira Aldunate” del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) (Canelones, Uruguay) durante el mes de octubre, fuera de la estación reproductiva de los ovinos. El protocolo experimental fue presentado a la CEUA de INIA. Se utilizaron 24 ovejas de una cruce que tiene como base las razas Milchschaf y Finish Landrace (1 – 2 años, 50,7 ± 2,5 kg) a las que previamente se les realizó un examen clínico y ginecológico y una ecografía transrectal mediante el uso de un transductor lineal de 7,5 MHz acoplado a un monitor IUStar, para determinar su salud y aptitud reproductiva.

Durante el período de estudio las ovejas se mantuvieron a campo natural suplementadas con fardos de moha. Se insertaron dispositivos intravaginales siliconados impregnados con progesterona (0,35 g de progesterona, CIDR Ovis, Zoetis, Porto Salvo, Portugal) que se mantuvieron durante 7 días hasta su retiro, 24 h antes de aplicar los tratamientos.

#### 6.1.2. Tratamientos

Al momento del retiro de los dispositivos intravaginales los animales se dividieron homogéneamente según la edad, el peso y la raza en tres grupos experimentales. Las ovejas del primero no recibieron ningún tipo de tratamiento (grupo Control, n = 8), las del segundo recibieron un análogo de GnRH (gonadorelina acetato, 50 µg/animal IV, Syntex, Buenos Aires y Argentina) (grupo GEN, n = 7), y las del tercero una dosis de un purificado de β-NGF (1 mg/animal IV) obtenido del plasma seminal de llamas mediante el método descrito por Ratto et al. (2012), (grupo BET, n = 9). El efecto del β-NGF fue verificado mediante bioensayo de ovulación en llamas.



### *6.1.3. Examen ecográfico de los ovarios*

Se realizaron observaciones ecográficas de los ovarios al momento del retiro de los dispositivos, al aplicar los tratamientos, y luego cada 12 h hasta detectar la ovulación u 84 h posteriores al tratamiento, registrando la presencia y tamaño de todos los folículos mayores a 3 mm. Las ecografías se llevaron a cabo con el animal en pie introduciendo por el recto un transductor lineal de 7,5 MHz, previamente lubricado con un gel de carboximetilcelulosa, acoplado a un monitor IUStar. Una vez localizado el útero se procedió a ubicar los ovarios a ambos lados de este y medir en cada uno de ellos el diámetro de todos los folículos mayores a 3 mm. Se tomaron dos medidas del diámetro folicular y se calculó el promedio entre ambos valores. Posteriormente estos folículos fueron medidos en cada control ecográfico para determinar su crecimiento, y su ovulación o regresión. Se consideró que los folículos mayores a 4 mm eran potencialmente ovulatorios, y que ocurrió ovulación cuando el folículo mayor desaparecía en el siguiente control ecográfico (Roelofs et al., 2004). A los 8 días, luego de detectar la ovulación, se realizaron nuevamente ecografías para determinar la presencia de CL en el ovario en el cual se observó la ovulación.

### *6.1.4. Colecta de muestras de sangre y medición de las concentraciones de progesterona*

Al momento de realizar las ecografías para determinar la presencia del CL se tomaron muestras de sangre mediante punción de la vena yugular. Las muestras fueron colocadas en tubos secos sin anticoagulantes, centrifugadas a 3000 rpm por 15 min y el suero fue separado y congelado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para posteriormente determinar los niveles de progesterona circulantes mediante radioinmunoanálisis (RIA) en fase líquida. El coeficiente intraensayo fue de 17,9 % y 7,0 % para los controles alto y bajo, respectivamente. La sensibilidad del ensayo fue de 0,09 ng/mL.

### *6.1.5. Análisis estadístico*

La frecuencia de ovejas que ovularon se comparó mediante el test de probabilidad exacta de Fisher. El tamaño del folículo mayor y el segundo hasta la ovulación, del folículo mayor hasta las 48 h, la cantidad de folículos grandes ( $> 4\text{ mm}$ ) y medianos ( $2 - 4\text{ mm}$ ) se compararon utilizando un modelo mixto (SAS University Edition). El modelo incluyó el tratamiento, el tiempo y su interacción como efectos fijos. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando  $p \leq 0,05$ , y tendencias cuando  $0,05 < p \leq 0,1$ .

## 6.2 Resultados

El resultado de la cantidad de ovulaciones, los tamaños foliculares hasta la ovulación, del folículo mayor hasta las 48 h de aplicados los tratamientos, y de la cantidad de folículos grandes y medianos por día, se presentan en la Tabla 3. Todas las ovejas que ovularon, ovularon solamente un folículo, y fueron todas del grupo BET ( $p=0,001$ ). A su vez, la cantidad de folículos grandes por día fue mayor en este grupo que en los grupos Control y GEN ( $p<0,001$ ). Por otra parte, hubo una tendencia a que la cantidad de folículos medianos por día fuera mayor en el grupo GEN que en los grupos Control y BET ( $p=0,053$ ). Además, en 3 ovejas del grupo GEN en que no se observaron ovulaciones, el día 8 se observó la presencia de quistes luteales caracterizados como estructuras redondeadas hipoecóicas mayores a 10 mm y con bordes con aspecto luteal intensamente irrigados. El tamaño del folículo mayor no fue significativamente diferente entre grupos, pero el tamaño del segundo folículo fue menor en las ovejas del grupo GEN que en las de los grupos Control y BET ( $p<0,001$ ). Solamente se detectaron niveles luteales de progesterona en una oveja del grupo GEN, que era una de las que presentaba un quiste luteal.

Tabla 3. Medias de mínimos cuadrados, EEM pooleado y valor P de ovulaciones y tamaños foliculares registrados mediante controles ecográficos realizados cada 12 h, luego de aplicar los tratamientos (Control, GEN y BET).

	Control	GEN	BET	EEM	P
Ovejas que ovularon	0	0	8	-	0,001
Diámetro del folículo mayor hasta la ovulación (mm)	3,8	3,6	3,7	0,02	ns
Diámetro del segundo folículo hasta la ovulación (mm)	3,4 <sup>a</sup>	1,5 <sup>b</sup>	3,3 <sup>a</sup>	0,01	0,001
Diámetro del folículo mayor hasta 48 h post tratamiento (mm)	4,2 <sup>a</sup>	3,4 <sup>b</sup>	4,1 <sup>a</sup>	0,02	0,007
Cantidad de folículos mayores a 4 mm/día	0,87 <sup>a</sup>	0,47 <sup>b</sup>	1,14 <sup>c</sup>	0,08	0,001
Cantidad de folículos medianos (2-4 mm)/día	1,05 <sup>a</sup>	1,3 <sup>b</sup>	0,92 <sup>a</sup>	0,10	0,053

Distintas letras en la misma fila:  $P<0,05$

### 6.3. Discusión

En el presente trabajo, la administración de  $\beta$ NGF purificado a partir del plasma seminal de llamas macho indujo la ovulación en ovejas en anestro estacional. Si bien no se demostró el mecanismo por el que podría haber actuado el  $\beta$ NGF, para desencadenar un pico de LH debería haber inducido cambios a nivel hipotálamico, ya sea en forma directa o aumentando la sensibilidad a los estrógenos que podrían haberse secretado. La distribución de neuronas secretoras de GnRH en el hipotálamo de las llamas es similar a la observada en ovejas (Carrasco et al., 2016). En ovejas la acción de los estrógenos para la liberación de GnRH no ocurre directamente sobre las células GnRH, sino que participan interneuronas que expresan receptores para estrógenos y que secretan péptidos como la kisspeptina, la neuroquinina B y la dinorfina (Merkley et al., 2011). La secreción de estos péptidos por parte de estas neuronas, regulada por los estrógenos, es quien modula la secreción del pico preovulatorio de GnRH. En llamas se ha propuesto que el  $\beta$ NGF actúa sobre estas neuronas que expresan receptores trkA (Carrasco, 2016). Además, estas células se encuentran en estrecho contacto con el tercer ventrículo sugiriendo que  $\beta$ NGF atravesaría la barrera hematoencefálica y alcanzaría el fluido cerebro espinal, quedando disponible para interactuar con sus receptores (Carrasco, 2016). Si bien en ovejas no se ha demostrado la presencia de receptores trkA a nivel hipotalámico, esta parece ser una buena hipótesis para explicar la acción del tratamiento con  $\beta$ NGF sobre la ovulación en el presente trabajo. Si bien es importante tratar de entender como  $\beta$ NGF ejerce este efecto en las ovejas, es interesante destacar la gran efectividad con la que indujo la ovulación (8 de 9 ovejas). Sin embargo, la regresión prematura de los CLs formados deja la interrogante de su efectividad luteogénica, al menos en animales en anestro.

Además de inducir la ovulación el tratamiento con  $\beta$ NGF resultó en un aumento de la cantidad de folículos grandes, lo que implica que hubo un efecto positivo sobre crecimiento folicular preovulatorio. Por un lado, este efecto también podría adjudicarse a la acción a nivel central de esta proteína. En vacas la administración de  $\beta$ NGF indujo un aumento en la cantidad circulante de FSH (Tanco et al., 2012), además de retrasar la regresión del folículo subordinado mayor y adelantar la emergencia de la siguiente onda folicular. Basados en que el  $\beta$ NGF puede inducir la secreción de gonadotrofinas en las células de la hipófisis *in vitro* (Bogle et al., 2012), estos autores plantearon que este efecto podría explicar el aumento en la secreción de FSH. Esto también estimularía el crecimiento de los folículos subordinados que pasarían a competir con el folículo dominante, resultando en un retraso en el desarrollo del folículo mayor. Esta podría ser una posible explicación de la mayor cantidad de folículos grandes observados en el grupo  $\beta$ NGF.

También es posible que en el presente trabajo el  $\beta$ NGF tuviera una acción directa sobre los folículos en desarrollo. En este sentido, en varios estudios se ha sugerido que el  $\beta$ NGF podría tener un efecto a nivel local en el ovario, específicamente a nivel folicular. Se ha demostrado en ensayos *in vitro* que el fluido folicular de los folículos medianos y grandes

de ovejas presentan cantidades significativas de  $\beta$ NGF y que este factor de crecimiento se sintetiza en respuesta a la liberación de FSH y LH (Mattioli et al., 1999). Estos autores proponen que las células de la granulosa serían la fuente de esta proteína ya que en folículos medianos y grandes estas células presentan receptores para ambas gonadotrofinas. Además, se ha descrito la presencia de receptores de alta afinidad para  $\beta$ NGF en células de la granulosa y de la teca de los folículos en cabras (Ren et al., 2005) y en las células del cumulus en ovejas, generando la hipótesis de que este factor actuaría de forma paracrina en el folículo en el período preovulatorio con un rol fundamental en la maduración del ovocito (Barboni et al., 2002). De hecho, en ratas se ha demostrado que el bloqueo de  $\beta$ NGF reduce la tasa de ovulación (Dissen et al., 2002). En cabras (Ren et al., 2005), vacas (Dissen et al., 2000; Tanco et al., 2012; Tribulo et al., 2015) y ovejas (Mattioli et al., 1999; Barboni et al., 2002) se ha sugerido que esta proteína podría ser clave a nivel local para el desarrollo folicular y el proceso ovulatorio. Por ejemplo, se ha reportado que  $\beta$ NGF aumenta la secreción de prostaglandina E y progesterona por parte de las células de la teca (Dissen et al., 2000); este hecho refuerza la teoría de que este factor neurotrópico es esencial para la ovulación ya que ambas hormonas están asociadas a la ruptura de la pared folicular (Murdoch et al., 1986).

El tratamiento con GnRH en el presente trabajo disminuyó la cantidad de folículos grandes y al mismo tiempo se observó una tendencia a que aumentara la cantidad de folículos medianos, sin inducir ovulaciones. Probablemente el tratamiento con esta hormona retrasó el crecimiento de los folículos, explicando el aumento de la cantidad de folículos medianos. El tratamiento con GnRH provoca un fuerte estímulo a la secreción de estrógenos mediante la acción de la LH y FSH hipofisarias (Goodman & Inskeep, 2006), hormona que tiene un efecto supresor sobre el desarrollo del folículo dominante con un retraso en la emergencia de la siguiente onda folicular (Ungerfeld et al., 2004). Esto en conjunto podría explicar el efecto observado en el grupo tratado con GnRH.

La concentración de progesterona en el grupo  $\beta$ NGF a los 8 días luego de detectar la ovulación estuvo por debajo de los niveles luteales. Este hecho puede ser explicado por una regresión prematura del CL (RPCL) formado. La RPCL es una alteración funcional del CL que se caracteriza por una disminución en su duración, regresando a los 3 a 4 días posteriores a su formación (Saharrea et al., 1998; Oliveira & Feliciano 2013). Esto ocurre frecuentemente en el período de transición del anestro estacional a la ciclicidad, en la primera ovulación en la pubertad (Christensen et al., 2014) o luego de la estimulación a ovular con efecto macho (Rodríguez Iglesias et al., 2013). Se forman estructuras luteales pequeñas, menores a 5 mm (Oliveira et al., 2009; Gusmão et al., 2013), que producen concentraciones de progesterona por debajo de 1 ng/mL (Cervantes et al., 2007). Al momento de realizar la ecografía, se observaron CL pequeños y pobremente irrigados. Las causas de la RPCL no están bien establecidas; algunos autores proponen que la ovulación ocurrida sin una exposición previa a niveles altos de progesterona explicaría este fenómeno (Cognie et al., 1982). Esto fue tenido en cuenta en el presente trabajo ya que antes de aplicar los tratamientos se utilizaron dispositivos intravaginales impregnados con progesterona. Sin embargo, se han propuesto otras posibles causas de la RPCL, entre ellas un soporte gonadotrófico inadecuado. En este caso las células luteales formadas

serían de mala calidad debido a una exposición inadecuada a las gonadotropinas al ser ovejas en anestro (Chemineau et al., 2006). Los CL formados en estas circunstancias secretan una cantidad insuficiente de progesterona que no es capaz de inhibir la secreción de LH y la secreción endometrial de  $PGF2\alpha$ , ocasionando así la RPCL.

Debido a su potencialidad como herramienta a ser tenida en cuenta en el manejo reproductivo de los ovinos, es importante seguir trabajando en estudios que demuestren como su aplicación puede ser utilizada en biotecnologías reproductivas. La producción ovina se ve limitada, en gran medida, por el propio ciclo reproductivo de las ovejas. Las ovejas son una especie de reproducción estacional que ciclan y pueden quedar preñadas, dependiendo de la raza, desde febrero a julio y su gestación dura aproximadamente 5 meses. Esto determina no ocurran partos entre noviembre y junio (Ungerfeld & Rubianes, 2001), por lo que la utilización de técnicas que permitan inducir ciclos estrales y obtener partos fuera de la estación reproductiva puede ser de vital importancia para el aumento de la producción de corderos. También sería de interés estudiar su incorporación en tratamientos de sincronización de celos, para determinar si es posible mejorar el resultado, o que el uso de  $\beta$ NGF constituya una alternativa al uso de eCG. En este sentido la puesta a punto y el uso de tratamientos con  $\beta$ NGF podrían brindar una forma efectiva y sencilla de intensificar la producción ovina obteniendo una mayor cantidad de partos por oveja, por año.

En conclusión,  $\beta$ NGF aumentó la cantidad de folículos grandes e indujo la ovulación en ovejas tratadas durante el anestro estacional.

## 7. DISCUSIÓN GENERAL

Teniendo en cuenta los resultados de estos trabajos se debe resaltar sus posibles implicancias prácticas. Un punto importante en este sentido es el manejo que se realiza previo a la IA con el fin de preparar a los animales y asegurar el éxito de esta biotecnología. En este sentido la detección del celo para optimizar el momento de la IA en relación a la ovulación es un punto crítico para aumentar las probabilidades de preñez. Como se mencionó anteriormente, en general la detección de celos se realiza mediante el uso de retarjos, capones u ovejas androgenizadas. En cualquiera de estos casos los animales detectores son pintados o se les colocan arneses de forma que se pueda identificar las ovejas que están en celo (Radford et al. 1960). En cada caso se ejercen estímulos diferentes, algunos de los que fueron estudiados en el presente trabajo. Cuando se detecta celo con retarjos, está presente el estímulo físico del pene y a su vez, la eyaculación de plasma seminal; cuando se detecta con capones androgenizados solamente hay un estímulo físico, y cuando se usan ovejas androgenizadas no existe ningún estímulo vinculado a la cópula. En el experimento 1, el grupo COP recibió un estímulo físico acompañado de eyaculación mediante la realización de la cópula por parte del carnero. En este caso no se puede discriminar cuál de los posibles mecanismos de estimulación fue el responsable de disminuir la duración del celo, modificar el momento de la

ovulación respecto al final del celo e inducir los cambios endocrinos observados. Para ello se debería realizar otros estudios en los que se pudiera tratar a los animales con estímulos físicos y plasma seminal para poder determinar cuál de ellos desencadena tales efectos. En base a lo observado en otras especies como la cabra, parecería que el estímulo físico juega un papel fundamental (Romano, 1994; Romano & Benech, 1995). Sin embargo,  $\beta$ NGF está presente en el plasma seminal de los carneros (Harper et al., 1982; Druart et al., 2013) y los resultados obtenidos en el experimento 2 demuestran claramente que el tratamiento con esta proteína modifica la dinámica folicular e induce la ovulación en las ovejas, con lo que se refuerza la teoría de que el plasma seminal eyaculado durante la cópula podría tener un rol en los resultados obtenidos en el experimento 1. Teniendo en cuenta esto, y retomando lo anteriormente dicho, se debería considerar si la forma en la que se detecta los celos modifica la respuesta a la IA. Claramente se deberían realizar más estudios que analicen los resultados de la IA de acuerdo a la forma en que se detecta el celo, lo que potencialmente podría mejorar los resultados de la IA.

## 8. CONCLUSIONES GENERALES

En síntesis, la cópula redujo la duración del celo, modificó el momento de la ovulación respecto al final del celo, aumentó la cantidad total de LH secretada durante el pico y redujo la secreción total de estrógenos. Por otra parte, el tratamiento con  $\beta$ NGF aumentó la cantidad de folículos grandes e indujo la ovulación en ovejas en anestro, aunque ésta fue seguida de la formación de cuerpos lúteos de regresión prematura.

## 9. BIBLIOGRAFIA

Adams GP, Ratto MH, Huanca W, Singh J. (2005). Ovulation-inducing factor in the seminal plasma of alpacas and llamas. *Biol Reprod* 73:452–457.

Adams GP, Ratto MH, Silva ME, Carrasco RA. (2016). Ovulation-inducing factor (OIF/NGF) in seminal plasma: a review and update. *Reprod Dom Anim* 51:4-17.

Alexander G, Signoret JP, Hafez, E.S.E. (1980). Sexual, maternal and neonatal behaviour. En: Hafez, E.S.E. *Reproduction in Farm Animals*. Ed. Hafez, E.S.E. 4° ed. Lea and Febiger, Philadelphia, pp304–334.

Alexander SL, Irvine CHG, Shand N, Evans MJ. (1995). Is luteinizing hormone secretion modulated by endogenous oxytocin in the mare? Studies on the role of oxytocin and factors affecting its secretion in estrous mares. *Biol Reprod* 1:177-187.

Aiyer MS, Fink G, Greig F. (1974). Changes in the sensitivity of the pituitary gland to luteinizing hormone releasing factor during the estrous cycle of the rat. *J Endocrinol* 60:47–64.

Armstrong DG, Webb R. (1997). Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. *Rev Reprod* 2:139–146.

Ax RL, Dally BA, Didion BA, Lenz RW, Love CC, Varner DD, Hafez B, Bellin ME (2000) Inseminación artificial. En 'Reproducción e inseminación artificial en animales'. (Eds. ESE Hafez, B Hafez) pp. 387-400 (McGraw-Hill: Iztapalapa).

Baird DT, Scaramuzzi RJ. (1976). Changes in the secretion of the ovarian steroid and pituitary luteinizing hormone in the peri-ovulatory period in the ewe: the effect of progesterone. *J Endocrinol* 70:237-245.

Baird DT, Land RB, Scaramuzzi RJ, Wheeler AG. (1976). Endocrine changes associated with luteal regression in the ewe: the secretion of ovarian oestradiol, progesterone and androstenedione and uterine prostaglandine F<sub>2</sub>α throughout the oestrous cycle. *J Endocrinol* 69:275-286.

Bakker J, Baum MJ. (2000). Neuroendocrine regulation of GnRH release in induced ovulators. *Front Neuroendocrinol* 21:220-262.

Barboni B, Mattioli M, Gioia L, Turriani M, Capacchietti G, Berardinelli P, Bernabo N. (2002). Preovulatory rise of NGF in ovine follicular fluid: possible involvement in the control of oocyte maturation. *Microsc Res Tech* 59:516-521.

Bethea CL, Brown NA, Kohama SG. (1996). Steroid regulation of estrogen

and progesterin receptor messenger ribonucleic acid in monkey hypothalamus and pituitary. *Endocrinology* 137:4372–4383.

Blache D, Fabre-Nys CJ, Venier G. (1991). Ventromedial hypothalamus as a target for oestradiol action on proceptivity, receptivity and luteinizing hormone surge of the ewe. *Brain Res* 546:241-249.

Blache D, Batailler M, Fabre-Nys C. (1994). Oestrogen receptors in the preoptic-hypothalamic continuum: immunohistochemical study of the distribution and cell density during induced oestrus cycle in ovariectomized ewe. *J Neuroendocrinol* 6:329-339.

Blaustein JD, Brown TJ. (1984). Progesterone decreases the concentration of hypothalamic and anterior pituitary estrogen receptors in ovariectomized rats. *Brain Res* 304:225–236.

Bogle OA, Ratto MH, Adams GP. (2012). Ovulation-inducing Factor (OIF) induces LH secretion from pituitary cells. *Anim Reprod Sci* 133:117–122.

Brannstrom M, Janson PO. (1989). Progesterone is a mediator in the ovulatory process of the in vitro-perfused rat ovary. *Biol Reprod* 40:1170-1178.

Bravo PW, Fowler ME, Stabenfeldt GH, Lasley BL. (1990). Endocrine responses in the llama to copulation. *Theriogenology*, 33:891–899.

Bravo PW, Stabenfeldt GH, Lasley BL, Fowler ME. (1991). The effect of ovarian follicle size on pituitary and ovarian responses to copulation in domesticated South American camelids. *Biol Reprod* 45:553–559.

Caraty A, Locatelli A, Martin GB. (1989). Biphasic response in the secretion of gonadotrophin-releasing hormone in ovariectomized ewes injected with estradiol. *J Endocrinol* 123:375–382.

Caraty A, Fabre-Nys C, Delaleu B. (1998). Evidence that the mediobasal hypothalamus is the primary site of action of estradiol in inducing the preovulatory gonadotropin release hormone surge in the ewe. *Endocrinology* 139:1752-1760.

Caraty A, Skinner D. (1999). Progesterone priming is essential for the full expression of the positive feedback effect of estradiol in inducing the preovulatory gonadotropin-releasing hormone surge in the ewe. *Endocrinology* 140:165-170.

Caraty A, Delaleu B, Chesneau D, Fabre-Nys C. (2002). Sequential role of e2 and GnRH for the expression of estrous behavior in ewes. *Endocrinology* 143:139-145.



Carrasco R, Singh J, Adams GP. (2016). The dynamics of *trkA* expression in the bovine ovary are associated with a luteotrophic effect of ovulation-inducing factor/nerve growth factor (OIF/NGF). *Reprod Biol Endocrinol* 14:47.

Carrasco R. (2016). Ovulation-inducing factor/nerve growth factor (OIF/NGF): Immunohistochemical studies of the bovine ovary and the llama hypothalamus. Tesis de Maestría, University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan, Canadá.

Cervantes MJ, Juárez ML, Mejía VO, Berruecos VJM, Vera AH, Valencia J. (2007). Use of fluorogestone acetate after breeding to reduce the effect of premature luteal regression in dairy goats when superovulation is induced with FSH. *Anim Reprod Sci* 97:47-54.

Chemineau P, Pellicer-Rubio MT, Lassoued N, Khaldi G, Monniaux D. (2006). Male-induced short oestrus and ovarian cycles in sheep and goats: a working hypothesis. *Reprod Nut Dev* 46:417-429.

Christensen ACM, Haresign W, Khalid M. (2014). Progesterone exposure of seasonally anoestrus ewes alters the expression of angiogenic growth factors in preovulatory follicles. *Theriogenology* 81:358-367.

Clarke IJ. (1979). Induction of male behavior in ovariectomized ewes and ovariectomized-androgenized ewes chronically implanted with oestradiol-17 $\beta$  or testosterone. *Anim Reprod Sci* 1:305-312.

Clarke IJ. (2002). Multifarious effect of estrogen on the pituitary gonadotrope with special emphasis on studies in the ovine species. *Arch Physiol Biochem* 110:62-73.

Cognie Y, Gray SJ, Lindsay DR, Oldham CM, Pearce DT, Signoret JP. (1982). A new approach to controlled breeding in sheep using the ram effect. *Proceedings Soc Anim Prod* 14:519-522.

Cumming IA, Buckmaster JM, Blockey MAB, Goding JR, Windfield CG, Baxter RW. (1973). Constancy of interval between luteinizing hormone release and ovulation in the ewe. *Biol Reprod* 9:24-29.

Dissen GA, Romero C, Paredes A, Ojeda SR. (2002). Neural and neurotrophic control of ovarian development. *Microsc Res Tech* 59:509-515.

Dissen GA, Parrot JA, Skinner MK, Hill DF, Costa ME, Ojeda SR. (2000). Direct effects of nerve growth factor on thecal cells from antral ovarian follicles. *Endocrinology* 141:4736-4750.

Druart X, Rickard JP, Mactier S, Kohnke PL, Kershaw-Young CM, Bathgate R, Gibb Z, Crossett B, Tsikis G, Labas V, Harichaux G, Grupen CG, de Graaf SP. (2013). Proteomic

characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma. *J Proteom* 1:13–22.

Espey LL. (1980). Ovulation as an inflammatory reaction – a hypothesis. *Biol Reprod* 22:73-106.

Evans NP, Dahl GE, Mauger DT, Padmanabhan V, Thrun LA, Karsch FJ. (1995a). Does estradiol induce the preovulatory gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) surge in the ewe by inducing a progressive change in the mode of operation of the GnRH neurosecretory system. *Endocrinology* 136:5511-5519.

Evans NP, Dahl GE, Glover BH, Karsch FJ. (1995b). Estradiol induces both qualitative and quantitative changes in the pattern of gonadotrophin-releasing hormone secretion during the presurge period in the ewe. *Endocrinology* 136:1603-1609.

Evans ACO, Duffy P, Hynes N, Boland MP. (2000). Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. *Theriogenology* 53:699–715.

Evans NP, Richter TA, Skinner DC, Robinson JE. (2002a). Neuroendocrine mechanisms underlying the effects of progesterone on the oestradiol-induced GnRH/LH surge. *Reprod Suppl* 59:57-66.

Evans ACO, Flynn JD, Duffy P, Knight PG, Boland MP. (2002b). Effects of ovarian follicle ablation on FSH, oestradiol and inhibin A concentrations and growth of other follicles in sheep. *Reproduction* 123:59–66.

Evans AC. (2003). Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. *Anim Reprod Sci* 78:289-306.

Fabre-Nys C, Martin GB. (1991). Roles of progesterone and oestradiol in determining the temporal sequence and quantitative expression of sexual receptivity and the preovulatory LH surge in the ewe. *J Endocrinol* 130:367-379.

Fabre-Nys C, Gelez H. (2007). Sexual behavior in ewes and other domestic ruminants. *Horm Behav* 52:18-25.

Fernandez A, Ulloa-Leal C, Silva M, Norambuena C, Adams GP, Guerra M, Ratto MH. (2014). The effect of repeated administrations of llama ovulation-inducing factor (OIF/NGF) during the peri-ovulatory period on corpus luteum development and function in llamas. *Anim Reprod Sci* 149:345–352.

Fletcher IC, Lindsay DR. (1971). Effect of rams on the duration of oestrus behaviour in ewes. *J Reprod Fert* 25:253-259.

Fulkerson WJ, Adams NR, Gherardi PB. (1981). Ability of castrate male sheep treated with oestrogen or testosterone to induce and detect oestrus in ewes. *Appl Anim Ethol* 7:57-66.

Goodman RL, Gibson M, Skinner DC, Lehman MN. (2002). Neuroendocrine control of pulsatile GnRH secretion during the ovarian cycle: evidence from the ewe. *Reprod Suppl* 59:41-56.

Goodman RL, Inskeep EK. (2006). Control of the ovarian cycle of the sheep. En: *Knobil and Neill's physiology of reproduction*. Ed. Neill JD. 3° ed. Elsevier, Amsterdam, Cap. 27, pp. 2389-2447.

Goodman RL, Inskeep EK. (2015). Control of the ovarian cycle of the sheep. En: *Physiology of reproduction*. Ed. Plant TM, Zeleznik AJ. 4° ed. Elsevier, San Diego, Cap. 27, pp. 1259-1305.

Gusmão AL, Biscarde CEA, Kiya Ck. (2013). Superovulação e transferência de embriões em ovelhas. *Rev Bras Reprod Anim* 37:226-231.

Harper GP, Glanville RW, Thoenen H. (1982). The purification of nerve growth factor from bovine seminal plasma: Biochemical characterization and partial amino acid sequence. *J Biol Chem* 257:8541–8548.

Hauger RL, Karsch FJ, Foster DL. (1977). A new concept for control of the estrous cycle of the ewe based on the temporal relationships between luteinizing hormone, estradiol and progesterone inhibits tonic LH secretion. *Endocrinology* 101:807-817.

Jainudeen MR, Wahid W, Hafez ESE. (2016). Sheep and goats. En: *Reproduction in farm animals*. Ed. Hafez ESE, Hafez B. 7° ed. Lea & Febiger, Philadelphia, Cap. 12, pp. 172-181.

Karsch FJ, Legan SJ, Ryan KD, Foster DL. (1980). Importance of estradiol and progesterone in regulating LH secretion and estrous behavior during the sheep estrous cycle. *Biol Reprod* 23:404-413.

Kauffman AS, Raissman EF. (2005). Neuroendocrine control of mating-induced ovulation. En: *Physiology of Reproduction*. Ed. Knobil E, Neill JD. 3° ed. Raven Press, New York, Cap. 42, pp. 585–612.

Kendrick KM, Keverne EV, Baldwin BA, Sharman DF. (1986). Cerebrospinal fluid levels of acetylcholinesterase, monoamines and oxytocin during labor, parturition, vaginocervical stimulation, lamb separation and suckling in sheep. *Neuroendocrinology* 44:149-156.

Kershaw-Young CM, Druart X, Vaughan J, Maxwell WM. (2012).  $\beta$ -Nerve growth factor is a major component of alpaca seminal plasma and induces ovulation in female alpacas. *Reprod Fert Develop* 24:1093-1097.

Lambert GM, Erskine MS, Baum MJ. (1990). Effect of naloxone on the pulsatile secretion of luteinizing hormone in gonadectomized male and female ferrets before and after oestradiol replacement. *J Neuroendocrinol* 2:701–705.

Landau S, Houghton JA, Mawhinney JR, Inskoop EK. (1996). Protein sources affect follicular dynamics in ewes near the onset of the breeding season. *Reprod Fertil Dev* 8:1021-1028.

Lindsay DR, Cognie Y, Pelletier J, Signoret JP. (1975). Influence of presence of rams on the timing of ovulation and discharge of LH in ewes. *Physiol Behav* 15:423-426.

Lipner H, Greep RO. (1971). Inhibition of steroidogenesis at various sites in the biosynthetic pathways in relation to induced ovulation. *Endocrinology* 88:602-607.

Marion GB, Smith VR, Willey TE, Barret GR. (1950). The effect of sterile copulation on the time of ovulation in dairy heifers. *J Dairy Sci* 33:885-889.

Mattioli M, Barboni B, Gioia L, Lucidi P. (1999). Nerve growth factor production in sheep antral follicles. *Dom Anim Endocrinol* 17:361-371.

McLeod BJ, Haresign W, Lamming GE. (1982). Response of seasonally anoestrous ewes to small-dose multiple injections of GnRH with and without progesterone pretreatment. *J Reprod Fertil* 65:223–230.

Merkley CM, Coolen LM, Goodman RL, Lehman MN. (2011). Direct projections of arcuate KNDy (kisspeptin/neurokinin B/dynorphin) neurons to GnRH neurons in the sheep. *Program Annual Meeting Society for Neuroscience Abstr* 712:5.

Moenter SM, Caraty A, Karsch FJ. (1990) The estradiol-induced surge of gonadotropin-releasing hormone in the ewe. *Endocrinology* 127:1375–1384.

Moenter SM, Brand RC, Karsch FJ. (1992). Dynamics of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) secretion during the GnRH surge: insights into the mechanism of GnRH surge induction. *Endocrinology* 130:2978-2984.

Murdoch W, Peterson T, Van Kirk E, Vincent D, Inskoop E. (1986). Interactive roles of progesterone, prostaglandins and collagenase in the ovulatory mechanism of the ewe. *Biol Reprod* 35:1187.

Murdoch WJ, van Kirk EA. (1998). Luteal dysfunction in ewes induced to ovulate early in the follicular phase. *Endocrinology* 139:3480–3484.

O'Byrne KT, Lunn SF, Coen SW. (1990). Central oxytocin stimulates luteinizing hormone release in the marmoset, a primate which fails to show lactationally-induced infertility. *J Neuroendocrinol* 2:419-421.

Patterson JC, Childs GV. (1994). Nerve growth factor and its receptor in the anterior pituitary. *Endocrinology* 35:1689–1696.

Radford HM, Watson RH, Wood GF. (1960). A crayon and associated harness for the detection of mating under field conditions. *Aust Vet J* 36:57-66.

Oliveira MEF, Fonseca JF, Pieroni JSP, Ferreira RM, Cordeiro MF, Souza SF, Teixeira PPM, Vicente WRR. (2009). Occurrence of subnormal corpus luteum in superovulated Santa Inês sheep using protocols with or without LH administered at the end of the FSH treatment. En: II International Symposium on Animal Biology of Reproduction, 2009, São Paulo. *Anim Reprod* 6:231-231.

Oliveira MEF, Feliciano MAR. (2013). Ultrassonografia da reprodução. En: Biotécnicas reprodutivas em ovinos e caprinos. 1° ed. MedVet, Sao Paulo, 121-146.

Randel RD, Short RE, Christensen DS, Bellows RA. (1973). Effects of various mating stimuli on the LH surge and ovulation time following synchronization of estrus in the bovine. *J Anim Sci* 37:128-130.

Ratto MH, Huanca W, Singh J, Adams GP. (2005). Local versus systemic effect of ovulation-inducing factor in seminal plasma of alpacas. *Reprod Biol Endocrinol* 3:29.

Ratto MH, Huanca W, Adams GP. (2010). Ovulation-inducing factor: A protein component of llama seminal plasma. *Reprod Biol Endocrinol* 8:44.

Ratto MH, Delbaere LTJ, Leduc YA, Pierson RA, Adams GP. (2011). Biochemical isolation and purification of ovulation-inducing factor (OIF) in seminal plasma of llamas. *Reprod Biol Endocrinol* 9:24.

Ratto MH, Leduc YA, Valderrama XP, van Straaten KE, Delbaere LTJ, Pierson RA, Adams GP. (2012). The nerve of ovulation-inducing factor in semen. *Proc Natl Acad Sci USA*. 109:15042-15047.

Recabarren SE, Escobar H, Lobos A, Recabarren MP, Parilo J. (1996). Luteinizing hormone pulse frequency is increase by arginine infusion in prepubertal sheep. *Exp Clin Endocrinol* 104:72-77.

- Reeves JJ, Arimura A, Schally AV. (1971). Changes in pituitary responsiveness to luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) in anestrus ewes pretreated with estradiol benzoate. *Biol Reprod* 4:88–92.
- Ren L, Medan MS, Weng Q, Jin W, Li C, Watanabe G, Taya K. (2005). Immunolocalization of nerve growth factor (NGF) and its receptors (TrkA and p75LNGFR) in the reproductive organs of shiba goats. *J Reprod Dev* 51:399-405.
- Richter TA, Robinson JE, Evans NP. (2001). Progesterone treatment that either blocks or augments the estradiol-induced gonadotropin-release hormone surge is associated with different patterns of hypothalamic neural activation. *Neuroendocrinology* 73:378-386.
- Robertson HA. (1969) The endogenous control of estrus and ovulation in sheep, cattle and swine. *Vitam Horm* 27:91-130.
- Robinson G, Evans JJ, Forster M. (1985). Oxytocin can affect follicular development in adult mouse. *Acta Endocrinol* 108:273-276.
- Rodriguez Iglesias RM, Ciccioli NH, Ferrería J, Pevsner DA, Rosas CA, Rodriguez MM, Pedrueza JR. (2013). Short-lived corpora lutea syndrome in anoestrous ewes following 17 $\beta$ -oestradiol or MAP treatments applied before an allogenic sexual stimulation with rams and oestrous ewes. *Anim Reprod Sci* 136:268-279.
- Roelofs JB, Bouwman EG, Dieleman SJ, Van Erdenburg FJCM, Kaal-Lansbergen LMT E. (2004). Influence of repeated rectal ultrasound examinations on hormone profiles and behaviour around oestrus and ovulation in dairy cattle. *Theriogenology* 62:1337-1352.
- Rondell P. (1970). Biophysical aspects of ovulation. *Biol Reprod* 2:64-89.
- Romano JE. (1994). Effect of service number on estrus duration in dairy goats. *Theriogenology* 41:1273-1277.
- Romano JE, Benech A. (1995). Effect of service and vaginal-cervical anesthesia on estrus duration in dairy goats. *Theriogenology* 45:691-696.
- Romano JE, Fernandez Abella D. (1997). Effect of service on duration of oestrus and ovulation in dairy goats. *Anim Reprod Sci* 47:107-112.
- Romano JE, Alkar A, Amstalden M. (2016). Effect of copulation on estrus duration and ovulation time in goats. *Theriogenology* 85:330-334.
- Saharrea A, Valencia J, Balcázar A, Mejía O, Cerbón JL, Caballero V, Zarco L. (1998). Premature luteal regression in goats superovulated with PMSG: effect of hCG or GnRH administration during the early luteal phase. *Theriogenology* 50:1039-1052.

Scaramuzzi RJ, Tillson SA, Thorneycroft IH, Caldwell BV. (1971). Action of exogenous progesterone and estrogen on behavioral estrus and luteinizing hormone levels in the ovariectomized ewe. *Endocrinology* 88:1184-1189.

Shibusawa K, Saito S, Fukuda M, Kawai T, Yamada H, Tomiza K. (1955). Neurosecretion of oxytocin stimulates the release of the pituitary gonadotrophin. *Endocrinol Jpn* 2:180-187.

Silva ME, Niño A, Guerra M, Letelier C, Valderrama XP, Adams GP, Ratto MH. (2011). Is an ovulation-inducing factor (OIF) present in the seminal plasma of rabbits? *Anim Reprod Sci* 127:213–221.

Silva ME, Ulloa-Leal C, Norambuena C, Fernández A, Adams GP, Ratto MH. (2014). Ovulation-inducing factor (OIF/NGF) from seminal plasma origin enhances corpus luteum function in llamas regardless of preovulatory follicle diameter. *Anim Reprod Sci* 148:221–227.

Skinner DC, Harris TG, Evans NP. (2000). Duration and amplitude of the luteal phase progesterone increment times the estradiol-induced luteinizing hormone surge in ewes. *Biol of Reprod* 63:1135-1142.

Souza CJ, Campbell BK, Baird DT. (1998). Follicular waves and concentrations of steroids and inhibin A in ovarian venous blood during the luteal phase of the oestrus cycle in ewes with an ovarian autotransplant. *J Endocrinol* 156:563-572.

Spies HG, Pau K-YF, Yang SP. (1997). Coital and estrogen signals: A contrast in the preovulatory neuroendocrine networks of rabbits and rhesus monkeys. *Biol Reprod* 56: 310–319.

Tanco VM, Ratto MH, Lazzarotto M, Adams GP. (2011). Dose response of female llamas to ovulation-inducing factor (OIF) from seminal plasma. *Biol Reprod* 85:452–456.

Tanco VM, Van Steelandt MD, Ratto MH, Adams GP. (2012). Effect of purified llama ovulation-inducing factor (OIF) on ovarian function in cattle. *Theriogenology* 78:1030–1039.

Thiery JC, Martin JB. (1991). Neurophysiological control of the secretion of gonadotrophin-releasing hormone and luteinizing hormone in the sheep - a review. *Reprod Fertil Develop* 3:137-173.

Tilbrook AJ, Lindsay DR. (1987). Differences in the sexual “attractiveness” of estrous ewes to rams. *Appl Anim Behav Sci* 17:129-138.

Toosi BM, Davies KL, Seekallu SV, Ziegler AC, Barret DMW, Duggavathi R, Rawlings NC. (2010). Ovarian follicular dominance and the induction of daily follicular waves in the ewe. *Biol of Reprod* 83:122-129.

Tribulo P, Bogle O, Mapletoft RJ, Adams GP. (2015). Bioactivity of ovulation inducing factor/nerve growth factor (OIF/NGF) in bovine seminal plasma and its effects on ovarian function in cattle. *Theriogenology* 83:1394–1401.

Ulloa-Leal C, Bogle OA, Adams GP, Ratto MH. (2014). Luteotrophic effect of ovulation-inducing factor/nerve growth factor (OIF/NGF) in the seminal plasma of llamas. *Theriogenology* 81:1101–1107.

Ungerfeld R, Rubianes E. (2001). Corderos tempranos: estrategia reproductiva que genera nuestras alternativas productivas. *Rev Plan Agrop* 98:32-35.

Ungerfeld R, Dago AL, Rubianes E, Forsberg M. (2004). Response of anestrous ewes to the ram effect after follicular wave synchronization with a single dose of estradiol-17 $\beta$ . *Reprod Nutr Dev* 44:89-98.

Ungerfeld R, González-Pensado SP. (2009). Social dominance and courtship and mating behaviour in rams in non-competitive and competitive pen tests. *Reprod Domest Anim* 44:44-47.

Ungerfeld R, Lacuesta L. (2015). Competition Between different social ranked rams has similar effects of testosterone and sexual behaviour throughout the year. *Reprod Domest Anim*. 50:1022-1027.

Wersinger SR, Baum MJ. (1997). Sexually dimorphic activation of midbrain tyrosine hydroxylase neurons after mating or exposure to chemosensory cues in the ferret. *Biol Reprod* 56:1407–1414.

Zalesky DD, Day ML, Imakawa K, Kittok RJ, Kinder JE. (1985). Effects of copulation on timing of the LH surge following synchronization of estrus in the bovine. *Theriogenology* 4:663-670.



## 10. ANEXOS

1

2 **Multiple matings shortens modifies the estrous length, the moment of ovulation,**  
3 **and the estradiol and LH patterns in ewes**

4

5 Bottino, J.P.<sup>a,\*</sup>, Pérez-Clariget R.<sup>b</sup>, Rodriguez M.G.K.<sup>c</sup>, Ratto M.<sup>d</sup>, Ungerfeld R.<sup>a</sup>

6

7 <sup>a</sup>Departamento de Biociencias Veterinarias, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República,  
8 Alberto Lasplaces 1620, 11600, Montevideo, Uruguay

9 <sup>b</sup>Departamento de Producción Animal y Pasturas, Facultad de Agronomía, Universidad de la  
10 República, Garzón 780, 12400, Montevideo, Uruguay

11 <sup>c</sup>Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Faculdade de Ciências  
12 Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 14884-900,  
13 Jaboticabal, São Paulo, Brazil

14 <sup>d</sup>Instituto de Ciencia Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile,  
15 Campus Isla Teja S/N, 5090000, Valdivia, Chile.

16

17 \* Corresponding author: Lasplaces 1620, Montevideo 11600, Uruguay; e-mail:  
18 jpedrobgvet@gmail.com

## 19 Abstract

20 In several species, mating reduces the estrous length, and advances the ovulation. The aim of this  
21 study was to determine if multiple mating reduce the estrous length and modifies the moment of  
22 ovulation, as well as the estradiol and LH patterns in ewes. The estrous cycle of Corriedale ewes  
23 was synchronized, and the onset of receptivity was monitored every 3 h with rams, avoiding  
24 mating. At estrous onset, ewes were assigned to two experimental groups ( $n = 10$  each): 1) estrous  
25 was monitored every 3 h with a ram avoiding mating (group CON), and 2) a ram was allowed to  
26 mate and ejaculate once every 3 h (group MAT). The ovaries were scanned with transrectal  
27 ultrasonography and blood samples were collected for measuring  $17\beta$ -estradiol and LH  
28 concentrations every 3 h until ovulation. Estrus was shorter in MAT than CON ewes ( $24.7 \pm 1.5$   
29 h vs.  $30.4 \pm 1.5$  h, respectively;  $P=0.02$ ); the proportion of animals that ovulated before the end  
30 of estrus was greater in CON ewes: (9/10 vs. 3/10,  $P=0.009$ ). The area under the LH curve (AUC)  
31 was greater in MAT than CON ewes ( $36.1 \pm 3.5 \text{ ng}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$  vs  $24.9 \pm 3.5 \text{ ng}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$   $P=0.03$ ).  
32 However, MAT ewes had a lower  $17\beta$ -estradiol AUC than CON ewes ( $41.0 \pm 4.9 \text{ pg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$  vs  
33  $59.4 \pm 4.9 \text{ pg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$   $P=0.01$ ). Mating reduced the estrous length, induced a greater secretion of  
34 LH but less total  $17\beta$ -estradiol secreted and, additionally, in frequently mated ewes ovulation  
35 occurred more frequently after the end of estrus.

36 **Keywords:** Copula; Estrous cycle; Follicle; Preovulatory LH surge; Sexual behavior

37

## 38 1. Introduction

39 Mating reduces estrous length and may advance the ovulation in several ruminants. As  
40 early as in 1950, Marion et al. (1950) reported that the preovulatory LH surge, and thus, ovulation  
41 occurred earlier in those animals that were mated (penetration and ejaculation) during the first 6-  
42 8 hours of behavioral estrus than non-mated animals. This is explained by an advancement of the  
43 preovulatory discharge of LH, and thus the moment of ovulation by cervical stimulation and  
44 mating (Randel et al. 1973). Nevertheless, other researchers could not confirm these phenomena  
45 (Zalesky et al. 1985). Estrous length is also shorter in does mated by vasectomized bucks than in  
46 non-mated females (Romano and Fernandez Abella, 1997; Romano et al. 2016), regardless to the  
47 number of matings (Romano, 1994a). Mating and insemination also shorten the time between the  
48 onset of estrus and ovulation in pigs (Signoret et al. 1972; Waberski et al. 1995).

49 In ewes, there is a paucity of information on the possible effects of mating on the  
50 dynamics of the estrual period. If ewes remain in continuous physical contact with rams, estrous  
51 length is reduced (Fletcher and Lindsay, 1971) and the LH surge and ovulation advanced (Lindsay  
52 et al. 1975) compared to ewes isolated from males. However, in those studies ewes were also  
53 treated with equine Chorionic Gonadotrophin (eCG), so it is not possible to know the effects of  
54 mating in natural estrus. Moreover, as the number of matings is extremely uneven among different  
55 ewes (Tilbrook and Cameron, 1990), it is possible that while some ewes have been mated several  
56 times, while others may have remained unmated in those earlier studies.

57 The hypothesis of this study was that multiple mating, including penetration and  
58 ejaculation, shortens estrous length, advances ovulation, and modifies the  $17\beta$ -estradiol and LH  
59 patterns in ewes. Therefore, the objectives were to compare the estrous length, LH and  $17\beta$ -  
60 estradiol patterns, and the moment of ovulation in mated and unmated estrous ewes.

## 61 2. Materials and methods

### 62 2.1 Animals and general management

63 The experiment was performed at the Estación Experimental “Bernardo Rosengurt” from  
64 the Facultad de Agronomía, Universidad de la República (Cerro Largo, Uruguay, 32° S), during  
65 the breeding season (March, autumn in the south hemisphere). The experimental protocol was  
66 approved by the Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) of the Universidad de la  
67 República (UdelaR). Initially the estrous cycle of 30 multiparous Corriedale ewes was  
68 synchronized to ensure the availability of 20 ewes finally included in the study (4 to 6 years old,  
69  $51.9 \pm 2.2$  kg, mean  $\pm$  SEM). A clinical and gynecological examination and transrectal  
70 ultrasonography was performed using a 7.5 MHz linear array transducer coupled to an IUStar  
71 monitor (United Imaging, IUStar 160 Vet model, Beijing, China) to determine health and  
72 reproductive status 21 days before beginning the study. Ewes continued to graze natural pastures  
73 and received rice bran ( $300 \text{ g} \cdot \text{animal}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ ) during the period of the study. Four Corriedale rams  
74 (4–6 years old,  $49.8 \pm 3.3$  kg) were also used in the study. The rams were all sexually experienced  
75 and were andrologically examined one month before beginning the study.

76 To reduce the number of animals that were examined simultaneously, the study included  
77 two replications (15 ewes initially synchronized in each), beginning the treatments with 5 days of  
78 separation between replications other. Estrous cycles of all ewes were synchronized using two  
79 doses of a PGF-alpha analogue (chlorprostenol sodium;  $2.53 \mu\text{g}/\text{kg}$ ; Ciclase DL, Zoetis, Buenos  
80 Aires, Argentina) 14 days apart. Estrous onset was checked in small pens every 3 h beginning 24  
81 h after the second dose, introducing a tied ram. The ram was allowed to mount the ewes taking  
82 extreme care to prevent mating (penis penetration), withdrawing it when ewes' receptivity was  
83 confirmed (when the female remained immobile accepting the mount of the male). In each control  
84 in which there were two or an even number of ewes in estrus, one of them was randomly assigned  
85 to one of two experimental groups. In one group, ewes' receptivity was monitored with the same  
86 system every 3 h, determining if the ewe was still in estrus, but preventing mating (group CON,  
87  $n=10$ , 5 in each replication, 0 matings). The ewes of the other group were mated once with a ram

88 in each control, every 3 h, confirming the ejaculation observing the intensive perineal contractions  
89 and the postejaculatory immobilization (group MAT, n=10, 5 in each replication,  $6.4 \pm 0.5$   
90 matings, mean  $\pm$  SEM). The control of estrous receptivity continued for each ewe every 3 h until  
91 it was not receptive to further mounting. The rams were exchanged in every control in each group  
92 using the four rams in both groups.

### 93 *2.2. Ovarian ultrasound examination*

94 After confirming the receptivity and before allocating each ewe to an experimental group,  
95 ovaries were examined by transrectal ultrasound using a 7.5 MHz linear transducer (United  
96 Imaging, IUStar 160 Vet model, Beijing, China), determining the size of preovulatory follicle  
97 every 3 h. Briefly, the animal remained in standing position, inserting the probe, previously  
98 lubricated with carboxymethyl cellulose gel, into the rectum. After locating the uterus, both  
99 ovaries were searched for and located, and the diameters of all the follicles greater than 3 mm  
100 were measured. Two diameters were measured for each follicle, and the average was calculated.  
101 These follicles were measured again in the subsequent controls to determine their regression or  
102 ovulation. Only follicles that exceeded 5 mm were considered as possible ovulatory follicles, and  
103 ovulation was considered when a follicle greater than 5 mm disappeared. Ultrasounds were  
104 performed every 3 h from the time the estrous was detected until 3 h after ovulation.

### 105 *2.3. Collection of blood samples, and measurement of $17\beta$ -estradiol and LH concentrations*

106 After the ultrasound scanning, blood samples were collected by jugular venipuncture to  
107 determine estradiol and LH concentrations. Blood samples were placed in dry tubes without anti-  
108 coagulants, centrifuged at 3000 rpm for 15 min, and serum was separated and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$   
109 until hormonal measurements were performed. Serum LH concentrations were measured using a  
110 double-antibody liquid phase radioimmunoassay with ovine LH radioiodinated (LER 1374-A),  
111 ovine antibodies CSU-204 and standard ovine LH oLH-S25 (provided by NIADDK, USA) in 200  
112  $\mu\text{L}$  in duplicate, according to the procedure described by Recabarren et al. (1996). The mean  
113 intraassay coefficient of variation was 3.6 % and the minimum detectable limit of the assay was

114 0.10 ng/mL. Serum 17 $\beta$ -estradiol concentration was determined using a commercial liquid phase  
115 kit DIAsource E2-RIA-CT (DIAsourceImmunoAssays S.A., Louvain-la-Neuve, Belgium). The  
116 mean intraassay coefficient of variation was 5.5 % and the minimum detectable limit of the assay  
117 was 0.01 pg/mL.

#### 118 2.4. Definitions and statistical analysis

119 The onset of estrus was considered the mean time between the last time that an ewe did  
120 not stand to be mounted by the ram and the first time it was receptive to the ram (Ungerfeld and  
121 Rubianes, 1999). Similarly, the end of the estrus was defined as the mean time between the last  
122 time that the ewe stands to be mounted and the first in which was not receptive to the ram. Estrous  
123 length was considered the time elapsed between the onset and the end of estrus. The time of  
124 ovulation was considered the midpoint between the last moment that the preovulatory follicle was  
125 observed and the time in which it was not observed again (Roelofs et al. 2004).

126 The onset of the LH peak was considered as the first value greater than 3 ng/mL and the  
127 peak was defined as when concentration reached maximum values (Romano et al. 2018). The area  
128 under the curve (AUC) of LH and 17 $\beta$ -estradiol were calculated using the GraphPadPrism Demo  
129 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Duration of the LH peak was defined as the time  
130 interval from the onset of the LH surge until it returned to the baseline concentration (time interval  
131 when values were 3 ng/mL or less).

132 Estrous length, LH peak duration, intervals from onset of estrus to ovulation, from the  
133 end of estrus to ovulation, from onset of estrus to the onset of the LH peak, from the onset of the  
134 LH peak to the end of estrus, from the onset of LH peak to ovulation, the AUC of LH and 17 $\beta$ -  
135 estradiol, and the LH AUC/17 $\beta$ -estradiol AUC ratio, were compared using a mixed model (SAS  
136 University Edition). The model included the treatment as fixed effect and the replication as a  
137 random effect. The frequency of ewes having ovulations before or after the end of estrus was  
138 compared with the Fisher' exact probability test. The differences were considered statistically  
139 significant when  $P \leq 0.05$ , and as tendencies when  $0.1 \leq P < 0.05$ .

140 **3. Results**

141

142 In ewes of the MAT group, there was a shorter duration of behavioral estrus length  
143 ( $p=0.02$ ) and the interval from the end of estrus to ovulation was modified ( $P=0.03$ ) (Table 1).  
144 Only single ovulations were detected. The proportion of animals having ovulations before the end  
145 of estrus was greater in CON than MAT ewes (9/10 vs 3/10, respectively;  $P=0.009$ ). The intervals  
146 from onset of estrus to ovulation, onset of estrus to onset of the LH peak, onset of the LH peak to  
147 end of estrus, and onset of the LH peak to ovulation, as well as the LH peak duration did not differ  
148 between groups (Table 1). The LH AUC was greater in ewes of the MAT than CON ewes ( $P=$   
149  $0.03$ ); but the  $17\beta$ -estradiol AUC was greater in ewes of the CON than MAT ewes ( $P=0.01$ )  
150 (Table 2). The relationship LH/ $17\beta$ -estradiol ratio was greater in ewes of the MAT than CON  
151 group ( $P=0.04$ ).



152 **4. Discussion**

153

154 Multiple matings during the period of sexual receptiveness reduced the length of  
155 behavioral estrus, increased the secretion of LH, diminished the LH/E2 and influenced on the  
156 time of ovulation in relation to the end of estrus. Moreover, important differences were observed  
157 even considering that it was necessary to detect receptiveness, and thus, the presence of rams was  
158 necessary in both groups to control of estrus. Although as happens in goats (Romano et al., 2016;  
159 Romano et al., 2018), the single presence could also modify the estrous response in unmated ewes,  
160 the observation of the effects of mating reinforces its' effects. Therefore, without rams this  
161 difference could have been even greater.

162 The general results might have important practical implications in programs of artificial  
163 insemination (AI), as the technique used to identify the ewes that came into estrus may directly  
164 modify the moment of the ovulation, and thus, the best moment for AI. In fact, estrous ewes are  
165 usually identified with vasectomized rams, castrated androgen-treated males (wethers treated with  
166 testosterone) (Fulkerson et al. 1981), or androgenized ewes (Clarke, 1979). Although with this  
167 study is not possible to disentangle the mechanisms by which rams modify the estrous pattern in  
168 mated ewes, the physical contact of the penis against the vaginal fornix seems to be the main  
169 mechanisms in goats (Romano, 1994b; Romano and Benech, 1995). However, seminal plasma of  
170 rams also contain  $\beta$ -NGF (Harper et al. 1982; Druart et al. 2013), a protein that induced ovulation  
171 in llamas (Ratto et al., 2012; Kershaw-Young et al., 2012). While vasectomized rams induce a  
172 physical stimulus and ejaculate seminal plasma, castrated androgenized males may induce the  
173 physical stimulus of mating, albeit to a lesser extent, and testosterone-treated ewes would not  
174 induce the physical stimulation of mating from a copulation perspective. The system used to  
175 identify which ewes are receptive might therefore modify the physiological endocrine  
176 environment in which the preovulatory follicle grows and the time when ovulation occurs in  
177 relation to the end of estrus. Considering this information, it would be important to determine if

178 the time of AI should be adjusted according to the technique used to identify estrous ewes aiming  
179 to increase the final fertility of the flock.

180 Mating shortened the estrous length without modifying the time from estrous onset to  
181 ovulation but resulting in most mated ewes having ovulations after the end of receptivity. The  
182 general assumption that ovulation occurs close the end of estrus (Jainudeen et al. 2016) implies  
183 that ovulation is induced while concentrations of estrogens are still enough to maintain the  
184 receptivity (Blache et al. 1991). In this sense, the lesser concentration of estradiol secreted by  
185 MAT ewes during the receptive period could be a consequence of the greater LH secretion,  
186 because LH induces ovulation with an earlier decrease in estradiol concentrations (Moor, 1974).  
187 Therefore, in frequently mated ewes, ovulation occurs in an environment where there are lesser  
188 estrogen concentrations, which may also modify the characteristics of the follicle –and thus, the  
189 oocyte- that is released at the time of ovulation. It should also be considered that the oocyte could  
190 advance by a genital tract with different characteristics, possibly due to changes in the early  
191 impact of steroids relationship, which may also affect its viability.

192 In sheep, the increase in estradiol sensitizes the pituitary to secrete GnRH, inducing the  
193 preovulatory LH surge (Reeves et al. 1971). Moreover, it has been proposed that the GnRH surge  
194 might also be involved in maintaining estrous receptiveness (Caraty et al., 2002). However, the  
195 lesser total amount of  $17\beta$ -estradiol secreted during this period in MAT ewes did not negatively  
196 affect the LH secretion, so there may be several non-opposed mechanisms underlying this  
197 response. First, mating may directly stimulate LH secretion by an independent pathway from that  
198 of  $17\beta$ -estradiol action. As mentioned, the physical stimulus or the content of  $\beta$ -NGF or other  
199 molecules contained in the seminal plasma may directly stimulate the GnRH-LH secretion.  
200 However, the vaginal-cervical stimulation induces the secretion of oxytocin (Kendrick et al.  
201 1986), which in other species directly stimulate the pituitary release of LH (marmoset: O'Byrne  
202 et al. 1990, rats, humans and dogs: Shibusawa et al. 1955, horses: Alexander et al. 1995, mice:  
203 Robinson et al. 1985). Moreover, it has been reported that oxytocin has been proposed as a  
204 neurotransmitter that intervenes on the length of estrous behavior in ewes. In this sense, the

205 infusion of oxytocin in the ventromedial nucleus suppresses ewes' receptiveness (Fabre-Nys et  
206 al., 2007). Considering all this information, mating might induce the release of oxytocin,  
207 inhibiting estrous behavior and stimulating LH secretion regardless the amount of estrogen  
208 secreted.

209         The effect of mating shortening the period of behavioral estrus may have important  
210 implications in the sexual selection process. In a polyandric species such as sheep, rams compete  
211 for access to estrous females (Preston et al. 2001; Lacuesta and Ungerfeld, 2012). However, in  
212 competitive breedings, even in wild conditions or in farmed animals, the final individual progeny  
213 produced by different rams is not only influenced by their social behavior, but also by the direct  
214 impact of its mating dynamics. For example, an important volume of semen is lost from the vagina  
215 when a second ram mates the same ewe (Tilbrook and Pearce, 1986). Moreover, the greater the  
216 volume of semen deposited; the more semen is lost. In promiscuous species there is also sperm  
217 competition after semen deposition, reducing the probability of sperm deposited as a result of a  
218 specific mating being involved in fertilization (Parker and Birkhead, 2013). Thus, as different  
219 rams consistently prefer to mate with the same ewes (Tilbrook and Lindsay, 1987), those rams  
220 with preferential access to ewes (Ungerfeld and González-Pensado, 2009; Ungerfeld and  
221 Lacuesta, 2015), that mate them repeatedly, would shorten their receptiveness reducing the  
222 probability of being impregnated by another ram.

223         Overall, it was concluded that multiple matings reduce the length of behavioral estrus and  
224 modify the moment of ovulation in relation to the end of estrus. Furthermore, it induced a greater  
225 secretion of LH even when the ewe had relatively lesser estradiol concentrations. Thus, frequent  
226 mating greatly affects the endocrine pattern and the moment of ovulation in ewes.

227227

## 228 Acknowledgement

229 Authors acknowledge Dr. Carlos Mantero, Director of the Estación Experimental  
230 Bernardo Rossengurtt for the facilities for performing this study, and Tec. Pec. Ignacio Sosa,  
231 Nicolas Zunino, Maria Jesús Frisch, Monserrat Costa, Belen Gomez, Laura Blanco and Rodrigo  
232 Dematté for their help with animal management. The Comisión Sectorial de Investigación  
233 Científica (CSIC, Universidad de la República) supported a study visit from JB to the Universidad  
234 Austral (Chile) to measure LH and 17 $\beta$ -estradiol. Authors give special thanks to Dr. Cesar Ulloa  
235 and Dr. Albert Carrasco who collaborated in the measurements of hormones. JB has a  
236 postgraduate scholarship from the Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII,  
237 Uruguay). MGKR participated in this study during a study visit supported by Coordenação de  
238 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001 as part of  
239 her doctoral program (PDSE).

240240

## 241 References

242242

- 243 Alexander S. L., Irvine C. H. G., Shand N., Evans M. J., 1995. Is luteinizing hormone  
244 secretion modulated by endogenous oxytocin in the mare? Studies on the role of oxytocin  
245 and factors affecting its secretion in estrous mares. *Biol. Reprod.* 1, 177-187.  
246 [https://doi.org/10.1093/biolreprod/52.monograph\\_series1.361](https://doi.org/10.1093/biolreprod/52.monograph_series1.361)
- 247 Blache D., Fabre-Nys C. J., Venier G., 1991. Ventromedial hypothalamus as a target for  
248 oestradiol action on proceptivity, receptivity and luteinizing hormone surge of the ewe. *Brain*  
249 *Res.* 546, 241-249. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)91488-M](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)91488-M)
- 250 Caraty A., Delaleu B., Chesneau D., Fabre-Nys C., 2002. Sequential role of E2 and  
251 GnRH for the expression of estrous behavior in ewes. *Endocrinology* 143, 139-145.
- 252 Clarke I. J., 1979. Induction of male behavior in ovariectomized ewes and  
253 ovariectomized-androgenized ewes chronically implanted with oestradiol-17 $\beta$  or  
254 testosterone. *Anim. Reprod. Sci.* 1, 305-312. [https://doi.org/10.1016/0378-](https://doi.org/10.1016/0378-4320(79)90016-2)  
255 [4320\(79\)90016-2](https://doi.org/10.1016/0378-4320(79)90016-2)
- 256 Druart X., Rickard J. P., Mactier S., Kohnke P. L., Kershaw-Young C. M., Bathgate R., Gibb  
257 Z., Crossett B., Tsikis G., Labas V., Harichaux G., Grupen C. G., de Graaf S. P., 2013. Proteomic  
258 characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma. *J. Proteomics* 91,  
259 13-22. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.05.029>
- 260 Fabre-Nys C., Gelez H., 2007. Sexual behavior in ewes and other domestic ruminants. *Horm.*  
261 *Behav.* 52, 18-25.
- 262 Fletcher I. C., Lindsay D. R., 1971. Effect of rams on the duration of oestrus behaviour  
263 in ewes. *J. Reprod. Fertil.* 25, 253-259. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0250253>
- 264 Harper G. P., Glanville R. W., Thoenen H., 1982. The purification of nerve growth factor from  
265 bovine seminal plasma. *J. Biol. Chem.* 257, 8541-8548.
- 266 Fulkerson W. J., Adams N. R., Gherardi P. B., 1981. Ability of castrate male sheep treated with

267 oestrogen or testosterone to induce and detect oestrus in ewes. *Appl. Anim. Ethol.* 7, 57-66.  
268 <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.02.004>

269 Jainudeen M. R., Wahid W., Hafez E. S. E., 2016. Reproduction in farm animals, in: Hafez E.  
270 S. E., Hafez B. (Eds.), *Sheep and goats*, Lea & Febiger, Philadelphia, pp. 172-181.

271 Kendrick K. M., Keverne E. V., Baldwin B. A., Sharman D. F., 1986. Cerebrospinal  
272 fluid levels of acetylcholinesterase, monoamines and oxytocin during labor, parturition,  
273 vaginocervical stimulation, lamb separation and suckling in sheep. *Neuroendocrinology*  
274 44, 149-156. <https://doi.org/10.1159/000124638>

275 Kershaw-Young C. M., Druart X., Vaughan J., Maxwell W. M., 2012.  $\beta$ -Nerve growth factor is  
276 a major component of alpaca seminal plasma and induces ovulation in female alpacas. *Reprod.*  
277 *Fert. Develop.* 24, 1093-1097. <https://doi.org/10.1071/RD12039>

278 Lacuesta L., Ungerfeld R., 2012. Sexual performance and stress response of previously unknown  
279 rams after grouping them in dyads. *Anim. Reprod. Sci.* 134, 158-163.  
280 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.08.021>

281 Lindsay D. R., Cognie Y., Pelletier J., Signoret J. P., 1975. Influence of the presence of rams on  
282 the timing of ovulation and discharge of LH in ewes. *Physiol. Behav.* 15, 423-426.  
283 [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(75\)90253-X](https://doi.org/10.1016/0031-9384(75)90253-X)

284 Marion G. B., Smith V. R., Willey T. E., Barret G. R., 1950. The effect of sterile copulation on  
285 the time of ovulation in dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 33, 885-889.  
286 [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(50\)91985-0](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(50)91985-0)

287 Moor R. M., 1974. The ovarian follicle of the sheep: inhibition of estrogen secretion by  
288 luteinizing hormone. *J. of Endocrinol.* 61, 455-463. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0610455>

289 O'Byrne K. T., Lunn S. F., Coen S. W., 1990. Central oxytocin stimulates luteinizing hormone  
290 release in the marmoset, a primate which fails to show lactationally-induced infertility. *J.*  
291 *Neuroendocrinol.* 2, 419-421. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.1990.tb00426.x>

292 Parker G. A., Birkhead T.R., 2013. Polyandry: The history of a revolution. *Phil. Trans. R. Soc.*  
293 B. 368. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0335>

294 Preston B. T., Stevenson I. R., Pemberton J. M., Wilson K., 2001. Dominant rams lose out by  
295 sperm depletion. *Nature* 409, 681-682.

296 Randel R. D., Short R. E., Christensen D. S., Bellows R. A., 1973. Effects of various mating  
297 stimuli on the LH surge and ovulation time following synchronization of estrus in the bovine. *J.*  
298 *Anim. Sci.* 37, 128-130. <https://doi.org/10.2527/jas1973.371128x>

299 Ratto M. H., Leduc Y. A., Valderrama X. P., van Straaten K. E., Delbaere L. T. J., Pierson R.  
300 A., Adams G. P., 2012. The nerve of ovulation-inducing factor in semen. *Proc. Natl. Acad. Sci.*  
301 *U.S.A.* 109, 15042-15047. <https://doi.org/10.1073/pnas.1206273109>

302 Recabarren S. E., Escobar H., Lobos A., Recabarren M. P., Parilo J., 1996. Luteinizing hormone  
303 pulse frequency is increase by arginine infusion in prepubertal sheep. *Exp. Clin. Endocrinol.*  
304 104, 72-77. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1211425>

305 Reeves J. J., Arimura A., Schally A.V., 1971. Changes in pituitary responsiveness to luteinizing  
306 hormone-releasing hormone (LH-RH) in anestrus ewes pretreated with estradiol benzoate.  
307 *Biol. Reprod.* 4, 88-92. <https://doi.org/10.1093/biolreprod/4.1.88>

308 Robinson G., Evans J. J., Forster M., 1985. Oxytocin can affect follicular development  
309 in adult mouse. *Acta Endocrinol.* 108, 273-276. <https://doi.org/10.1530/acta.0.1080273>

310 Roelofs J. B., Bouwman E. G., Dieleman S. J., Van Erdenburg F. J. C. M., Kaal-Lansbergen L.  
311 M. T. E., 2004. Influence of repeated rectal ultrasound examinations on hormone profiles and  
312 behaviour around oestrus and ovulation in dairy cattle. *Theriogenology* 62, 1337-1352.  
313 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.02.002>

314 Romano J. E., 1994a. Effect of service number on estrus duration in dairy goats. *Theriogenology*  
315 41, 1273-1277. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)90485-2](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)90485-2)

316 Romano J. E., 1994b. Effects of different stimuli of service on estrus duration in dairy goats.  
317 *Theriogenology* 42, 875-879. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)90455-R](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)90455-R)

318 Romano J. E., Benech A., 1995. Effect of service and vaginal-cervical anesthesia on estrus  
319 duration in dairy goats. *Theriogenology* 45, 691-696. [https://doi.org/10.1016/0093-](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00415-5)  
320 [691X\(95\)00415-5](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00415-5)

321 Romano, J. E., Fernandez Abella D., 1997. Effect of service on duration of oestrus and ovulation  
322 in dairy goats. *Anim. Reprod. Sci.* 47, 107-112. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(96\)01633-](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(96)01633-8)  
323 8

324 Romano J. E., Alkar A., Amstalden M., 2016. Effect of copulation on estrus duration and  
325 ovulation time in goats. *Theriogenology* 85, 330-334.  
326 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.021>

327 Romano J. E., Keisler D. H., Amstalden M., 2018. Effect of copulation on estrus duration, LH  
328 response, and ovulation in Boer goats. *Theriogenology* 121, 62-66.  
329 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.07.018>

330 Shibusawa K., Saito S., Fukuda M., Kawai T., Yamada H., Tomiza K., 1955. Neurosecretion  
331 of oxytocin stimulates the release of the pituitary gonadotrophin. *Endocrinol. Jpn.* 2, 180-187.  
332 <https://doi.org/10.1507/endocrj1954.2.183>

333 Signoret J. P., du Mesnil du Buisson F., Mauléon P., 1972. Effect of mating on the onset and  
334 duration of ovulation in the sow. *J. Reprod. Fertil.* 31, 327-330.  
335 <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0310327>

336 Tilbrook A. J., Pearce D. T., 1986. Pattern of loss of spermatozoa from the vagina of the ewe.  
337 *Aust. J. Biol. Sci.* 39, 295-304. <https://doi.org/10.1071/BI9860295>

338 Tilbrook A. J., Lindsay D. R., 1987. Differences in the sexual "attractiveness" of oestrous ewes  
339 to rams. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 17, 129-138. [https://doi.org/10.1016/0168-1591\(87\)90015-3](https://doi.org/10.1016/0168-1591(87)90015-3)

340 Tilbrook A. J., Cameron A. W. N., 1990. The contribution of the sexual behavior of rams to  
341 successful mating of ewes under field conditions, in: Oldham C. M., Martin G. B., Purvis I. W.  
342 (Eds.), *Reproductive physiology of Merino sheep: concepts and consequences*, Western: School  
343 of Agriculture, Animal Science, The University of Western Australia, pp. 143-160.

344 Ungerfeld R., Rubianes E., 1999. Estrus response to the ram effect in Corriedale ewes primed  
345 with medroxyprogesterone during the breeding season. *Small Rumin. Res.* 32, 89-91.  
346 [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(98\)00164-3](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(98)00164-3)



347 Ungerfeld R., González-Pensado S. P., 2009. Social dominance and courtship and mating  
348 behaviour in rams in non-competitive and competitive pen tests. *Reprod. Domest. Anim.* 44, 44-  
349 47. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00987.x>

350 Ungerfeld R., Lacuesta L., 2015. Competition Between different social ranked rams has similar  
351 effects of testosterone and sexual behaviour throughout the year. *Reprod, Domest. Anim.* 50,  
352 1022-1027. <https://doi.org/10.1111/rda.12630>

353 Waberski D., Südhoff H., Hahn T., Jungblut P. W., Kallweit E., Calvete J. J., Ensslin M., Hoppen  
354 H. O., Wintergalen N., Weitze K. F., Töpfer- Petersen E., 1995. Advanced ovulation in gilts by  
355 the intrauterine application of a low molecular mass pronase-sensitive fraction of boar seminal  
356 plasma. *J. Reprod. Fertil.* 105, 247-252. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1050247>

357 Zalesky D. D., Day M. L., Imakawa K., Kittok R. J., Kinder J. E., 1985. Effects of copulation  
358 on timing of the LH surge following synchronization of estrus in the bovine. *Theriogenology* 4,  
359 663-670. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(85\)90200-6](https://doi.org/10.1016/0093-691X(85)90200-6)

360

361 Table 1. LSmeans, pooled SEM, and *P* value of different reproductive variables and intervals  
 362 recorded during the estrous detection period in control (CON) and mated (MAT) ewes. Estrus  
 363 was monitored every 3h, with a ram that was allowed to mount but preventing penis penetration  
 364 in CON ewes (*n*=10), or ewes were allowed to mate with a ram with there being a vaginal  
 365 penetration and ejaculation in MAT ewes (*n*=10).

	CON	MAT	Pooled SEM	<i>P</i>
Estrous duration (h)	30.4	24.7	1.5	0.02
LH peak duration (h)	8.9	9.0	1.4	ns
Intervals				
Onset of estrous to ovulation (h)	25.8	26.8	1.6	ns
End of estrous to ovulation (h)	-4.6	2.1	2.0	0.03
Onset of estrous to LH peak (h)	1.5	3.5	2.3	ns
LH peak to end of estrous (h)	22.8	16.6	2.3	ns
LH peak to ovulation (h)	19.4	18.7	2.1	ns

366366

367367

368368

369 Table 2. LSmeans, pooled SEM and *P* value of area under the curve (AUC) of LH and 17β-  
 370 estradiol (E2) and LH/E2 ratio in control (CON, *n*=10) and mating (MAT, *n*=10) groups during  
 371 the estrous detection period. In CON group the estrous was monitored, every 3h, with a ram that  
 372 was allowed to mount but preventing penis penetration while in the ewes of the MAT group  
 373 estrous was monitored, every 3h, with ram was allowed to mount with penetration and ejaculation  
 374 occurring.

	CON	MAT	Pooled SEM	<i>P</i>
AUC LH (ng <sup>h</sup> - 1.mL <sup>-1</sup> )	24.9	36.1	3.5	0.03
AUC E2 (pg <sup>h</sup> - 1.mL <sup>-1</sup> )	59.4	41.0	4.9	0.01
LH/E2 (ng/pg)	0.5	0.9	0.1	0.04

375

376

377