

INDUCCIÓN DE LA OVULACIÓN CON EFECTO MACHO Y UN RECONSTITUYENTE ENERGÉTICO EN OVEJAS PELIBUEY PREPÚBERES

OVULATION INDUCTION WITH MALE EFFECT AND A COMMERCIAL ENERGY TONIC IN PREPUBERTAL PELIBUEY EWES

José A. Hernández-Marín¹, Arturo Pro-Martínez², César Cortez-Romero³, Ponciano Pérez-Hernández⁴, Camelia A. Herrera-Corredor⁵, Jaime Gallegos-Sánchez^{2*}

¹Programa Educativo de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Departamento de Agronomía. División de Ciencias de Vida. Campus Irapuato Salamanca. Universidad de Guanajuato. Exhacienda El Copal. km. 9. Carretera Irapuato-Silao. 3682. Irapuato, Guanajuato. (jahmarin@ugto.mx), (joseantonio@colpos.mx). ²Ganadería, Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México. ³Campus San Luis Potosí. Colegio de Postgraduados. 78622. Salinas de Hidalgo, San Luis Potosí. ⁴Campus Campeche. Colegio de Postgraduados. 24450. Champotón. Campeche. ⁵Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. km 14.5 Carretera San Luis Potosí, Matehuala, Ejido Palma de la Cruz, Soledad de Graciano Sánchez, San Luis Potosí. Apartado postal 32.

RESUMEN

En la reproducción, los métodos naturales como el efecto macho (EM) y la acción de los aminoácidos neuroestimuladores aceleran la pubertad e inducen la ovulación en corderas. En el presente estudio se consideró que la bioestimulación del carnero y la acción neurotransmisora de los aminoácidos, en un reconstituyente energético comercial (REC, Metabolase®), podrían modificar la frecuencia de pulsos de la hormona luteinizante (LH) e inducir la ovulación en ovejas prepúberes. El objetivo fue evaluar el EM y la acción del REC para inducir la primera ovulación y caracterizar el pico preovulatorio de LH en ovejas Pelibuey prepúberes. El diseño experimental fue con un arreglo de dos factores (REC y EM) en dos niveles cada uno (sin: s; con: c) y los tratamientos fueron asignados al azar a 46 ovejas: T1 (n=12) testigo, ovejas sin REC y sin EM (sRECsEM); T2 (n=12) ovejas con REC y sin EM (cRECsEM); T3 (n=10) ovejas sin REC y con EM (sRECCeEM); y T4 (n=12) ovejas con REC y con EM (cRECCeEM). La actividad ovárica (AO) y la tasa ovulatoria (TO) se evaluaron por laparoscopia. Las características del pico preovulatorio de LH se evaluaron en respuesta al EM para confirmar la primera ovulación. La acción del REC, el efecto macho, así como su interacción, no aumentaron ($p>0.05$) la cantidad de folículos ováricos de diferente diámetro. El efecto macho y su interacción con el REC aumentaron ($p\leq 0.05$) la TO (sRECCeEM: 0.70 y cRECCeEM: 0.75). La respuesta del pico preovulatorio de LH fue similar ($p>0.05$) en las ovejas con EM con o sin

ABSTRACT

In animal reproduction, natural methods like male effect (ME) and the action of neuroexcitatory amino acids accelerate puberty and induce ovulation in ewe lambs. In this study it was found that the biostimulation of the ewe and the neurotransmitter action of amino acids of a commercial energy tonic (CET, Metabolase®) may change the pulse frequency of luteinizing hormone (LH) and induce ovulation in prepubertal ewes. The objective was to evaluate the ME and CET action to induce ovulation and characterize the preovulatory peak of LH in prepubertal Pelibuey ewes. The experimental design included two factors (CET and ME) on two levels each (without: wo, and with: w). The treatments were randomized to 46 ewes: T1 (n = 12) control group: ewes without CET and without ME (woCETwoME), T2 (n=12) ewes with CET and without ME (wCETwoME), T3 (n=10) ewes without CET and with ME (woCETwME) and T4 (n=12) ewes with CET and with ME (wCETwME). Ovarian activity (OA) and the ovulation rate (OR) were evaluated by laparoscopy. The characteristics of the preovulatory peak of LH were evaluated in response to ME to confirm the first ovulation. The action of the CET, the male effect as well as their interaction, did not increase ($p>0.05$) the number of ovarian follicles of different diameters. The male effect and its interaction with the energy tonic increased ($p\leq 0.05$) the OR (woCETwME: 0.70 and wCETwME: 0.75). The response of the preovulatory peak of LH was similar ($p>0.05$) in ewes with ME with or without CET (wCETwME: 91.7 % and woCETwME: 70.0 %). The male effect and its interaction with CET induce the preovulatory LH peak and the first ovulation in prepubertal Pelibuey ewes.

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: julio, 2015. Aprobado: abril, 2016.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 50: 811-823. 2016.

REC (cRECCeM: 91.7 % y sRECCeM: 70.0 %). El efecto macho y su interacción con el REC inducen el pico preovulatorio de LH y la primera ovulación en ovejas Pelibuey prepúberes.

Palabras clave: Bioestimulación, LH, neurotransmisores, *Ovis aries*, pubertad, tasa ovulatoria.

INTRODUCCIÓN

El inicio de la pubertad en las hembras ovinas se caracteriza por la activación del eje hipotálamico-adenohipofisario-gonadal que precede al establecimiento de la actividad ovárica cíclica (Amstalden *et al.*, 2011), la cual se modifica por el suministro de hormonas exógenas para inducir el pico preovulatorio de la hormona luteinizante (LH), la ovulación y la ocurrencia del estro (Letelier *et al.*, 2011) o para acelerar su inicio, sincronizarlo y mejorar la eficiencia reproductiva en ovejas prepúberes (Abecia *et al.*, 2012).

Los eventos reproductivos responden a los factores ambientales que incluyen el fotoperiodo, la nutrición, el estrés y la bioestimulación. Así, el control de algunos o todos estos factores, permite que la reproducción en las ovejas ocurra sin aplicar hormonas exógenas (Scaramuzzi y Martin, 2008). Estos factores pueden basarse en el conocimiento de los efectos socio-sexuales y nutricionales (Scaramuzzi *et al.*, 2014). Los primeros se describen como una secuencia de eventos fisiológicos y endócrinos de ovejas en anestro, en respuesta a las feromonas de un carnero sexualmente activo (efecto macho) que culmina en la ovulación y en la formación de un cuerpo lúteo (Hawken y Martin, 2012). Los efectos nutricionales pueden observarse al complementar la dieta con aminoácidos neuroestimuladores (Wu, 2010), energía (Schneider *et al.*, 2012) u ofrecer una dieta integral (Kara *et al.*, 2010).

Los mecanismos nutricionales que regulan el inicio de la pubertad implican la integración de sensores y efectores metabólicos, en la función de las neuronas que sintetizan la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en el hipotálamo (Amstalden *et al.*, 2011). Esta comunicación neuronal se favorece por la acción de neurotransmisores y aumenta con el suministro de aminoácidos neuroestimulantes (Brann y Mahesh, 1995): la arginina estimula la secreción de LH en ovejas prepúberes, por ser un constituyente para activar el eje hipotálamico-adenohipofisario-

Key words: Biostimulation, neurotransmitters, *Ovis aries*, puberty, ovulation rate, LH.

INTRODUCTION

The onset of puberty in ewes is characterized by the activation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis that precedes the cyclical ovarian activity (Amstalden *et al.*, 2011). This can be modified by exogenous hormones to induce the preovulatory luteinizing hormone (LH) peak, ovulation and estrus (Letelier *et al.*, 2011) or just to hasten its onset, synchronize and improve reproductive efficiency in prepubertal ewes (Abecia *et al.*, 2012).

Reproductive events respond to environmental factors such as: photoperiod, nutrition, stress and biostimulation. Therefore, controlling some or all of these factors may allow sheep reproduction occur without applying exogenous hormones (Scaramuzzi and Martin, 2008). These factors may be based on the knowledge of socio-sexual and nutritional effects. (Scaramuzzi *et al.*, 2014). The first set of effects describes as a sequence of physiological and endocrine events that occur to anestrous sheep in response to the pheromones of a sexually active ram (male effect). The outcome is ovulation and the formation of the corpus luteum (Hawken and Martin, 2012). Nutritional effects can be observed when supplementing the diet with neuroexcitatory amino acids (Wu, 2010), energy (Schneider *et al.*, 2012) or offering a complete diet (Kara *et al.*, 2010).

Nutritional mechanisms that regulate puberty onset involve the integration of metabolic sensors and effectors in the operation of the neurons that synthesize gonadotropin releasing hormone (GnRH) in the hypothalamus (Amstalden *et al.*, 2011). This neuronal communication is carried out by neurotransmitters and increase with the supply of neuroexcitatory amino acids (Brann and Mahesh, 1995): arginine stimulates the secretion of LH in ewe lambs since it activates the hypothalamic-hypophysial-gonadal axis during pubertal development (Recabarren *et al.*, 1996); aspartate increases the secretion of LH and testosterone in males (Estienne *et al.*, 2000); glutamate induces preovulatory LH and accelerates puberty and reproductive behavior onset (Mahesh and Brann, 2005). Glutamine, proline, and glycine are involved in regulating health, survival,

gonadal durante el desarrollo puberal (Recabarren *et al.*, 1996); el aspartato aumenta la secreción de LH y testosterona en los machos (Estienne *et al.*, 2000); el glutamato induce al pico preovulatorio de LH, acelera el inicio de la pubertad y el comportamiento reproductivo (Mahesh y Brann, 2005). La glutamina, la prolina, y la glicina participan en la regulación de la salud, la supervivencia, el crecimiento, el desarrollo, la lactancia y la reproducción (Wu, 2010); o en la expresión génica, la fertilidad, la neurotransmisión y la inmunidad en los animales (Wu, 2014).

Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar la respuesta del efecto macho y la acción de un reconstituyente energético comercial para inducir la primera ovulación y caracterizar el pico preovulatorio de LH en ovejas Pelibuey prepúberes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del área de estudio

El estudio se realizó de octubre a diciembre de 2011 en el Laboratorio de Reproducción de Ovinos y Caprinos (LaROCa) del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México (19° 29' N, 98° 53' O, 2250 m de altitud y clima Cb (wo) (w) (i) g, que corresponde a templado subhúmedo con lluvias en verano, precipitación y temperatura promedio anual de 636.5 mm y 15.2 °C; García, 2004).

Animales experimentales y manejo

En el estudio se usaron 46 ovejas Pelibuey prepúberes de 215 ± 8.3 d de edad y 24.40 ± 3.54 kg de peso. Cada oveja consumió 2.0 kg d^{-1} de una dieta elaborada con heno molido de avena (70 %) mezclado con un concentrado comercial (30 %) con 15 % proteína cruda y $2.9 \text{ Mcal EM kg}^{-1}$, sales minerales y agua a libre acceso. El peso se registró cada semana para determinar los cambios durante el estudio y registrar el peso en la primera ovulación.

Protocolo experimental y tratamientos

El diseño experimental fue con un arreglo de dos factores, cada uno a dos niveles (2×2): Factor A, con (c) y sin (s) el reconstituyente energético comercial (REC, Metabolase®); y factor B, con (c) y sin (s) efecto macho. Esto generó cuatro tratamientos (T): T1 (n=12) ovejas testigo sin el REC y sin el efecto macho (sRECSEM); T2 (n=12) ovejas con 100 mL del REC cada tercer día durante 15 d y sin el efecto macho (cRECSEM); T3 (n=10)

growth, development, lactation and reproduction (Wu, 2010); these amino acids are also involved in gene expression, fertility, neurotransmission and immunity in animals (Wu, 2014).

Therefore, the objective of this study was to evaluate the response to the male effect and the action a commercial energy supplement has on inducing the first ovulation in prepubertal Pelibuey ewes as well as characterize their preovulatory LH peak.

MATERIALS AND METHODS

Location of the study area

This study was conducted from October to December 2011 in the Sheep and Goat Reproduction Laboratory (LaROCa) at the Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, State of Mexico (19° 29' N, 98° 53' W, 2250 m altitude and Cb(wo)(w)(i)g climate; these is temperate subhumid with summer rains, mean precipitation and temperature of 636.5 mm and 15.2 °C; García, 2004).

Experimental animals and handling

The study group consisted of 46 prepubertal Pelibuey ewes of 215 ± 8.3 d age and weight of 24.40 ± 3.54 kg. Each ewes daily consumed 2 kg of feed consisting of: 70 % milled oat hay, commercial supplement containing 15 % of crude protein and $2.9 \text{ Mcal metabolisable energy kg}^{-1}$ (30 %), unrestricted access to mineral salts and water. They were weekly weighted in order to keep record and to know the weight of each ewe during their first ovulation.

Experimental protocol and treatments

The experimental design consisted of a two factor arrangement of two levels each (2×2): factor A, with (w) and without (wo) a commercial energetic tonic (CET, Metabolase®); factor B, with (w) and without (wo) male effect. The combinations resulted in the design of four treatments (T): T1 (n=12) control group: without CET and without the male effect (woCETwoME); T2 (n=12) ewes with a 100 mL CET every third day for 15 days and without ME (wCETwoME); T3 (n=10) ewes without CET and with the male effect for 56 h (woCETwME); and T4 (n=12) ewes with a 100 mL CET every third day for 15 d and the male effect for 56 h (wCETwME; Figure 1).

The CET (Metabolase®; Schütze-Segen, Italy) contains in each 100 mL: L-carnitine (613.3 mg), thioctic acid (20 mg), pyridoxine (15 mg), cyanocobalamin (3 mg), acetyl methionine

ovejas sin el suministro REC y con el efecto macho durante 54 h (sRECCeEM); y T4 (n=12) ovejas con 100 mL del REC cada tercer día durante 15 d y con el efecto macho durante 54 h (Figura 1).

El REC (Metabolase®; Schütze-Segen, Italia) contenía en cada 100 mL: L-carnitina (613.3 mg), ácido tióctico (20 mg), piridoxina (15 mg), cianocobalamina (3 mg), acetilmetionina (2000 mg), L-arginina (240 mg), L-ornitina (153.2 mg), L-citrulina (120 mg), L-lisina (62.5 mg), glicina (150 mg), ácido aspártico (150 mg), ácido glutámico (150 mg), fructosa (5000 mg) y sorbitol (8000 mg).

Durante siete semanas previas al efecto macho (EM), todas las ovejas se mantuvieron a una distancia mínima de 100 m del corral de los carneros, para evitar el contacto visual, auditivo y olfativo entre ellos; y así aumentar el estímulo al momento del contacto. Después, las ovejas expuestas al macho se condujeron a un corral con una estructura metálica interna, que permitió tener contacto visual, olfativo y auditivo, pero no contacto físico con el carnero; lo cual facilitó el manejo durante la recolección de sangre. Durante el EM el carnero se sustituyó por uno diferente cada 4 h hasta las 56 h.

(2000 mg), L-arginine (240 mg), L-ornithine (153.2 mg), L-citrulline (120 mg), L-lysine (62.5 mg), glycine (150 mg), aspartic acid (150 mg), glutamic acid (150 mg), fructose (5000 mg) and sorbitol (8000 mg).

Seven weeks prior to the male effect stimuli (ME) and in order to potentiate it when the time arrived, all ewes were kept at a minimum distance of 100 m of the rams's pen, avoiding visual, auditory and olfactory contact between them. After the seven weeks, sheep to be exposed to the ME were confined in an internal structure in the barnyard; this allowed the ewes and ram to have visual, olfactory and auditory contact, but no physical contact what so ever. The use of the structure facilitated the handling at the time of the ewe's blood sampling. During the ME the exposed ram was replaced by a different one every 4 h for 56 h.

Ovarian activity Assessment

All ewes were explored by laparoscopy (Mellisho *et al.*, 2006); at first, to diagnose the presence of the corpus luteum (CL) 2 d before the interaction with the ram, and repeated 9 d after in order to assess the response to the treatments (Figure 1).

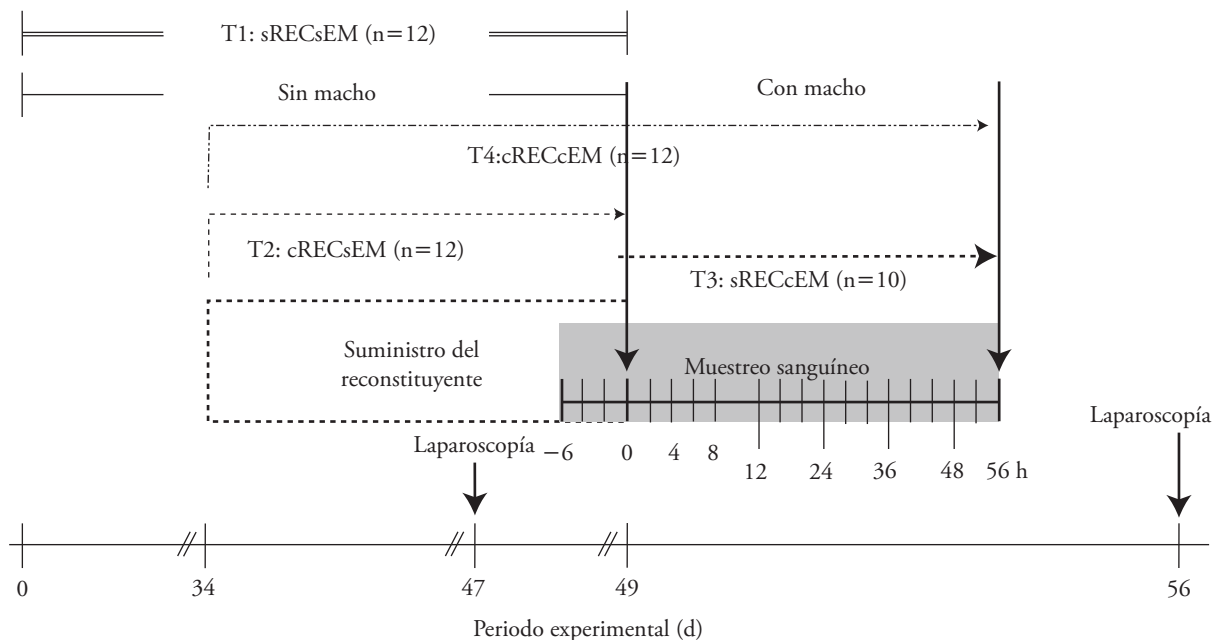


Figura 1. Protocolo de inducción a la ovulación en ovejas Pelibuey prepúberes en respuesta a la acción del reconstituyente energético comercial (cRECCeEM), al estímulo con efecto macho (sRECCeEM), a la interacción de factores (cRECCeEM) y al tratamiento testigo (sRECCeEM).

Figure 1. Protocol for ovulation induction in prepubertal Pelibuey ewes in response to the supply of the commercial energetic tonic (wCETwME), response to the male effect (woCETwME) and the interaction of both factors (wCETwME) and the control group (woCETwME).

Evaluación de la actividad ovárica

Todas las ovejas se exploraron por laparoscopia (Mellisho *et al.*, 2006); la primera vez para diagnosticar la presencia de cuerpo lúteo (CL) y se realizó 2 d antes de introducir al carnero, y se repitió 9 d después para evaluar la respuesta de los tratamientos (Figura 1). Los folículos ováricos se clasificaron de acuerdo con su diámetro aproximado (2 a 3 mm, 4 a 5 mm, y mayores de 6 mm; Bartlewski *et al.*, 2011). La tasa ovulatoria (TO) fue el número total de CL presentes en respuesta a los tratamientos. El porcentaje de ovejas que ovularon se determinó por laparoscopia y con la presentación del pico preovulatorio de LH.

Determinación del pico preovulatorio de la hormona luteinizante (LH)

En las ovejas estimuladas con EM se recolectaron 5 mL de sangre vía punción de la vena yugular cada 2 h, desde 6 h antes de introducir el carnero, hasta 56 h después de su presencia (Figura 1), para observar el pico preovulatorio de LH inducido por el EM y determinar la proporción de ovejas que presentaron el pico: 1) el inicio del pico es el tiempo transcurrido desde la introducción del carnero hasta que la concentración promedio basal de LH por oveja excedió como mínimo dos desviaciones estándar y se mantuvo 4 h (Van Cleeff *et al.*, 1998); 2) la duración del pico es el tiempo desde su inicio o se mantuvo 4 h y terminó cuando volvió a concentraciones basales (Van Cleeff *et al.*, 1998); 3) la amplitud del pico fue la diferencia entre la máxima concentración de LH (ng mL^{-1}) menos la concentración basal (CB) por oveja. La CB fue el promedio entre dos muestras antes y después del pico preovulatorio (Mattioli *et al.*, 1986). Las muestras de sangre se recolectaron en tubos de vidrio de 5 mL y se centrifugaron a 600 *g* por 15 min. En seguida se separó el plasma por decantación y se vertió en tubos de plástico de 5 mL que se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta cuantificar la concentración de LH. El análisis se realizó por radioinmunoanálisis, con la técnica de doble anticuerpo (Perera-Marín *et al.*, 2005), la cual detectó como mínimo 0.03 ng mL^{-1} de LH y 5 y 8 % de coeficientes de variación para el intra e inter ensayo.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron con SAS® (SAS Institute Inc, 2012). La cantidad de folículos ováricos observados por laparoscopia se comparó con el procedimiento NPAR1WAY y la prueba de Kruskal-Wallis. La tasa ovulatoria se analizó con el procedimiento TTEST y la prueba de *t* pareada. La duración y la amplitud del pico preovulatorio sólo se determinó en las ovejas con EM, con un análisis estadístico de mediciones repetidas para un diseño

Ovarian follicles were classified according to their approximate diameter (2 to 3 mm, 4 to 5 mm, and over 6 mm; Bartlewski *et al.*, 2011). Ovulation rate (OR) was the total number of CL present in response to the treatments. The percentage of ovulating females was determined by laparoscopy and by the presence of the preovulatory LH peak.

Luteinizing hormone (LH) preovulatory peak determination

In ewes stimulated with the ME, 5 mL of blood were drawn *via* jugular puncture every 2 h, starting 6 h prior to the interaction with the ram, and finalizing in the 56th h in the ram's presence (Figure 1). These, in order to observe the proportion of ewes that showed the preovulatory LH peak induced by the ME: 1) The beginning of the peak is the elapsed time since the ram introduction until the baseline average concentration of LH per ewe exceeded two standard deviations for 4 h (Van Cleeff *et al.*, 1998); 2) The duration of the peak is the time elapsed from the beginning, or that remained for 4 h, and ended when the levels returned to baseline levels (Van Cleeff *et al.*, 1998); 3) The peak amplitude is the difference between the maximum concentration of LH (ng mL^{-1}) minus the basal concentration (BC) per ewe. The BC is the average of two samples: before and after the preovulatory peak (Mattioli *et al.*, 1986). Blood samples were collected in 5 mL glass tubes, and centrifuged at 600 *g* for 15 min. Afterwards plasma was decanted into 5 mL plastic tubes and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until the quantification of LH's concentration was performed. The analysis was performed by radioimmunoassay, by means of the double antibody technique (Perera-Marín *et al.*, 2005), which detects at least 0.03 ng mL^{-1} of LH and 5 % and 8 % of variation coefficients for the intra-assay and the inter-assay.

Statistical analysis

Data was analyzed with the SAS® software (SAS Institute Inc., 2012). The number of ovarian follicles laparoscopically observed was compared with the NPAR1WAY procedure through the Kruskal-Wallis test. The ovulation rate was analyzed with the TTEST procedure through the paired *t* - test. The duration and amplitude of the preovulatory peak was determined only in ewes subject to the ME, with a statistical analysis of repeated measurements for a complete design with randomized treatments done with the MIXED procedure (Littell *et al.*, 1998); the sampling time was a fixed variable and the LH concentration the random variable.

Data of the sheep that presented the preovulatory LH peak was analyzed with a logistic regression with PROC LOGISTIC

completo con tratamientos aleatorizados mediante el procedimiento MIXTO (Littell *et al.*, 1998); el tiempo de muestreo fue la variable fija y la concentración de LH la variable aleatoria.

Los datos de ovejas que presentaron el pico preovulatorio de LH se analizaron con una regresión logística con PROC LOGISTIC mediante la prueba de Wald. Con los datos de cambio de peso se realizó ANDEVA con el procedimiento MIXTO (Littell *et al.*, 1998), se utilizó LSMEANS para calcular las medias de los mínimos cuadrados de los efectos fijos, y ADJUST para ajustar las pruebas de comparación múltiple de medias en pares (Tukey, $p \leq 0.05$), con un modelo mixto en un arreglo factorial 2×2 , modificado para observar los efectos principales e interacciones en el periodo de evaluación (semanal):

$$Y_{ijkl} = \mu + A_i + B_j + (A*B)_{ij} + dij + P_k + (A*P)_{ik} + (B*P)_{jk} + (A*B*P)_{ijk} + E_{ijkl}$$

donde Y_{ijkl} : variable respuesta, i : 1,2; j : 1,2; k : 1,2...11; l : 1,2.; μ : media general; A_i : efecto del factor A, reconstituyente energético comercial en i ; B_j : efecto del factor B, efecto macho en j ; P_k : efecto del periodo P en k ; dij : error aleatorio dentro de efectos principales (tratamientos); $(AB)_{ij}$, $(AP)_{ik}$, $(BP)_{jk}$, $(ABP)_{ijk}$, $(AB)_{ij}$: efecto de las interacciones; E_{ijkl} : error aleatorio.

El peso de las ovejas con EM en la primera ovulación se determinó con análisis por contrastes ortogonales con el procedimiento GLM.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Folículos ováricos y tasa ovulatoria

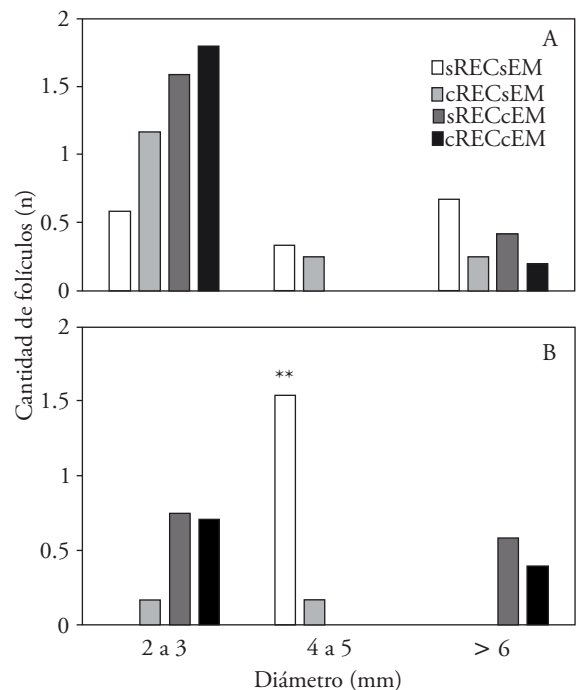
La acción del cRECSEM, el efecto macho (sRECSEM), así como su interacción (cRECcEM), no aumentaron ($p > 0.05$) la cantidad de folículos ováricos de 2 a 3 mm, de 4 a 5 mm, ni los mayores a 6 mm de diámetro. Hubo una cantidad mayor ($p \leq 0.05$) de folículos de 4 a 5 mm de diámetro sólo en las ovejas testigo (sRECSEM; Figura 2).

Zavala-Elizarrarás *et al.* (2008) indican que la raza de las ovejas influye en la cantidad de folículos ováricos, pero no en el diámetro folicular ni en la tasa ovulatoria y reportan 9.3 folículos de 1.5 mm de diámetro y una tasa ovulatoria de 1.4 como promedio para ovejas Pelibuey. Estos valores coinciden con lo reportado por Pellicer-Rubio *et al.* (2013), pero difieren de los obtenidos en las ovejas Pelibuey prepúberes, en nuestro estudio. Quizás la respuesta de los tratamientos para aumentar la cantidad de los folículos ováricos se relacione con el desarrollo folicular ovárico que presentaron las ovejas al iniciar

through the Wald test. Data of weight variation was analyzed with an ANOVA utilizing the MIXED procedure (Littell *et al.*, 1998), LSMEANS was used to calculate the average of the minimum squares of the fixed effects, and ADJUST to arrange the multiple means test in pairs (Tukey, $p \leq 0.05$), with a mixed model in a 2×2 factorial arrangement, modified to observe the main effects and interactions in the evaluation period (weekly):

$$Y_{ijkl} = \mu + A_i + B_j + (A*B)_{ij} + dij + P_k + (A*P)_{ik} + (B*P)_{jk} + (A*B*P)_{ijk} + E_{ijkl}$$

where Y_{ijkl} : response variable, i : 1,2; j : 1,2; k : 1,2... 11; l : 1,2.; μ : general average; A_i : effect of factor A, CET in i ; B_j : effect of factor B, ME in j ; P_k : effect of the period P in: dij : random error within main effects (treatments); $(AB)_{ij}$, $(AP)_{ik}$, $(BP)_{jk}$, $(ABP)_{ijk}$, $(AB)_{ij}$: effects of interactions; E_{ijkl} : random error.



A: laparoscopia para diagnóstico; B: laparoscopia para evaluación de tratamientos. ♦ A: diagnostic laparoscopy; B: treatment evaluation laparoscopy.

Figura 2. Folículos ováricos en ovejas Pelibuey prepúberes en respuesta a la acción del reconstituyente energético comercial (cRECSEM), al efecto macho (sRECSEM), a la interacción de factores (cRECcEM) y al tratamiento testigo (sRECSEM). ** $p \leq 0.01$.

Figure 2. Ovarian follicles in prepubertal Pelibuey ewes in response to the action of the commercial energetic tonic (wCETwME), the male effect (woCETwME), interaction of both factors (wCETwME) and control group (woCETwME) ** $p \leq 0.01$.

los tratamientos. Debido a que la diferenciación folicular se observa en el reclutamiento, donde los folículos sensibles a las gonadotropinas son ≥ 2 mm de diámetro, y en la selección, los folículos ováricos de 4 mm de diámetro son los dominantes, y los demás sufren atresia (Bartlewski *et al.*, 2011).

La primer laparoscopia diagnosticó que ninguna oveja presentó CL y la segunda mostró que la cantidad de CL no aumentó ($p > 0.05$) por acción del cRECcEM, pero sí aumentó ($p \leq 0.05$) en las ovejas Pelibuey prepúberes estimuladas con efecto macho (sRECcEM) y con la interacción con el cRECcEM. Esas ovejas presentaron sólo un CL cada una, por lo cual la tasa ovulatoria fue similar ($p > 0.05$), pero superior ($p \leq 0.05$) al de las ovejas testigo (sRECcEM) y al de aquellas tratadas con el cRECcEM (Cuadro 1).

Alcaraz-Romero *et al.* (2012) reportan 61.5% de ovejas Pelibuey prepúberes que ovularon con efecto macho y presentaron tasa ovulatoria de 1.4 ± 0.2 . Esto difiere del 70 % de ovejas que ovularon con efecto macho (sRECcEM) y presentaron tasa ovulatoria de 0.7 en nuestro estudio. Cuando la ovulación se induce con la presencia del carnero, también se estimula el inicio de la función luteal (Bartlewski *et al.*, 2002). Por tanto, en nuestro estudio, las ovejas Pelibuey prepúberes estimuladas con efecto macho ovularon por la presencia continua del carnero, la cual estimuló la producción de GnRH y la secreción de LH (Abecia *et al.*, 2012). Pero la similitud en la tasa ovulatoria de las ovejas testigo (sRECcEM), con respecto a las suministradas con el REC sin efecto macho (cRECcEM), responde a una falla en la inducción a la ovulación y se atribuye a que la acción del REC quizás no fue suficiente para estimular

The weight of the sheep subject to ME during their first ovulation was determined through orthogonal contrast analysis with the GLM procedure

RESULTS AND DISCUSSION

Ovarian follicles and ovulation rate

The action of the CET (wCETwoME), the ME (woCETwME) and their interaction (wCETwME) did not increase ($p > 0.05$) the number of follicles of any size (2 to 3 mm, 4 to 5 mm, and bigger than 6 mm in diameter). The diameter of the majority of the follicles ($p \leq 0.05$) was between 4 and 5 mm and was observed in the control group (woCETwME, Figure 2).

Zavala-Elizarrarás *et al.* (2008) reported that the breed of the sheep has an impact in the number of ovarian follicles, but not in their follicular diameter or their ovulation rate. They reported 9.3 follicles of 1.5 mm in diameter and a 1.4 average ovulation rate in Pelibuey ewes. These values concurred with those reported by Pellicer-Rubio *et al.* (2013), but differed with the values obtained in prepubertal Pelibuey ewes in the present study. Perhaps, the response to the treatments that increase the number of ovarian follicles is related to the ovarian follicular development the female sheep presented at the beginning of the treatments. Due that follicular differentiation is observed at recruitment, where follicles that are sensitive to gonadotropins have ≥ 2 mm in diameter, and in the selection, 4 mm diameter ovarian follicles are dominant, and the others underwent atresia (Bartlewski *et al.*, 2011).

Cuadro 1. Cantidad de cuerpos lúteos en ovejas Pelibuey prepúberes en respuesta a dos niveles del reconstituyente energético comercial y el efecto macho.

Table 1. Quantity of corpora lutea present in prepubertal Pelibuey ewes in response to two levels of commercial energetic tonic and male effect.

Tratamientos	n	Ovejas que ovularon (n)	Cuerpos lúteos (n)	Tasa ovulatoria
Ovejas testigo	12	0	0	0.00 a
Ovejas con reconstituyente energético y sin "efecto macho"	12	2	2	0.17 a
Ovejas sin reconstituyente energético y con "efecto macho"	10	7	7	0.70 b
Ovejas con reconstituyente energético y con "efecto macho"	12	9	9	0.75 b

a, b: Valores con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). ♦ a, b: Values with distinct letter in a column are statistically different ($p \leq 0.05$).

la actividad ovárica. Esto coincide con el efecto similar en la foliculogénesis y en las concentraciones hormonales de ovejas testigo comparadas con las alimentadas con ración extra de 500 g d⁻¹ de granos de *Lupinus luteus* (Somchit *et al.*, 2007). Pero nuestro resultado contrasta con la diferencia en el inicio de la pubertad en ovejas alimentadas con un complemento de L-arginina (Hamra *et al.*, 2003), o en la eficiencia reproductiva en ovejas que recibieron más vitaminas, minerales, aminoácidos neuroestimuladores y sorbitol en la dieta (Kara *et al.*, 2010).

Pellicer-Rubio *et al.* (2013) no encontraron relación entre el efecto macho y el estado folicular de las ovejas en anestro con la capacidad de ovular por la exposición del macho. Por tanto, quizás la acción neuroestimuladora del glutamato, el aspartato y la arginina contenidos en el REC mejoró la respuesta al efecto macho, y esta interacción se reflejó en la tasa ovulatoria, en la inducción del pico preovulatorio de LH y la ovulación (Estienne *et al.*, 2000; Mahesh y Brann, 2005; Wu, 2010). Estudios posteriores evaluarán la dosis y el suministro para cada aminoácido en el REC, el aprovechamiento y función individual para estimular la actividad ovárica en ovejas prepúberes (Wu, 2014).

Caracterización del pico preovulatorio de la hormona luteinizante (LH)

El efecto macho (sRECcEM) y su interacción con el REC (cRECcEM) no afectaron ($p > 0.05$) las características del pico preovulatorio de LH (Cuadro 2), el porcentaje de respuesta o la concentración (Figura 3) del pico preovulatorio de LH en las ovejas Pelibuey prepúberes.

The first laparoscopy showed that none of the ewes presented CL and the second showed that the CET (wCETwoME) did not increase the appearance of the CL ($p > 0.05$); however the appearance of the CL did increase ($p \leq 0.05$) in ewes stimulated with ME (woCETwME) and with the combined treatment (wCETwME). These ewes had only one CL each; therefore, the ovulation rate was similar ($p > 0.05$), but higher ($p \leq 0.05$) than the control group (woCETwoME) and those treated with CET (wCETwoME; Table 1).

Alcaraz-Romero *et al.* (2012) reported that 61.5% of prepubertal Pelibuey ewes ovulated with the male effect and presented ovulatory rates of 1.4 ± 0.2 . In contrast, findings of our study included 70% of the ewes underwent ovulation due to the male effect (woCETwME) and presented an ovulatory rate of 0.7. When ovulation is induced with the ram presence, the luteal activity onset is also stimulated (Bartlewski *et al.*, 2002). Therefore, in our study, the prepubertal Pelibuey ewes subject to ME, showed ovarian activity which in turn stimulated the production of GnRH and the secretion of the LH (Abecia *et al.*, 2012). But, the similarity in the ovulation rate between the control group (woCETwoME) and the group treated only with CET without ME (wCETwoME) showed that its action is not enough to induce ovarian activity. This agrees with the similar effect in folliculogenesis and hormones concentrations of control ewes, as compared to those fed an extra 500 g d⁻¹ of *Lupinus luteus* grains. (Somchit *et al.*, 2007). But our result contrasts with the onset differences in puberty of ewes fed with a L-arginine supplement (Hamra *et al.*, 2003), or the reproductive efficiency in female sheep that ingested more vitamins, minerals, neuroexcitatory

Cuadro 2. Características del pico preovulatorio de LH en ovejas Pelibuey prepúberes en respuesta al suministro del reconstituyente energético comercial y el efecto macho.

Table 2. Characteristics of preovulatory LH peak in prepubertal Pelibuey ewes in response to the supply of commercial energetic tonic and male effect.

Tratamiento	n	Pico (%)	Inicio [†] (h)	Ocurrencia [†] (h)	Duración [†] (h)	Amplitud [†] (ng mL ⁻¹)
Ovejas sin reconstituyente energético y con "efecto macho"	10	70.0	12.0 ± 4.4	21.1 ± 3.3	11.5 ± 1.0	17.6 ± 0.8
Ovejas con reconstituyente energético y con "efecto macho"	12	91.7	15.8 ± 2.8	23.2 ± 2.6	11.2 ± 1.8	17.5 ± 0.8

No hubo diferencias entre tratamientos ($p > 0.05$). [†]Media ± error estándar. ♦ There were no differences between treatments ($p > 0.05$).
[†]Mean ± standard error.

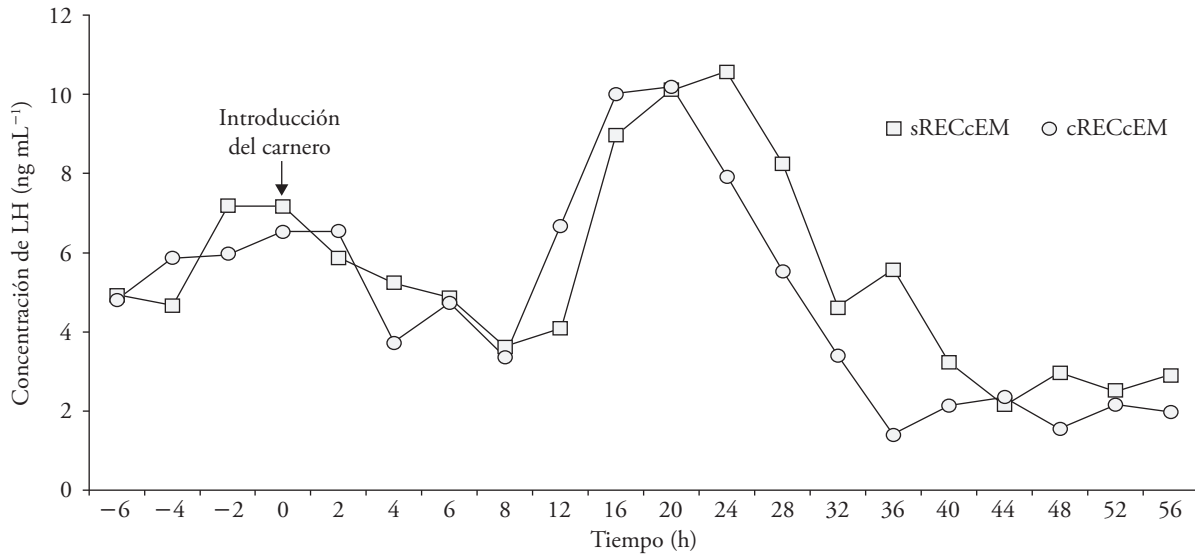


Figura 3. Cantidades plasmáticas de LH en ovejas Pelibuey prepúberes en respuesta al efecto del reconstituyente energético comercial (cRECCeM) y la interacción con el efecto macho (sRECCeM).

Figure 3. Quantity of LH in plasma of prepubertal Pelibuey ewes and to the interaction with male effect (woCETwME) in response to the effect of the commercial energetic tonic (wCETwME).

La introducción repentina de carneros en ovejas anovulatorias modifica la frecuencia pulsátil de GnRH y LH, la descarga preovulatoria de LH ocurre de 3 a 30 h después de la introducción del macho y la ovulación se presenta de 24 a 60 h (Hawken y Martin, 2012). Knights *et al.* (2002) reportaron respuesta total al pico preovulatorio de LH en ovejas expuestas al carnero. Este valor es similar a los resultados obtenidos en nuestro estudio, y la similitud entre tratamientos coincide con la caracterización del pico preovulatorio de LH obtenida por Camacho-Ronquillo *et al.* (2008); pero difiere de los valores reportados por Knights *et al.* (2002). Las diferencias se atribuyen a que las ovejas en anestro ovulan en respuesta a la introducción del carnero, aunque el efecto macho no estimule la secreción de LH, cuando la retroacción del estrógeno es demasiado fuerte (Martin y Cognie, 1984), o que la caracterización del pico preovulatorio de LH se determinó en época diferente del año, porque en época reproductiva se espera una respuesta favorable al efecto macho (Chanvallon *et al.*, 2011). Quizás la presencia continua del macho es el elemento principal que desencadena la presentación del pico preovulatorio de LH, debido a que si el carnero se retira antes de que la oveja ovule, la frecuencia de la secreción pulsátil de LH se reduce a concentraciones basales.

amino acids and sorbitol in their diet (Kara *et al.*, 2010).

Pellicer-Rubio *et al.* (2013) found no a relationship between the male effect and follicular status on ewes in anestrus with ovulation capacity due to the ME. Hence, it is likely that the neuroexcitatory capacity of glutamate, aspartate and arginine contained with the CET enhanced the response to the ME and it is shown in the ovulatory rate and in the induction of the preovulatory LH's peak and ovulation itself (Estienne *et al.*, 2000; Mahesh and Brann, 2005; Wu, 2010). The dosage and supply of each amino acid contained in CET as well as its individual use and function in stimulating ovarian activity in young ewes will be evaluated in subsequent studies (Wu, 2014).

Characterization of the preovulatory luteinizing hormone (LH) peak

The male effect (woCETwME) and its combination with CET (wCETwME) did not affect ($p > 0.05$) the preovulatory LH peak characteristics (Table 2), the response rate or concentration (Figure 3) of preovulatory LH peak in prepubertal Pelibuey ewes.

Cambio de peso corporal

Durante el periodo experimental el efecto macho no afectó ($p > 0.05$) el peso de las ovejas pero la acción del REC y su interacción con el efecto macho (cRECcEM) influyó ($p \leq 0.05$) en el cambio de peso de las ovejas (Cuadro 3).

Las ovejas tratadas con el REC y con efecto macho presentaron peso mayor que las del grupo testigo ($p \leq 0.05$; cRECcEM 25.0 ± 0.68 kg; sRECcEM: 22.2 ± 0.68 kg). El peso de las ovejas con efecto macho en la primera ovulación y con la interacción con el REC se registró a los 63 d del periodo experimental y fue similar entre tratamientos ($p > 0.05$; sRECcEM: 29.3 kg; cRECcEM: 29.8 kg; Figura 4).

En nuestro estudio, el peso a la primera ovulación se asemeja a los 27.6 ± 0.2 kg de peso al primer CL (Zavala-Elizarrarás *et al.*, 2008), pero difirió con los 39 kg de peso a la primera ovulación en ovejas inducidas al pico preovulatorio de LH con efecto macho en época reproductiva (Al-Mauly *et al.*, 1991). También fue similar a los 31.2 ± 0.7 kg de peso a la pubertad en ovejas que recibieron L-arginina (Hamra *et al.*, 2003) y a los 32.5 ± 1.4 kg de peso en ovejas con efecto macho (Álvarez y Andradre, 2008). Estas diferencias se relacionan con la nutrición y la actividad reproductiva en rumiantes, debido a que las evidencias son variables e inconsistentes (Zavala-Elizarrarás *et al.*, 2008).

Las ovejas recibieron la misma dieta durante el experimento; aunque se sometieron a técnicas como la laparoscopia o recolección de sangre frecuente no presentaron cambios de peso corporal. Es posible que las condiciones de manejo en los animales, se consideren como factor estresante para los eventos

The sudden interaction of rams with non-ovulating sheep modifies the sheep's pulse frequency of GnRH and LH. The preovulatory LH peak occurs 3 to 30 h after the beginning of the interaction, and ovulation takes place between 24 and 60 h afterwards (Hawken and Martin, 2012). Knights *et al.* (2002) reported that all ewes exposed to the ram presented an LH's preovulatory peak. This value resembles the results obtained in our study, and the similarity between treatments coincides with the characterization of preovulatory LH obtained by Camacho-Ronquillo *et al.* (2008); but differs from the values reported by Knights *et al.* (2002). The differences are because the ewes in anoestrous ovulate in response to the interaction with the male, even though the male effect does not stimulate the secretion of LH when the estrogen feedback is too strong (Martin and Cognie, 1984). The differences can also be attributed to the time of year when the LH's peak was measured, because during breeding season a favorable response to male effect is expected (Chanvallon *et al.*, 2011). Perhaps the continued presence of the ram is the main element that triggers the preovulatory LH peak, because if the ram is removed before the ewes ovulates, the frequency of the LH's secretion pulse is reduced to baseline concentrations.

Body weight change

During the experimental period the male effect did not affect ($p > 0.05$) the weight of the ewes, but the action of the CET and its interaction with male effect (wCETwME) influenced ($p \leq 0.05$) the weight change of the ewes (Table 3).

Cuadro 3. Prueba para efectos fijos y la interacción por periodo semanal, para el cambio de peso en ovejas Pelibuey prepúberes, en respuesta al reconstituyente energético comercial y al efecto macho.

Table 3. Test for fixed effects and weekly interaction for weight change in Pelibuey ewes, in response to commercial energetic tonic and the male effect.

Efecto	Periodo experimental (d)												P ≤
	0	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	
Reconstituyente energético*tiempo	NS	*	*	*	*	*	*	NS	*	**	NS	**	0.0011
"efecto macho" x tiempo	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.1237
Interacción x tiempo	NS	NS	*	*	*	**	*	NS	NS	**	NS	*	0.0041

NS: No significativo ($p > 0.05$); * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$. ♦ NS non-significant ($p > 0.05$); * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$.

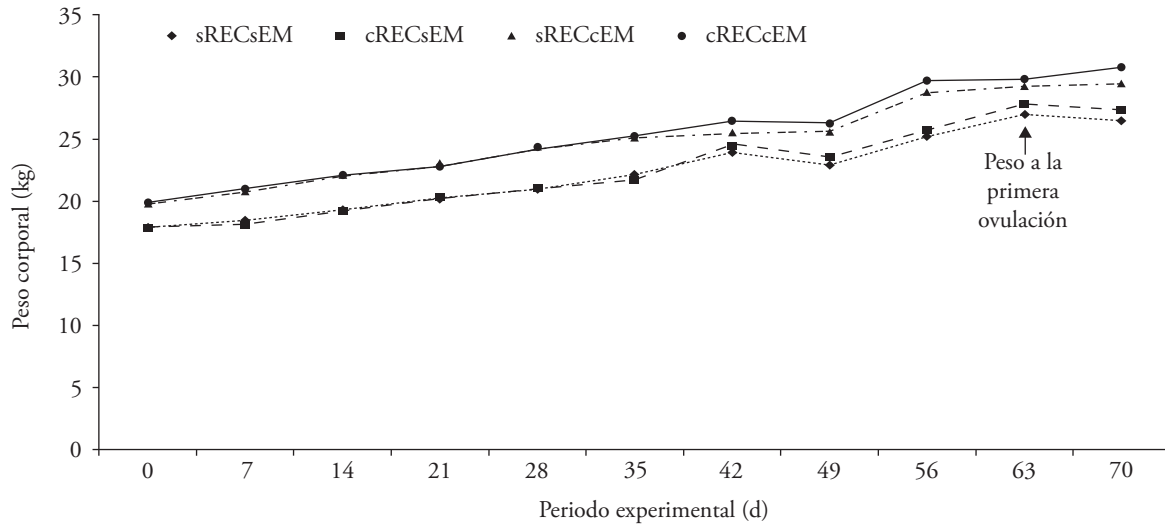


Figura 4. Peso corporal en ovejías Pelibuey prepúberes en respuesta al reconstituyente energético comercial (cRECcEM), al efecto macho (sRECcEM), a la interacción de factores (cRECcEM) y tratamiento testigo (sRECcEM).

Figure 4. Body weight in prepubertal Pelibuey ewes in response to commercial energetic tonic (wCETwME), the male effect (woCETwME), interaction of both factors (wCETwME) and control treatment (woCETwME).

reproductivos, en los que la disminución en peso y la condición corporal baja sean una consecuencia (Dobson *et al.*, 2012). Por tanto, el peso a la pubertad se considera como variable indicativa que se relaciona con los factores ambientales, como las condiciones climáticas, el estado nutricional, la condición corporal y el nivel de estrés (Zavala-Elizarrarás *et al.*, 2008).

Las diferencias encontradas en la tasa ovulatoria y ausentes en la actividad ovárica de las ovejías Pelibuey prepúberes en nuestro estudio, es posible que se asocien a una atresia folicular mayor en ovejías con el REC y sometidas al efecto macho, por lo cual se observaron pocos folículos reclutados y seleccionados para el crecimiento, maduración y ovulación. No obstante, esta hipótesis debe probarse en futuros estudios. Pero la respuesta de las ovejías sin el REC y sin efecto macho, sirvió para comparar los efectos de los tratamientos mencionados. El pico preovulatorio de LH se presentó en las ovejías expuestas a la presencia del carnero, con o sin el suministro del REC. El manejo de las ovejías por laparoscopia o durante la recolección de sangre, no afectaron el peso a la primera ovulación de las ovejías Pelibuey prepúberes con REC.

Ewes treated with the CET and male effect showed a higher weight gain than the control group ($p \leq 0.05$; wCETwME 25.0 ± 0.68 kg; woCETwME: 22.2 ± 0.68 kg). The ewes treated with male effect and CET during their first ovulation were weighted on the 63rd d of the experimental period and the weight was similar between treatments ($p > 0.05$; woCETwME: 29.3 kg and wCETwME: 29.8 kg; Figure 4).

In our study, the weight on the first ovulation is similar to the 27.6 ± 0.2 kg at the first CL reported by Zavala-Elizarrarás *et al.* (2008); but, differed from the 39 kg at first ovulation in ewes induced the preovulatory LH peak with male effect in reproductive season reported by Al-Maulay *et al.* (1991). Also, it was similar to the 31.2 ± 0.7 kg at puberty in ewes receiving L-arginine (Hamra *et al.*, 2003) and to the 32.5 ± 1.4 kg in sheep subject to male effect (Alvarez and Andrade, 2008). These differences relate to nutrition and reproductive activity in ruminants and with variable and inconsistent evidence (Zavala-Elizarrarás *et al.*, 2008).

Ewes received the same diet during the experiment; they did not show changes in body weight even

CONCLUSIONES

La acción del reconstituyente energético, el efecto macho, y su interacción, no aumentan la cantidad de folículos ováricos de diámetro diferente. Pero, el efecto macho y la interacción con el reconstituyente energético mejoran la tasa ovulatoria, influyen en la respuesta a la presentación del pico preovulatorio de LH y en el porcentaje de ovulación.

El peso de las ovejas no cambia por el efecto macho, pero sí con el suministro del reconstituyente energético y la interacción con el efecto macho durante el periodo de evaluación, aunque no hay cambios en el peso a la primera ovulación.

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados a través del Fideicomiso No. 167304/2010-2011, a la LPI-5 Biotecnología Microbiana Vegetal y Animal, al Laboratorio de Reproducción de Ovinos y Caprinos y a la M.V.Z. Clara Murcia Mejía del Departamento de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ-UNAM), por el apoyo para realizar el radioinmunoanálisis.

LITERATURA CITADA

- Abecia, J. A., F. Forcada, and A. González-Bulnes. 2012. Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Anim. Reprod. Sci.* 130: 173-179.
- Alcaraz-Romero, R. A., J. A. Quintal-Franco, D. Hernández-Sánchez, T. Sánchez-Torres, E. Villagómez-Amezcuca, J. Ramón-Ugalde, J. Baeza-Rodríguez, R. Bores-Quintero, and J. G. Cantón Castillo. 2012. Ovarian activity in F1 prepubertal ewe lambs under tropical conditions. *Livest. Sci.* 143: 24-28.
- Al-Maully, N. Z. N., M. J. Bryant, and F. J. Cunningham. 1991. Effect of the introduction of rams on the pulsatile release of luteinizing hormone and the onset of reproductive activity in ewe lambs. *Anim. Prod.* 53: 209-214.
- Álvarez, L. and S. Andrade. 2008. The male effect reduces the age to first estrus and to ovulation in Pelibuey ewe lambs. *Arch. Zoot.* 57: 91-94.
- Amstalden, M., B. R. C. Alves, S. Liu, R. C. Cardoso, and G. L. Williams. 2011. Neuroendocrine pathways mediating nutritional acceleration of puberty: insights from ruminant models. *Front. Endocrinol.* 2: 1-7.
- Bartlewski, P. M., A. P. Beard, S. J. Cook, and N. C. Rawling. 2002. Ovarian activity during sexual maturation and following introduction of the ram to ewe lambs. *Small Ruminant Res.* 43: 37-44.

though they underwent stressing techniques such as laparoscopy and frequent blood sampling. The conditions of animal handling may be considered stressful for reproductive events, in which weight loss and low body weight may be a consequence (Dobson *et al.*, 2012). Therefore, the weight at puberty is considered as an indicative variable that is related to environmental factors, such as weather conditions, nutritional status, body condition and the stress level (Zavala-Elizarrarás *et al.*,

The differences found in the ovulation rate and absent in the ovaric activity of prepubertal Pelibuey ewes, in our study, may be associated with a major follicular atresia in ewes supplied with the CET and subject to male effect; that is the reason why we observed few follicles recruited and selected for growth, maturation and ovulation. Nevertheless, this hypothesis should be tested in future studies. But the response of ewes without CET and male effect served to compare the effects of the above treatments. The preovulatory LH peak occurred in sheep exposed to the ram, with or without CET supply. The handling of the sheep during laparoscopy and blood collection did not affect the body weight in the first ovulation of prepubertal Pelibuey CET.

CONCLUSIONS

The restorative action of the commercial energetic tonic, the male effect, and the interaction of both, do not increase the number of ovarian follicles of different diameter. But the male effect combined with commercial energetic tonic improves the ovulation rate, influences the response to the presentation of the preovulatory LH peak as well as the ovulation percentage.

The male effect does not cause weight fluctuation in prepubertal Pelibuey ewes; however, the combination of male effect and commercial energetic tonic during the evaluation period caused weight gain, though there is no effect in the weight at the first ovulation.

—End of the English version—

-----*-----

- Bartlewski, P. M., T. E. Baby, and J. L. Giffin. 2011. Reproductive cycles in sheep. *Anim. Rep. Sci.* 124: 259-268.
- Brann, D. W., and V. B. Mahesh. 1995. Glutamate: a major neuroendocrine excitatory signal mediating steroid effects on gonadotropin secretion. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* 53: 325-329.
- Camacho-Ronquillo, J. C., J. C. Rodríguez-Castillo, J. E. Hernández-Hernández, A. Pro-Martínez, C. M. Becerril-Pérez y J. Gallegos-Sánchez. 2008. Características reproductivas de ovejás Pelibuey sincronizadas e inducidas a la pubertad. *Arch. Lat. Prod. Anim.* 16: 18-24.
- Chanvallon, A., L. Sagot, E. Pottier, N. Debus, D. François, T. Fassier, R. J. Scaramuzzi, and C. Fabre-Nys. 2011. New insights into the influence of breed and time of the year on the response of ewes to the 'ram effect'. *Animal* 5: 1594-1604.
- Dobson, H., C. Fergani, J. E. Routly, and R. F. Smith. 2012. Effects of stress on reproduction in ewes. *Anim. Rep. Sci.* 130: 135-140.
- Estienne, M. J., C. R. Barb, and R. R. Kraeling. 2000. Neuroendocrine regulation of reproduction in male domestic animal species: Role of excitatory amino acids. *J. Anim. Sci.* 77: 1-10.
- García, E. 2004. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana) 5ª ed. Instituto de Geografía. UNAM. México.
- Hamra, A. H., F. M. A. Al-Dabbas, and F. T. Awawdeh. 2003. Effect of arginine supplementation on puberty and some reproductive traits in female Awassi sheep. *J. Agric. Inv.* 20: 82-85.
- Hawken, P. A. R., and G. B. Martin. 2012. Sociosexual stimuli and gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone secretion in sheep and goats. *Dom. Anim. Endocrinol.* 43: 85-94.
- Kara, Ç., A. Orman, E. Topal, and E. Çarkungöz. 2010. Effects of supplementary nutrition in Awassi ewes on sexual behaviors and reproductive traits. *J. Biol. Environ. Sci.* 4: 15-21.
- Knights, M., Q. S. Baptiste, and P. E. Lewis. 2002. Ability of ram introduction to induce LH secretion, estrus and ovulation in fall-born ewe lambs during anestrus. *Anim. Rep. Sci.* 69: 199-209.
- Letelier, C. A., I. Contreras-Solis, R. A. García-Fernández, M. A. Sánchez, P. García-Palencia, B. Sánchez, C. Ariznavarreta, J. A. F. Tresguerres, J. M. Flores, and A. Gonzalez-Bulnes. 2011. Effects of oestrus induction with progestagens or prostaglandin analogues on ovarian and pituitary function in sheep. *Anim. Rep. Sci.* 126: 61-69.
- Littell, R. C., P. R. Henry, and C. B. Ammerman. 1998. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *J. Anim. Sci.* 76: 1216-1231.
- Mahesh, V. B., and D. W. Braan. 2005. Regulatory role of excitatory amino acids in reproduction. *Endocrine* 28: 271-280.
- Martin, G. B., and Y. C. Cognie. 1984. Induction of LH secretion and ovulation in anoestrous Romanov ewes by the introduction of rams. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 13: 174.
- Mattioli, M., F. Conte, G. Giovanna, and E. Seren. 1986. Effect of naloxone on plasma concentration of prolactin and LH in lactating sows. *J. Rep. Fert.* 76: 167-173.
- Mellisho, S. E., H. R. Pinazo, F. L. Chauca, V. P. Cabrera, y P. V. Rivas. 2006. Inseminación intrauterina vía laparoscópica de ovejás Black Belly con semen congelado. *Rev. Invest. Vet. Perú.* 17: 131-136.
- Pellicer-Rubio, M. T., J. L. Touzúa, G. Baril, and B. Malpau. 2013. The luteal outcome of anoestrus ewes induced to ovulate by the male effect is not related to the population of ovarian antral follicles before male exposure. *Anim. Rep. Sci.* 137: 23-30.
- Perera-Marín, G., C. Murcia, S. Rojas, J. Hernández-Cerón, and E. González-Padilla. 2005. Pattern of circulating luteinizing hormone isoforms during the estrous and luteal phases in Holstein heifers. *Anim. Rep. Sci.* 86: 53-69.
- Recabarren, S. E., A. Jofré, A. Lobos, P. Orellana, and J. Parilo. 1996. Effect of arginine and ornithine infusions on luteinizing hormone secretion in prepubertal ewes. *J. Anim. Sci.* 74: 162-166.
- SAS Institute Inc. 2012. SAS user's Guide Statistics, version 9.4 (TS1MO). Cary, N. C. USA.
- Scaramuzzi, R. J., and G. B. Martin. 2008. The importance of interactions among nutrition, seasonality and socio-sexual factors in the development of hormone-free methods for controlling fertility. *Reprod. Domest. Anim.* 43: 129-136.
- Scaramuzzi, R. J., L. Oujagir, J-B. Menassol, S. Freret, A. Piezel, H. M. Brown, J. Cognié, and C. Fabre-Nys. 2014. The pattern of LH secretion and the ovarian response to the 'ram effect' in the anoestrous ewe is influenced by body condition but not by short-term nutritional supplementation. *Reprod. Fertil. Dev.* 26: 1154-1165.
- Schneider, J. E., C. M. Klingerman, and A. Abdulhay. 2012. Sense and nonsense in metabolic control of reproduction. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 26: 1-21.
- Somchit, A., B. K. Campbell, M. Khalid, N. R. Kendall, and R. J. Scaramuzzi. 2007. The effect of short-term nutritional supplementation of ewes with lupin grain (*Lupinus luteus*), during the luteal phase of the estrous cycle on the number of ovarian follicles and the concentrations of hormones and glucose in plasma and follicular fluid. *Theriogenology* 68: 1037-1046.
- Van Cleeff, J., F. J. Karsh, and V. Padmanabhan. 1998. Characterization of endocrine events during the peri-estrous period in sheep after oestrous synchronization with controlled internal drug release (CIDR) device. *Domest. Anim. Endocrin.* 15: 23-24.
- Wu, G. 2010. Functional amino acids in growth, reproduction, and health. *Am. Soc. Nutr. Adv. Nutr.* 1: 31-37.
- Wu, G. 2014. Dietary requirements of synthesizable amino acids by animals: a paradigm shift in protein nutrition. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 5: 1-12.
- Zavala-Elizarraráz, R., J. R. Ortiz-Ortiz, J. P. Ramón-Ugalde, P. M. Morales, A. Sierra-Vásquez, y J. R. Sanginés-García. 2008. Pubertad en hembras de cinco razas ovinas de pelo en condiciones de trópico seco. *Zoot. Trop.* 26: 465-473.