

RESPUESTA ESTRAL Y PERFIL HORMONAL EN OVEJAS DE PELO SINCRONIZADAS CON PROTOCOLOS CORTOS A BASE DE PROSTAGLANDINAS

ESTRUS RESPONSE AND HORMONAL PROFILE IN HAIR SHEEP SYNCHRONIZED WITH SHORT PROSTAGLANDIN PROTOCOLS

Jaime Arroyo-Ledezma^{1*}, Javier Hernández-López², Narciso Y. Ávila-Serrano¹, Marco A. Camacho-Escobar¹

¹Laboratorio de Reproducción. Universidad del Mar. Campus Puerto Escondido. Ciudad Universitaria, Km. 1.5, Carretera Sola de Vega – Puerto Escondido, Puerto Escondido 71980, Oaxaca, México. (arroyo@zicatel.umar.mx) ²Consultor Independiente en Producción Animal, Puerto Escondido, Oaxaca, México

RESUMEN

La prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) y sus análogos, aplicados en dos inyecciones con intervalos de 7 a 11 d, se utilizan para sincronizar estros en ovinos de razas europeas. La respuesta a estos protocolos en ovejas de pelo no es clara. Con el objetivo de evaluar dos protocolos cortos de sincronización con $PGF_{2\alpha}$ en 20 ovejas de pelo, cíclicas (3.5 ± 1.0 años de edad y peso corporal de 37.8 ± 3.0 kg), se asigna al azar uno de dos tratamientos: 1) aplicación IM de dos inyecciones de $PGF_{2\alpha}$ (cloprostenol, 500 μ g por dosis) con intervalo de ocho días y 2) aplicación de cuatro inyecciones IM de $PGF_{2\alpha}$ (cloprostenol, 500 μ g por dosis), dos en el día 0, cada 8 h y dos el día 8 con intervalo de 8 h. El diseño experimental fue completamente al azar con dos tratamientos y 10 repeticiones; la unidad experimental fue una oveja. El porcentaje de ovejas en estro fue similar ($p > 0.05$) entre grupos (90 y 100 %, tratamientos 1 y 2). No hubo diferencia ($p > 0.05$) entre grupos en el intervalo del final de tratamiento y el estro (34.4 ± 4.9 h y 34.8 ± 3.7 h, tratamientos 1 y 2), la duración del estro fue mayor ($p \leq 0.05$) en el tratamiento 2 (49 ± 4.4 h) comparado con el tratamiento 1 (35 ± 4.2 h). El pico preovulatorio de LH ocurrió entre 10 (tratamiento 2) y 11 h (tratamiento 1) ($p > 0.05$) después del inicio del estro. La aplicación de dos o cuatro inyecciones de $PGF_{2\alpha}$ con intervalo de 8 d, en ovejas de pelo cíclicas, es efectiva en programas de sincronización en el trópico.

Palabras clave: Sincronización de estros, prostaglandina $F_{2\alpha}$, cloprostenol, ovejas de pelo, trópico.

ABSTRACT

Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) and its analogues were used to synchronize estrus in European race sheep, by applying two injections with intervals of 7 to 11 d. The response to these protocols in hair sheep is not clear. With the objective of evaluating two short synchronization protocols with $PGF_{2\alpha}$ in 20 cyclic hair sheep, (3.5 ± 1.0 years of age and body weight of 37.8 ± 3.0 kg), one of two treatments were assigned randomly: 1) IM application of two injections of $PGF_{2\alpha}$ (cloprostenol, 500 μ g per dosis) with an eight-day interval, and 2) application of four IM injections of $PGF_{2\alpha}$ (cloprostenol, 500 μ g per dosis), two on day 0, every 8 h and two on day 8 with an 8 h interval. The experimental design was completely random with two treatments and 10 repetitions; the experimental unit was one sheep. The percentage of sheep in estrus was similar ($p > 0.05$) between groups (90 to 100 %, treatments 1 and 2). There was no difference ($p > 0.05$) between groups in the interval at the end of the treatment and the estrus (34.4 ± 4.9 h and 34.8 ± 3.7 h, treatments 1 and 2); the length of the estrus was longer ($p \leq 0.05$) in treatment 2 (49 ± 4.4 h) as compared to treatment 1 (35 ± 4.2 h). The preovulatory peak of LH occurred between 10 h (treatment 2) and 11 h (treatment 1) ($p > 0.05$) after the beginning of the estrus. The application of two to four injections of $PGF_{2\alpha}$ with an interval of 8 d, in cyclic hair sheep, is effective in synchronization programs in the tropics.

Keywords: Estrus synchronization, prostaglandin $F_{2\alpha}$, cloprostenol, hair sheep, tropics.

INTRODUCTION

In non-expectant ruminants, luteal regression is caused by the $PGF_{2\alpha}$ secreted from the uterus in a series of 5 to 8 pulses (Silva *et al.*, 1991). There

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: junio, 2014. Aprobado: abril, 2015.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 49: 475-482. 2015.

INTRODUCCIÓN

En los rumiantes no gestantes, la regresión lútea es causada por la $\text{PGF}_{2\alpha}$ secretada del útero en series de 5 a 8 pulsos (Silva *et al.*, 1991). Existe variabilidad entre especies en la duración y magnitud de los pulsos, pero ocurren en intervalos de 6 a 9 h permanentemente (McCracken *et al.*, 1999). El desarrollo de análogos potentes de $\text{PGF}_{2\alpha}$ como el cloprostenol, permitió sincronizar estros en varias especies domésticas desde la inducción prematura de la regresión lútea (Fierro *et al.*, 2013). La sensibilidad al tratamiento varía de acuerdo con la etapa del ciclo estral, por lo cual, una doble aplicación del fármaco con intervalo de 11 d es el protocolo usado con mas frecuencia en ovejas (Wildevus, 2000; Arroyo-Ledezma *et al.*, 2013). El CL es particularmente sensible al efecto luteolítico de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ cuando se administra simulando un modelo de secreción pulsátil (Schramm *et al.*, 1983). La administración de $\text{PGF}_{2\alpha}$ o sus análogos en la fase lútea temprana no causa regresión lútea (Tsai y Wiltbank, 1998; Fierro *et al.*, 2013). En cambio, en la fase media del ciclo, destruye al CL debido a mecanismos como la síntesis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ intralútea, vía prostaglandina G/H sintetasa-2 e inducción de procesos inmunológicos, como la expresión de la proteína-1, quimioatrayente de los monocitos (Tsai y Wiltbank, 1998). En ovejas de pelo la sincronización con dos inyecciones de $\text{PGF}_{2\alpha}$ aplicadas con intervalo de 8 d no fue efectiva, ya que 60 % de hembras no mostró regresión lútea después de la segunda dosis (Hernández-Cerón *et al.*, 2001). Sin embargo, estos resultados deben confirmarse porque en ovejas los tratamientos cortos de sincronización con $\text{PGF}_{2\alpha}$ o sus análogos son efectivos (Rubianes *et al.*, 2003; Contreras-Solís *et al.*, 2009). Por lo tanto, una aplicación doble de $\text{PGF}_{2\alpha}$ con intervalo de 8 d sincroniza el estro en ovejas de pelo y, si se simula el modo de secreción pulsátil de la $\text{PGF}_{2\alpha}$, podría mejorar la respuesta fisiológica. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la respuesta estral, la concentración de LH y P4 en dos protocolos de sincronización con $\text{PGF}_{2\alpha}$ (cloprostenol) aplicando dos o cuatro inyecciones con un intervalo de 8 d en ovejas de pelo en el trópico.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Modulo Ovino de la Universidad del Mar, Oaxaca, México (15° 52' N, 97° 04' O), en noviembre

is variability among species in terms of duration and magnitude of the pulses, but they occur in intervals of 6 to 9 h permanently (McCracken *et al.*, 1999). The development of potent $\text{PGF}_{2\alpha}$ analogues like cloprostenol allowed synchronizing estruses in several domestic species from the premature induction of the luteal regression (Fierro *et al.*, 2013). Sensitivity to the treatment varies depending on the stage of the estrus cycle; therefore, a double application of the drug with an interval of 11 d is the protocol most frequently used in sheep (Wildevus, 2000; Arroyo-Ledezma *et al.*, 2013). The CL seems to be particularly sensitive to the luteolytic effect of $\text{PGF}_{2\alpha}$ when applied to simulate a model of pulsatile secretion (Schramm *et al.*, 1983). The administration of $\text{PGF}_{2\alpha}$ or its analogues during the early luteal phase does not cause luteal regression (Tsai and Wiltbank, 1998; Fierro *et al.*, 2013). In contrast, during the middle phase of the cycle, it destroys the CL due to mechanisms such as the synthesis of intraluteal $\text{PGF}_{2\alpha}$, via prostaglandin G/H synthetase-2, and the induction of immunological processes, such as the expression of protein-1, which attracts chemicals in monocytes (Tsai and Wiltbank, 1998). In hair sheep the synchronization with two injections of $\text{PGF}_{2\alpha}$ applied with an interval of 8 d was not effective, since 60 % of the females did not show luteal regression after the second dose (Hernández-Cerón *et al.*, 2001). However, these results must be confirmed because in sheep, short synchronization treatments with $\text{PGF}_{2\alpha}$ or its analogues are effective (Rubianes *et al.*, 2003; Contreras-Solís *et al.*, 2009). Therefore, a double application of $\text{PGF}_{2\alpha}$ with an 8 d interval synchronizes the estrus in hair sheep, might improves the physiological response, if the pulsatile secretion mode of the $\text{PGF}_{2\alpha}$ is simulated. Thus, the objective of this study was to evaluate the estrus response, the LH and P4 concentration in two synchronization protocols with $\text{PGF}_{2\alpha}$ (cloprostenol), applying two or four injections with an interval of 8 d in hair sheep in the tropics.

MATERIALS AND METHODS

The study was performed in the Sheep Module of Universidad del Mar, Oaxaca, México (15° 52' N, 97° 04' W), in November (reproductive season; Arroyo *et al.*, 2007), with 20 hair sheep (37.8±3.0 kg live weight, body condition 3.0±0.5 and 3.5±1.0 years of age). Treatments, randomly assigned to sheep, were: 1) two IM injections of 500 mg cloprostenol (analogue of $\text{PGF}_{2\alpha}$,

(época reproductiva; Arroyo *et al.*, 2007), con 20 ovejas de pelo (37.8 ± 3.0 kg peso vivo, condición corporal 3.0 ± 0.5 y 3.5 ± 1.0 años de edad). Los tratamientos asignados de manera aleatoria a las ovejas fueron: 1) dos inyecciones IM de 500 μ g de cloprostenol (análogo de PGF_{2 α} , Celosil®, Schering-Plough, México) con intervalo de 8 d; y 2) cuatro inyecciones IM de 500 μ g de cloprostenol, dos aplicadas el día 0, cada 8 h y dos el día 8 con intervalo de 8 h. El diseño experimental fue completamente al azar, con dos tratamientos, 10 repeticiones y una oveja como unidad experimental. La detección de estros inició 12 h después de finalizar ambos tratamientos, se realizó cada 2 h por 15 min y concluyó cuando las hembras rechararon a los sementales. Muestras sanguíneas de todas las hembras se obtuvieron cada día por punción yugular, usando tubos vacutainer con heparina (BD® Diagnostic systems, Mexico). El muestreo inició al aplicar la primera dosis de PGF_{2 α} y concluyó 4 d después de finalizar ambos tratamientos. Con muestreos sanguíneos adicionales, realizados cada 2 h hasta concluir el estro en 5 ovejas de cada grupo, se determinó el pico preovulatorio de LH. Las concentraciones de progesterona se determinaron por radioinmunoanálisis en fase sólida (Pulido *et al.*, 1991), con un kit comercial (Coat-A-Count® Progesterone, Siemens, EE.UU.) y un contador de radiaciones gamma (serie 078, Oakfield®, Inglaterra) de 12 pozos, y eficiencia superior a 75 %. La sensibilidad analítica del ensayo fue 0.02 ng mL⁻¹ y coeficiente de variación intraensayo 3.3 %. Las concentraciones de LH se determinaron por radioinmunoanálisis en fase líquida de acuerdo con la técnica estandarizada por Perera-Marín *et al.* (2005) y Arrieta *et al.* (2006). Ambas evaluaciones hormonales se realizaron en el Laboratorio de Endocrinología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. La proporción de hembras que respondieron a los tratamientos se analizó con la prueba de Ji-cuadrada. Los intervalos del final del tratamiento al estro, al pico preovulatorio de LH, y la duración del estro se evaluaron con ANDEVA, con el procedimiento GLM de SAS, y las medias de tratamientos se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Las concentraciones de progesterona plasmática se evaluaron con un ANDEVA de medidas repetidas y el procedimiento MIXTO de SAS, con el modelo estadístico:

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \delta_{ij} + \rho_k + (\tau\rho)ik + \epsilon_{ijk}$$

donde μ es el promedio general, τ_i efecto del i-ésimo tratamiento, δ_{ij} error asociado al i-ésimo tratamiento en la j-ésima unidad experimental, ρ_k efecto del k-ésimo periodo de tiempo, $\tau\rho$ interacción tratamiento por periodo de tiempo, ϵ_{ijk} errores asociados a los periodos de tiempo.

Celosil®, Schering-Plough, México), with an interval of 8 d; and, 2) four IM injections of 500 mg of cloprostenol, two applied on day 0, every 8 h, and two on day 8 with an 8 h interval. The experimental design was completely random with two treatments, 10 repetitions and one sheep as an experimental unit. The detection of estruses began 12 h after both treatments ended; it was done every 2 h for 15 min, and concluded when the females rejected the ram. Blood samples from all the females were obtained daily through jugular puncture, and vacutainer tubes with heparin (BD® Diagnostic systems, México) were used for this purpose. The sampling began when the first dosis of PGF_{2 α} was applied and concluded 4 d after ending both treatments. The preovulatory LH peak was determined with additional blood samples, done every 2 h until the estrus concluded in 5 sheep from each group. The progesterone concentrations were determined through solid phase radioimmunoanalysis (Pulido *et al.*, 1991), with a commercial kit (Coat-A-Count® Progesterone, Siemens, USA), and a gamma radiations counter (series 078, Oakfield®, England) of 12 wells, and efficiency above 75 %. The analytical sensitivity of the essay was 0.02 ng mL⁻¹ and intra-essay variation coefficient 3.3 %. The LH concentrations were determined through radioimmunoanalysis in liquid phase according to the technique standardized by Perera-Marín *et al.* (2005) and Arrieta *et al.* (2006). Both hormonal evaluations were performed in the Endocrinology Laboratory of the Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. The proportion of females that responded to the treatments was analyzed with the Chi-squared test. The intervals from the end of the treatment to the estrus, the preovulatory LH peak, and the length of the estrus were evaluated with ANDEVA, with SAS GLM procedure, and the means comparison between treatments was performed with the Tukey test ($p \leq 0.05$). The plasmatic progesterone concentrations were evaluated with a variance analysis of repeated measurements, with SAS MIXED procedure, with the following statistical model:

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \delta_{ij} + \rho_k + (\tau\rho)ik + \epsilon_{ijk}$$

where μ is the general average, τ_i the effect of the i-th treatment, δ_{ij} error associated to the i-th treatment in the j-th experimental unit, ρ_k effect of the k-th time period, $\tau\rho$ interaction treatment per time period, ϵ_{ijk} errors associated to time periods.

RESULTS AND DISCUSSION

The percentage of sheep with estrus and the interval at the end of the treatment during estrus

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El porcentaje de ovejas en estro y el intervalo del final de tratamiento al estro fueron similares ($p>0.05$) entre tratamientos (Cuadro 1). Los resultados del este estudio mostró que la aplicación de dos o cuatro inyecciones de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (cloprostenol), con intervalo de 8 d, induce respuestas fisiológicas reproductivas similares en ovejas de pelo en el trópico (Cuadro 1). La duración del estro fue mayor ($p\leq 0.05$) en el tratamiento 2 (49 ± 4.4 h) respecto al tratamiento 1 (35 ± 4.2 h) (Cuadro 1). Respecto a la explicación fisiológica de este evento, durante el ciclo estral la concentración periférica de estradiol disminuye antes o al finalizar el pico preovulatorio de LH, y en contraste, la secreción de GnRH y la receptividad sexual continúan algunas horas (Goodman, 1994). En ovejas ovariectomizadas tratadas con P4 la conducta estral coincide con el aumento en la secreción de GnRH (Moenter *et al.*, 1990; Goodman, 1994; Caraty *et al.*, 1998), y la duración del pico de GnRH es independiente de la concentración alta de estradiol (Evans *et al.*, 1997). Según Caraty *et al.* (2002), en ovejas la mayor duración del pico preovulatorio de GnRH, observado en la fase folicular tardía, prolonga la receptividad sexual aún después de que la concentración del estradiol disminuye en la circulación periférica. Por lo tanto, se sugiere que la duración mayor del estro en las ovejas del tratamiento 2 se puede deber a una amplitud mayor en el pico preovulatorio de GnRH, lo cual probablemente prolonga la conducta estral, evento no asociado con la aplicación doble de $\text{PGF}_{2\alpha}$.

were similar ($p>0.05$) between treatments (Table 1). The results of this study showed that applying two or four injections of $\text{PGF}_{2\alpha}$ (cloprostenol), with an 8-day interval, induces similar reproductive physiological responses in hair sheep in the tropics (Table 1). The length of the estrus was longer ($p\leq 0.05$) in treatment 2 (49 ± 4.4 h) in comparison to treatment 1 (35 ± 4.2 h) (Table 1). With regard to the physiological explanation of this event, during the estrus cycle the peripheral concentration of estradiol decreases before or at the end of the preovulatory LH peak, and in contrast, secretion of GnRH and sexual receptivity continue for some hours (Goodman, 1994). In sheep that have had ovariectomies and treated with P4, the estrus behavior coincides with the increase in GnRH secretion (Moenter *et al.*, 1990; Goodman, 1994; Caraty *et al.*, 1998), and the length of the GnRH peak is independent from the high estradiol concentration (Evans *et al.*, 1997). According to Caraty *et al.* (2002), in sheep the longer duration of the preovulatory GnRH peak, observed during the late follicular phase, prolongs the sexual receptivity even after estradiol decreases its concentration in the peripheral circulation. Therefore, it is suggested that the longer duration of the estrus in sheep from treatment 2 could be consequence of greater amplitude on the preovulatory GnRH peak, which will probably prolongue the estrus behavior, an event not associated to the double application of $\text{PGF}_{2\alpha}$.

The length of the estrus can also increase due to the higher expression of receptors for estradiol in the mediobasal hypothalamus, where this steroid induces the estrus behavior (Ben-Saïd *et al.*, 2007). In our

Cuadro 1. Respuesta reproductiva en ovejas de pelo sincronizadas con dos protocolos cortos a base de prostaglandinas.

Table 1. Reproductive response in hair sheep synchronized with two short protocols based on prostaglandins.

Variable	n	Tratamiento 1	Tratamiento 2
Ovejas en estro (%)	10	90a	100a
Inicio del estro (h; media $\pm$ EE)	10	$34.4 \pm 4.90a$	$34.8 \pm 3.70a$
Duración del estro (h; media $\pm$ EE)	10	$35.0 \pm 4.20a$	$49.0 \pm 4.40b$
Intervalo final de tratamiento al pico preovulatorio de LH (h; media $\pm$ EE)	5	$47.6 \pm 2.90a$	$38.8 \pm 2.90a$
Intervalo estro al pico preovulatorio de LH (h; media $\pm$ EE)	5	$11.0 \pm 1.97a$	$10.5 \pm 4.03a$
Duración del pico preovulatorio de LH (h; media $\pm$ EE)	5	$8.0 \pm 1.76a$	$7.2 \pm 1.76a$

^{a,b} Letras diferentes en un renglón indican diferencia estadística ($p\leq 0.05$). Tratamiento 1: Dos inyecciones IM de $500\mu\text{g}$ de cloprostenol (análogo de $\text{PGF}_{2\alpha}$) con intervalo de 8 d. Tratamiento 2: Cuatro inyecciones IM de $500\mu\text{g}$ de cloprostenol, dos aplicadas el día 0, cada 8 h y dos el día 8 con intervalo de 8 h. ^{a,b} Different letters in a row indicate statistical difference ($p\leq 0.05$). Treatment 1: Two IM injections of $500\mu\text{g}$ of cloprostenol ($\text{PGF}_{2\alpha}$ analogue) with 8 d interval. Treatment 2: Four IM injections of $500\mu\text{g}$ of cloprostenol, two applied on day 0 every 8 h, and two on day 8 with 8 h interval.

La duración del estro también puede aumentar debido a la expresión mayor de receptores para estradiol en el hipotálamo mediobasal, donde este esteroide induce la conducta estral (Ben-Saïd *et al.*, 2007). En nuestro estudio, el estro en ambos tratamientos duró 34 h, tiempo reportado (24 a 56 h) para ovejas (Hanrahan y Quirke, 1975; Quirke *et al.*, 1979).

Los resultados del intervalo final de tratamiento, pico preovulatorio de LH, estro, pico preovulatorio de LH, y duración del pico preovulatorio de LH fueron similares ($p>0.05$) entre grupos (Cuadro 1). El pico preovulatorio de LH ocurrió entre 10 y 11 h después de iniciado el estro, intervalo mayor que el registrado en ovejas Romanov, donde el pico de LH ocurrió 8 h después del estro (Ben-Saïd *et al.*, 2007). En ovejas Ile de France x Romanov la duración del pico preovulatorio de LH fue aproximadamente de 8 h (Caraty *et al.*, 2007), valor similar a los de nuestro estudio, 8.0 h en el tratamiento 1, y 7.2 h en el tratamiento 2. Esto permite sugerir que los mecanismos neuroendocrinos que regulan la ovulación en las ovejas de pelo son similares a los de las ovejas europeas de lana. En este evento participa el núcleo ventromedial hipotalámico como el sitio de acción del estradiol en la inducción del pico preovulatorio de LH en conjunto con la kisspeptina que actúa como mediadora (Caraty *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2011).

La concentración de P4 al inicio del experimento (día 0) fue similar ($p>0.05$) entre tratamientos (Figura 1), con valores mayores a 1 ng mL^{-1} , lo cual indicó que las ovejas estaban en fase lútea (60 % en el tratamiento 1, y 90 % en el tratamiento 2). Veinticuatro horas después de aplicar la $\text{PGF}_{2\alpha}$, la concentración de P4 disminuyó ($p\leq 0.05$) a menos de 1 ng mL^{-1} , en ambos tratamientos ($p>0.05$), evento asociado con la lisis del cuerpo lúteo. Además, en el tratamiento 1, día 1 al 3, la concentración reducida de P4 mostró que las ovejas estaban en fase folicular y el incremento en la concentración de P4, en los días 4 al 8, se asoció con valores característicos de la fase lútea (Figura 1). En el tratamiento 2, se consideró la fase folicular en los días 1 a 5 y fase lútea del 6 al 8 (Figura 1). Además, en el tratamiento 1 la segunda dosis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ se aplicó el día 5 de la fase lútea, y en el tratamiento 2 la tercera dosis del fármaco se aplicó el día 3 de la fase lútea (Figura 1). En ambos casos, se indujo lisis del cuerpo lúteo, la cual se confirmó por la reducción ($p\leq 0.05$) en la concentración de P4

study, the estrus in both treatments lasted 34 h, time reported (24 to 56 h) for sheep (Hanrahan and Quirke, 1975; Quirke *et al.*, 1979).

Results from the final interval of the treatment, preovulatory LH peak, estrus, preovulatory LH peak, and length of the preovulatory LH peak were similar ($p>0.05$) between groups (Table 1). The preovulatory LH peak happened between 10 and 11 h after the estrus began, an interval longer than the one recorded for Romanov sheep, where the LH peak occurred 8 h after the estrus (Ben-Saïd *et al.*, 2007). In Ile de France x Romanov sheep, the length of the preovulatory LH peak was approximately 8 h (Caraty *et al.*, 2007), a value similar to those from our study, 8.0 h in treatment 1, and 7.2 h in treatment 2. This allows suggesting that the neuroendocrine mechanisms that regulate ovulation in hair sheep are similar to those of the wool European sheep. In this event, the ventromedial hypothalamic nucleus participates as the action site for estradiol in the preovulatory LH

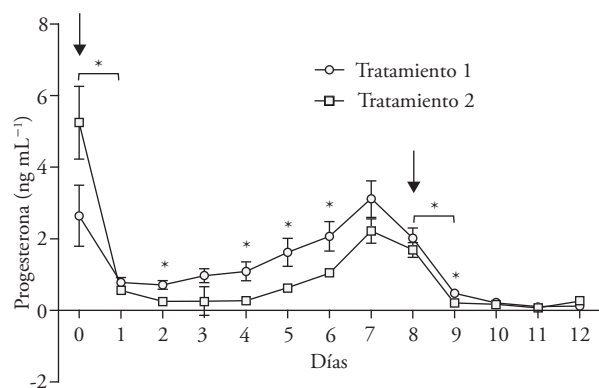


Figura 1. Concentración de progesterona en ovejas de pelo sincronizadas con dos protocolos cortos a base de prostaglandinas. (*) Diferencia estadística ($p\leq 0.05$). Las flechas indican los días de aplicación del fármaco. Tratamiento 1: Dos inyecciones IM de $500 \mu\text{g}$ de cloprostenol (análogo de $\text{PGF}_{2\alpha}$) con intervalo de 8 d. Tratamiento 2: Cuatro inyecciones IM de $500 \mu\text{g}$ de cloprostenol, dos aplicadas el día 0, cada 8 h y dos el día 8 con intervalo de 8 h.

Figure 1. Progesterone concentration in hair sheep synchronized with two short protocols based on prostaglandins. (*) Statistical difference ($p\leq 0.05$). The arrows indicate the days when the drug was applied. Treatment 1: Two IM injections of $500 \mu\text{g}$ of cloprostenol ($\text{PGF}_{2\alpha}$ analogue) with 8 d interval. Treatment 2: Four IM injections of $500 \mu\text{g}$ of cloprostenol, two applied on day 0 every 8 h, and two on day 8 with 8 h interval.

(menos de 1 ng mL^{-1}) registrada el día 9. Deaver *et al.* (1986) observaron disminución en la concentración de progesterona plasmática (0.7 ng mL^{-1}) en ovejas, 30 h después de la aplicación de dos inyecciones de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (5 mg; Lutalyse®) distribuidas en dos dosis cada 3 h; esta respuesta fue similar a la observada en nuestro estudio.

En nuestro experimento, una proporción alta de hembras se encontraba entre los días 4 y 6 del ciclo estral al momento de la segunda y tercera aplicación del fármaco, etapa en la cual, el cuerpo lúteo es sensible a la $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Silva *et al.*, 1991; Tsai and Wiltbank, 1998; Contreras-Solis *et al.*, 2009), lo cual explica la proporción alta de ovejas con respuesta a los tratamientos. La $\text{PGF}_{2\alpha}$ aumenta el ARNm codificador de enzimas que estimulan la producción de prostaglandinas en el CL ovino (Tsai y Wiltbank, 1998). La prostaglandina también causa cambios morfológicos y fisiológicos agudos en las células lúteas: la reducción en la fluidez de la membrana, el agotamiento de antioxidantes en el cuerpo lúteo, el incremento en la actividad de las fosfolipasas y en las enzimas proteolíticas. La combinación de estos mecanismos conduce a la interrupción en la producción de P4 e induce la involución del tejido lúteo. La prostaglandina ejerce su efecto biológico al unirse a sus receptores de membrana (receptor FP) asociados a la proteína G con siete dominios transmembranales (Tsai y Wiltbank, 1998). Por lo tanto, se infiere que los mecanismos descritos ya ocurrieron en las ovejas de nuestro estudio, porque la aplicación exógena de un análogo de $\text{PGF}_{2\alpha}$ indujo luteólisis y sincronizó el estro en 95 % de las hembras, aún al estar en la fase lútea temprana.

Con tratamientos cortos de sincronización con prostaglandinas pueden ocurrir fallas en la luteólisis, ya que la prostaglandina lútea no se produce en el CL inmaduro, lo cual aumenta su resistencia a la prostaglandina de origen uterino (Tsai y Wiltbank, 1998).

CONCLUSIONES

La aplicación de dos o cuatro inyecciones de $\text{PGF}_{2\alpha}$ con intervalo de 8 d en ovejas de pelo provoca regresión del cuerpo lúteo, induce el estro y el pico preovulatorio de LH de manera similar.

AGRADECIMIENTOS

A PROMEP – SEP Mexico, por el soporte financiero otorgado al presente estudio. A la MC Clara Murcia, Laboratorio de

peak in conjunction with kisspeptin which acts as mediator (Caraty *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2011).

The P4 concentration at the beginning of the experiment (day 0) was similar ($p>0.05$) between treatments (Figure 1), with values higher than 1 ng mL^{-1} , which indicated that the sheep were in luteal phase (60 % in treatment 1, and 90 % in treatment 2). Twenty-four hours after the $\text{PGF}_{2\alpha}$ was applied, the P4 concentration decreased ($p\geq 0.05$) to less than 1 ng L^{-1} in both treatments ($p>0.5$), an event associated with lysis of corpus luteum. Besides, in treatment 1, days 1 to 3, the reduced concentration of P4 showed that the sheep were in follicular phase and the increase in the P4 concentration, in days 4 to 8, was associated with values characteristic of the luteal phase (Figure 1). In treatment 2, the follicular phase was considered on days 1 to 5 and the luteal phase on days 6 to 8 (Figure 1). Also, in treatment 1 the second dose of $\text{PGF}_{2\alpha}$ was applied on day 5 of the luteal phase and in treatment 2, the third dose of the drug was applied on day 3 of the luteal phase (Figure 1). In both cases, lysis of the luteal body was induced, which was confirmed by the reduction ($p\leq 0.05$) in the P4 concentration (less than 1 ng mL^{-1}) recorded on day 9. Deaver *et al.* (1986) observed a decrease in the concentration of plasmatic progesterone (0.7 ng mL^{-1}) in sheep, 30 h after application of two injections of $\text{PGF}_{2\alpha}$ (5 mg; Lutalyse®) distributed in two doses every 3 h; this response was similar to the one observed in our study.

In our experiment, a high proportion of females were on days 4 to 6 of the estrus cycle at the time of the second and third application of the drug, stage when the luteal body is sensitive to $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Silva *et al.*, 1991; Tsai and Wiltbank, 1998; Contreras-Solis *et al.*, 2009), which explains the high proportion of sheep with response to treatments. The $\text{PGF}_{2\alpha}$ increases the RNAm that codifies enzymes which stimulate the production of prostaglandins in sheep CL (Tsai and Wiltbank, 1998). Prostaglandin also causes sharp morphologic and physiologic changes in luteal cells: the reduction of membrane fluidity, the depletion of antioxidants in the luteal body, the increase in the activity of phospholipasas and proteolytic enzymes. The combination of these mechanisms leads to the interruption of P4 production and induces the involution of the luteal tissue. Prostaglandin exerts its biological impact when it joins its membrane receptors (FP receptor) associated to protein G

Endocrinología, FMVZ, UNAM, Mexico, por su valiosa colaboración en los análisis hormonales.

LITERATURA CITADA

- Arrieta, E., A. Porras, E. González-Padilla, C. Murcia, S. Rojas, and G. Perera-Marín. 2006. Ovine serum and pituitary isoforms of luteinizing hormone during the luteal phase. *Reprod. Fertil. Develop.* 18: 485-495.
- Arroyo-Ledezma, J., J. De la Torre-Barrera, y N. Y. Ávila-Serrano. 2013. Respuesta reproductiva de ovejas de pelo sincronizadas en progesterona o prostaglandinas. *Agrociencia* 47: 661-670.
- Arroyo, L. J., J. Gallegos-Sánchez, A. Villa-Godoy, J. M. Berruete, J. Perera, and J. Valencia. 2007. Reproductive activity of Pelibuey and Suffolk ewes at 19° north latitude. *Anim. Reprod. Sci.* 102: 24-30.
- Ben-Saïd, S., D. Lomet, D. Chesneau, L. Lardic, S. Canepa, D. Guillaume, C. Briant, C. Fabre-Nys, and A. Caraty. 2007. Differential estradiol requirement for the induction of estrus behavior and the luteinizing hormone surge in two breeds of sheep. *Biol. Reprod.* 76: 673-680.
- Caraty, A., C. Fabre-Nys, B. Delaleu, A. Locatelli, G. Bruneau, F. J. Karsch, and A. Herbison. 1998. Evidence that the mediobasal hypothalamus is the primary site of action of estradiol in inducing the preovulatory gonadotropin releasing hormone surge in the ewe. *Endocrinology* 139: 1752-1760.
- Caraty, A., B. Dalaleu, D. Chesneau, and C. Fabre-Nys. 2002. Sequential role of E2 and GnRH for the expression of estrous behavior in ewes. *Endocrinology* 143: 139-145.
- Caraty, A., J. T. Smith, D. Lomet, S. Ben-Saïd, A. Morrissey, J. Cognie, B. Doughton, G. Baril, C. Briant, and I. J. Clarke. 2007. Kisspeptin synchronizes preovulatory surges in cyclical ewes and causes ovulation in seasonally acyclic ewes. *Endocrinology* 148: 5258-5267.
- Contreras-Solis, I., B. Vasquez, T. Diaz, C. Letelier, A. López-Sebastian, and A. González-Bulnes. 2009. Efficiency of estrous synchronization in tropical sheep by combining short-interval cloprostenol-based protocols and "male effect". *Theriogenology* 71: 1018-1025.
- Evans, N. P., G. E. Dahl, V. Padmanabhan, L. A. Thrun, and F. J. Karsch. 1997. Estradiol requirements for induction and maintenance of the gonadotropin-releasing hormone surge: implications for neuroendocrine processing of the estradiol signal. *Endocrinology* 138: 5408-5414.
- Fierro, S., J. Gil, C. Viñoles, and J. Olivera-Mazunte. 2013. The use of prostaglandins in controlling estrous cycle of the ewe: A review. *Theriogenology* 79: 399-408.
- Goodman, R. L. 1994. Neuroendocrine control of the ovine estrous cycle. In: Knobil, E. N. J. (ed). *The Physiology of Reproduction*, vol. 2. New York: Raven Press. pp: 659-709.
- Hanrahan, J. P., and J. F. Quirke. 1975. Repeatability of the duration of oestrus and breed differences in the relationship between duration of oestrus and ovulation rate of sheep. *J. Reprod. Fertil.* 45: 29-36.
- Hernández-Cerón, J., J. Valencia-Méndez, y L. Zarco-Quintero. 2001. Regresión del cuerpo lúteo y presentación del estro en ovejas con dos inyecciones de prostaglandina con 8 días de intervalo. *Téc. Pec. Méx.* 39: 53-57.
- McCracken, J. A., E. E. Custer, and J. C. Lamsa. 1999. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol. Rev.* 79: 263-323.

with seven trans-membrane dominions (Tsai and Wiltbank, 1998). Therefore, it is inferred that the mechanisms already described happened in sheep of our study, because the exogenous application of a PGF_{2α} analogue induced luteolysis and synchronized the estrus in 95 % of the females, even when they were in the early luteal phase.

With short synchronization treatments with prostaglandins, failure can occur during luteolysis, since luteal prostaglandin is not produced in the immature CL, increasing its resistance to prostaglandin of uterine origin (Tsai and Wiltbank, 1998).

CONCLUSIONS

The application of two or four injections of PGF_{2α} with an interval of 8 d in hair sheep causes regression of the luteal body, induces estrus and the preovulatory LH peak in a similar manner.

—End of the English version—

-----*

- Moenter, S. M., A. Caraty, and F. J. Karsch. 1990. The estradiol-induced surge of gonadotropin-releasing hormone in the ewe. *Endocrinology* 127: 1375-1384.
- 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. Reprod. Sci.* 86: 53-69.
- Pulido, A., L. Zarco, C. S. Galina, C. Murcia, G. Flores, and E. Posadas. 1991. Progesterone metabolism during storage of blood samples from Gyr cattle: effects of anticoagulant, time and temperature of incubation. *Theriogenology* 35: 965-975.
- Quirke, J. F., J. P. Hanrahan, and J. P. Gosling. 1979. Plasma progesterone levels throughout the oestrus cycle and release of LH at oestrus in sheep with different ovulation rates. *J. Reprod. Fertil.* 55: 37-44.
- Rubianes, E., A. Menchaca, and B. Carvajal. 2003. Response of the 1- to 5-day aged ovine corpus luteum to prostaglandin F_{2α}. *Anim. Reprod. Sci.* 78: 47-55.
- Schramm, W., L. Bovaird, M. E. Glew, G. Schramm, and J. A. McCracken. 1983. Corpus luteum regression induced by ultra-low pulses of prostaglandin F_{2α}. *Prostaglandins* 26: 347-364.
- Silva, W. J., G. S. Lewis, J. A. McCracken, W. W. Thatcher, and L. Wilson. 1991. Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin F_{2α} during luteolysis in ruminants. *Biol. Reprod.* 45: 655-663.

- Smith, J. T., Q. Li, A. Pereira, and I. J. Clarke. 2009. Kisspeptin neurons in the ovine arcuate nucleus and preoptic area are involved in the preovulatory luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 150: 5530-5538.
- Smith, J. T., Q. Li, K. S. Yap, M. Shahab, A. K. Roseweir, R. P. Millar, and L. J. Clarke. 2011. Kisspeptin is essential for the full preovulatory LH surge and stimulates GnRH release from the isolated ovine median eminence. *Endocrinology* 152: 1001-1012.
- Tsai, S. J., and C. Wiltbank. 1998. Prostaglandin F2a regulates distinct physiological changes in early and mid-cycle bovine corpora lutea. *Biol. Reprod.* 58: 346-352.
- Wildeus, S. 2000. Current concepts in synchronization of estrus: sheep and goats. *J. Anim. Sci.* 77: 1-14.