

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Fisiología

(Fisiología Animal)



TESIS DOCTORAL

Sincronización de la ovulación y el ciclo inducido por el efecto "macho" mediante la administración de progesterona por vía intravaginal en cabras en período de anestro estacional

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Mogedas Moreno

Directores

Antonio López Sebastián

Carlos García Artiga

Madrid, 2016



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA



**SINCRONIZACIÓN DE LA OVULACIÓN Y EL CICLO
INDUCIDO POR EL “EFECTO MACHO” MEDIANTE LA
ADMINISTRACIÓN DE PROGESTERONA POR VÍA
INTRAVAGINAL EN CABRAS EN PERIODO DE ANESTRO
ESTACIONAL**

María Mogedas Moreno

2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA



**SINCRONIZACIÓN DE LA OVULACIÓN Y EL CICLO
INDUCIDO POR EL “EFECTO MACHO” MEDIANTE LA
ADMINISTRACIÓN DE PROGESTERONA POR VÍA
INTRAVAGINAL EN CABRAS EN PERIODO DE
ANESTRO ESTACIONAL**

María Mogedas Moreno

Madrid, 2015

D. Antonio López Sebastián, Investigador Titular del Departamento de Reproducción Animal del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, y D. Carlos García Artiga, Profesor Titular de Biología, adscrito al Departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICAN

Que la memoria presentada por la Licenciada en Veterinaria Dña. María Mogedas Moreno, con el título “Sincronización de la ovulación y el ciclo inducido por el “efecto macho” mediante la administración de progesterona por vía intravaginal en cabras en periodo de anestro estacional”, ha sido realizada bajo nuestra dirección y reúne los requisitos necesarios para optar al grado de Doctora en Veterinaria.

Madrid, 2015

Fdo. Antonio López Sebastián

Fdo. Carlos García Artiga

Memoria presentada por María Mogedas Moreno
para optar al grado de Doctora en Veterinaria

Fdo. María Mogedas Moreno

Madrid, 2015

A mis padres.

ÍNDICE

1.- RESUMEN	1
2.- SUMMARY	5
3.- GLOSARIO DE TÉRMINOS Y ABREVIATURAS	9
4.- INTRODUCCIÓN	13
5.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	19
5.1.- Introducción y contexto de la producción caprina.....	21
5.2.- Ciclo reproductivo de la cabra.....	27
5.2.1.- Control hipotalámico	33
5.2.2.- Control hipofisario	34
5.3.- Limitaciones de la eficacia reproductiva	35
5.3.1.- Anestro estacional.....	35
5.3.2.- Anestro post-parto.....	40
5.4.- Control hormonal de la actividad reproductiva. Inducción y sincronización del ciclo reproductivo en caprinos	42
5.4.1.- Progesterona y análogos (progestágenos).....	43
5.4.2.- Gonadotropinas	46
5.4.3.- Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH).....	48
5.4.4.- Prostaglandina F _{2α} (PGF _{2α}) y análogos.....	48
5.4.5.- Melatonina	51
5.5.- Uso del efecto macho para inducción de la ovulación	55
5.5.1.- Respuesta endocrina.....	55
5.5.2.- Respuesta ovárica.....	58
5.5.3.- Fundamentos de la respuesta	62
5.5.4.- Factores que afectan a la respuesta	64
5.5.5.- Sincronización de la ovulación inducida con el efecto macho	68
5.5.5.1.- Uso y efecto de la progesterona y progestágenos	68
5.5.5.2.- Uso y efecto de las prostaglandinas	71
6.- OBJETIVOS	73
7.- MATERIAL Y MÉTODOS	77
7.1.- Experimento 1	79
7.1.1.- Animales	79
7.1.2.- Diseño experimental	79

7.2.- Experimento 2	81
7.2.1.- Animales	81
7.2.2.- Diseño experimental	81
7.3.- Experimento 3	82
7.3.1.- Animales	82
7.3.2.- Diseño experimental	82
7.4.- Experimento 4	84
7.4.1.- Experimento 4.1	84
7.4.1.1.- Animales	84
7.4.1.2.- Diseño experimental.....	84
7.4.2.- Experimento 4.2.....	85
7.4.2.1.- Animales	85
7.4.2.2.- Diseño experimental.....	85
7.5.- Técnicas	86
7.5.1.- Detección de celo	86
7.5.2.- Preparación de la cápsula intravaginal.....	86
7.5.3.- Ovariectomía.....	87
7.5.4.- Muestras de sangre (plasma sanguíneo)	87
7.5.5.- Analítica para LH.....	87
7.5.6.- Analítica para progesterona	88
7.5.7.- Ecografía	89
7.5.8.- Farmacocinética progesterona	89
7.5.9.- Análisis estadístico.....	90
8.- RESULTADOS	93
8.1.- Experimento 1	95
8.2.- Experimento 2	101
8.3.- Experimento 3	106
8.4.- Experimento 4	110
8.4.1.- Experimento 4.1	110
8.4.2.- Experimento 4.2.....	111
9.- DISCUSIÓN	113
10.- CONCLUSIONES	133
11.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	137

RESUMEN

Algunos de los métodos alternativos a los tratamientos hormonales clásicos utilizando progestágenos y eCG, para la inducción y sincronización del celo y la ovulación, unido a la inseminación artificial (IA) a tiempo fijo en ganado caprino, están basados como el IMA.PRO2[®] en el estímulo por la presencia de los machos (efecto macho) y la sincronización de la ovulación inducida mediante prostaglandina F_{2α} o sus análogos.

En estos métodos, la administración de una dosis baja de progesterona o progestágenos durante un breve periodo de tiempo en el momento de la introducción de los machos, es un método efectivo para evitar la presencia de cuerpos lúteos de mala calidad que generan ciclos cortos, consiguiendo un primer ciclo inducido de adecuada función luteal.

En el método IMA-PRO2[®] en el momento de la introducción de los machos se administran 25 mg de progesterona por vía intramuscular en vehículo oleoso, con buenos resultados de fertilidad después de la administración de cloprostenol y la IA sistemática, sin embargo las directivas europeas han marcado nuevas restricciones a la administración de esteroides en animales de producción, que en el caso de la progesterona o progestágenos sólo son permitidas por vía intravaginal.

Se diseñaron cuatro experimentos con el fin de desarrollar una administración de progesterona por vía intravaginal, utilizable en la práctica a nivel de campo y con una eficacia similar en términos de fertilidad, en el conjunto del método IMA-PRO2[®].

En el primer experimento, el objetivo era determinar el tiempo mínimo necesario del tratamiento progestativo en el momento de la introducción de los machos, que permitiera conseguir cuerpos lúteos de calidad después de la ovulación inducida. Para ello se aplicaron esponjas intravaginales de 20 mg de FGA durante 24, 48 y 72 horas, y los resultados demostraban que no habían diferencias significativas en el intervalo hasta la descarga preovulatoria de LH después de la retirada de las esponjas ($34 \pm 2,7$, $35 \pm 2,2$ y $30 \pm 1,4$ horas respectivamente para los tres grupos) ($p > 0,05$), así como en la formación del cuerpo lúteo inducido sin presencia de ciclos cortos en ninguno de los tres grupos. Sin embargo, 24 de horas de duración del tratamiento progestativo, generaba un cuerpo lúteo de menor secreción de progesterona, reflejándose en el retraso de 1 día aproximadamente el periodo en que las concentraciones plasmáticas alcanzan

los 0,5 ng/ml en este grupo y en las diferencias significativas ($p < 0,05$) del nivel de progesterona a partir del día 4 de la introducción de los machos.

Con el experimento 2 se diseñó una cápsula intravaginal de gelatina que contenía 120 mg de progesterona en un vehículo con aceite de palma, lecitina de soja y ciclodextrina. Las concentraciones plasmáticas de progesterona, así como su cinética y permanencia de niveles plasmáticos, valorados en cabras ovariectomizadas durante 42 horas después de la inserción, demostraron que con esta cápsula se conseguían resultados muy similares a la inyección intramuscular de 25 mg de progesterona, aunque las concentraciones mínimas consideradas eficaces de 0,5 ng/ml de progesterona en plasma, se alcanzaban alrededor de 8 horas antes que con la inyección intramuscular (28h vs 36h).

Con el tercer experimento se demostró la efectividad de la cápsula intravaginal diseñada, en términos de descarga preovulatoria de LH, sincronización de la ovulación y calidad del cuerpo lúteo inducido después de la introducción de los machos, con resultados similares a los de la inyección intramuscular de 25 mg de progesterona y a los de un tratamiento control con esponjas intravaginales de FGA durante 30 horas. Tal como era previsible según los resultados del experimento 2, con la cápsula intravaginal la descarga preovulatoria de LH aparece alrededor de 12 horas antes que con la esponja durante 30 horas o con la inyección intramuscular ($53,3 \pm 2,45h$ vs $65,3 \pm 1,68h$ y $67,3 \pm 4,67 h$ para el grupo cápsula, esponja e inyección respectivamente).

Finalmente con el experimento 4 se llevó a nivel de campo la utilización del nuevo método, comparando en dos explotaciones la aplicación del método IMA-PRO2[®] con inyección intramuscular o con cápsula intravaginal, los resultados de fertilidad en 228 cabras inseminadas no mostraron diferencias significativas con ambos métodos (57,25% vs 48,8% para intramuscular y cápsula respectivamente). Tampoco se encontraron diferencias de fertilidad cuando se compara el nuevo método con efecto macho y cápsulas intravaginales, respecto del tratamiento hormonal con progestágenos y eCG, en este último experimento los resultados en 144 cabras inseminadas a tiempo fijo, fueron de 54,1% para el nuevo método con cápsula y 64,2% para el protocolo clásico.

SUMMARY

Classical hormonal treatments for the induction and synchronization of oestrus and ovulation joined the fixed-time artificial insemination in goats use progestogens and eCG. Some alternatives methods are based on the stimulus by the presence of males (buck/male effect) and the use of prostaglandin F2 α or its analogues like the IMA.PRO2[®] method.

In these methods, the administration of a low dose of progesterone or progestin, at the time of the introduction of males, is an effective way to avoid the presence of poor quality corpora lutea that generates short cycles, reaching a first induced cycle with an appropriate luteal function.

With IMA- PRO2[®], females are subjected to the male effect plus a single intramuscular dose of 25 mg of progesterone in olive oil at the time of male introduction, achieving good pregnancy rates after a single dose of cloprostenol and systematic timed AI. However European directives have set new restrictions, the use of steroids in food-producing animals is banned and progesterone or progestogens are limited only in an intravaginal use.

Four experiments were designed in order to develop an intravaginal way of progesterone administration that could be used under field conditions with similar fertility rates to the IMA- PRO2[®] method.

Experiment 1 was conducted to determine the minimum duration of progestogen treatment at the time of male introduction, which reached good quality corpus luteum after induced ovulation. Does were treated with intravaginal sponges containing 20 mg of FGA for 24, 48 and 72 hours. There were no significant differences between groups after devices removal in intervals to preovulatory LH peak ($34 \pm 2,7$, $35 \pm 2,2$ and $30 \pm 1,4$ hours for the three groups respectively) ($P > 0,05$) and in the induced corpus luteum formation, without short cycles in any group. Nevertheless, the progestational treatment of 24 hours generated a corpus luteum with lower progesterone secretion. Plasma P4 concentration reached 0,5 ng/ml one day later than in the other groups and there were significant differences ($P < 0,05$) from the 4th day after males introduction.

In experiment 2, an intravaginal gelatin capsule was designed containing 120 mg of progesterone in palm oil with soy lecithin and cyclodextrin. Plasma progesterone concentration was measured as well as a pharmacokinetic study was evaluated in 14 ovariectomized goats for 42 hours after capsule insertion. Our data showed similar results for “capsule group” and 25 mg i.m. “injection group”. However, effective plasma progesterone concentration (0,5 ng / ml) was reached about 8 hours before with the gelatine capsule than with an intramuscular injection (28h vs 36h).

In experiment 3, our group assessed the effectiveness of the intravaginal capsule method at inducing and synchronizing ovulation. Preovulatory LH surge intervals and quality of the induced corpus luteum after males introduction were similar to those obtained with an i.m. injection of 25 mg of progesterone and a control group based on 30 hours progestogen treatment with intravaginal sponges. According to the results of the experiment 2, preovulatory LH surge in “capsule group” was observed about 12 hours before the other two groups ($53,3 \pm 2,45h$ vs $65,3 \pm 1,68h$ and $67,3 \pm 4,67 h$ capsule group, sponge group and i.m. injection group respectively).

Finally, in experiment 4, we put into practice under field conditions the new method, comparing IMA- PRO2[®] protocol in two farms, using an intramuscular injection or intravaginal capsule. 228 goats were inseminated and there were no differences between treatment groups in fertility rates (57,25 % vs 48,8 % for intramuscular and capsule respectively). In the same way, no significant differences were found when the new method based on male effect plus intravaginal capsule was compared with progestogen treatment with eCG. In this last experiment, 144 goats were artificially inseminated at a fixed time and pregnancy rates were 54,1 % and 64,2 % for the new method and conventional protocol, respectively.

**GLOSARIO DE TÉRMINOS Y
ABREVIATURAS**

<i>5-HT</i>	Serotonina (5-hidroxitriptamina)	<i>ELISA</i>	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)
<i>AAAD</i>	5-hidroxitripófano-descarboxilasa	<i>FAO</i>	Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
<i>AANAT</i>	Arilalkilamina N-acetil transferasa	<i>FAOSTAT</i>	Base de datos de la FAO
<i>Ach</i>	Acetilcolina	<i>FGA</i>	Acetato de fluorogestona
<i>ACRIMUR</i>	Asociación Española de Criadores de la cabra Murciano-Granadina	<i>FSH</i>	Hormona folículo estimulante
<i>AECCM</i>	Asociación Española de Criadores de la Cabra Malagueña	<i>g</i>	Gramos
<i>ANOVA</i>	Analysis of variance (análisis de varianza)	<i>GCS</i>	Ganglio cervical superior
<i>APP</i>	Anestro post parto	<i>GnRH</i>	Hormona liberadora de gonadotropinas
<i>ARN_m</i>	Ácido ribonucleico mensajero	<i>GP</i>	Glándula pineal
<i>AUC</i>	Area under curve (área bajo la curva)	<i>h</i>	Hora
<i>C_{max}</i>	Concentración máxima	<i>hCG</i>	Gonadotropina coriónica humana
<i>Ci</i>	Curio	<i>HIOMT</i>	Hidroxiindol-O-metil-transferasa
<i>CIDR</i>	Controlled Internal Drug Release	<i>IA</i>	Inseminación artificial
<i>Cl</i>	Aclaramiento	<i>IgG1</i>	Inmunoglobulina G1
<i>CL</i>	Cuerpo lúteo	<i>i.m.</i>	Intramuscular
<i>Cpm</i>	Cuentas por minuto	<i>IMIDA</i>	Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario
<i>°C</i>	Grado celsius	<i>INIA</i>	Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria
<i>d</i>	Día	<i>LH</i>	Hormona luteinizante
<i>D_{i.vg}</i>	Dosis intravaginal	<i>LHRH</i>	Hormona liberadora de LH
<i>DA</i>	Dopamina	<i>mmol</i>	Milimol
<i>E_{2β}</i>	Estradiol	<i>m²</i>	Metro cuadrado
<i>EC</i>	Comisión Europea	<i>M</i>	Molaridad
<i>eCG</i>	Gonadotropina coriónica equina	<i>MHz</i>	Megaherzios

Glosario de términos y abreviaturas

<i>MAGRAMA</i>	Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente	<i>pg</i>	Picogramo
		<i>PBS</i>	Phosphate Buffered Saline (tampón fosfato salino)
<i>MAP</i>	Medroxiprogesterona	<i>PGF_{2α}</i>	Prostaglandina F2alfa
<i>MEL</i>	Melatonina	<i>PMSG</i>	Pregnant Mare Serum Gonadotropin (gonadotropina sérica de yegua gestante)
<i>MRT</i>	Tiempo medio de residencia		
<i>mg</i>	Miligramo	<i>RIA</i>	Radioinmunoanálisis
<i>ml</i>	Mililitro	<i>rpm</i>	Revoluciones por minuto
<i>mm</i>	Milímetro	<i>SEM</i>	Error estándar de la media
<i>nm</i>	Nanómetro	<i>SD</i>	Desviación estándar
μ g	Microgramo	<i>SMB</i>	Sincromate-B
°N	Grado Norte	<i>t_{1/2λ}</i>	Semivida de eliminación
<i>NA</i>	Noradrenalina	<i>TH</i>	Triptófano-hidroxilasa
<i>NAS</i>	N-acetil serotonina	<i>TMB</i>	Tetrametilbencidina
<i>ng</i>	Nanogramo	<i>TPOH</i>	Triptófano-hidroxilasa
<i>NOR</i>	Norgestomet	<i>TRH</i>	Tracto retino-hipotalámico
<i>NPV</i>	Núcleo paraventricular	<i>UE</i>	Unión Europea
<i>NSC</i>	Núcleo supraquiasmático	<i>UI</i>	Unidades internacionales
<i>Ox</i>	Oxitocina	<i>VIP</i>	Péptido intestinal vasoactivo
<i>P</i>	Nivel de significación	<i>VP</i>	Vasopresina
<i>P4</i>	Progesterona	<i>Vz</i>	Volumen de distribución

INTRODUCCIÓN

La importancia de una actividad tan característica en los países mediterráneos como es la explotación del ganado caprino de leche, se justifica por ser una opción que permite el mantenimiento de la población en el medio rural y la producción de alimentos no excedentarios, de alta calidad, y un alto valor gastronómico de los productos elaborados como es el queso de cabra.

El sector caprino es uno de los sectores de la producción primaria que más han evolucionado en los últimos años, tanto en el ámbito de la producción como en el de la comercialización y de acercamiento del producto al consumidor. Esta industria se establece fundamentalmente y cada día más, sobre sistemas de producción intensiva o semi-intensiva, basados en un alto nivel genético, alimentación equilibrada, y rigurosos controles sanitarios y de calidad de los productos.

La organización del sector en torno a criterios de rentabilidad y calidad de los productos, ha supuesto el desarrollo de los programas de selección, que han permitido a su vez un rápido progreso genético, basándose esta mejora genética en los registros del control lechero (producción y composición del total de la leche ordeñada) y en la difusión rápida de este mérito genéticos conseguido a través del uso de la inseminación artificial.

A finales de la década de los 60 se estableció una metodología eficaz para el desarrollo de la inseminación artificial caprina, metodología que se ha mantenido hasta la actualidad. Esta tecnología consiste en la aplicación del semen refrigerado (5°C) o congelado (-196°C), en cabras que han sido previamente sometidas a un tratamiento hormonal de inducción y sincronización de la ovulación, permitiendo de esta manera una inseminación sistemática a tiempo fijo en todas las hembras tratadas.

El método de inducción y sincronización más habitual en la Europa mediterránea consiste en la aplicación de esponjas intravaginales impregnadas con progestágenos (FGA ó MAP) durante 11 días y la administración intramuscular de eCG (300-400UI) y un análogo de la Prostaglandina F_{2α} (Cloprostenol 75 µg) 48 horas antes de la retirada de las esponjas. Con este método la inseminación artificial se lleva a cabo a las 43-46 horas después de la retirada del tratamiento progestativo.

Estos protocolos de IA a tiempo fijo, cuando se realizan en condiciones adecuadas tanto técnicas como de manejo, alcanzan porcentajes de fertilidad cercanos

al 60%, pero han tenido una escasa implantación en el mundo y Francia siendo el país que más ha desarrollado la IA no alcanza a realizar inseminaciones anuales por encima del 15% de las hembras reproductoras.

En España, los porcentajes de hembras inseminadas se han mantenido constantes en los últimos años sin que alcancen al 2% de las hembras reproductoras. Se puede considerar que las mayores limitaciones relacionadas con el uso de esta metodología están relacionadas con factores como el coste de los tratamientos, la necesidad de asistencia técnica o personal capacitado, incremento de la mano de obra, etc.

En la última década, los cambios en la sociedad respecto al consumo de alimentos de origen animal, han generado el replanteamiento de esta industria hacia los sistemas de producción animal limpios, (control de sustancias administradas), verdes (control de impacto medioambiental) y éticos (control del bienestar animal).

En este sentido las directivas europeas son cada vez más restrictivas y en el caso de la administración de progestágenos, los contenidos liberados en la leche de las cabras mientras están sometidas a estos tratamientos, superan los MRL (límites máximos de residuos) marcados en estas directivas (96/22/CE).

Aparte de las limitaciones legales de la administración a animales de determinadas sustancias por sus MRL, en el caso de los tratamientos antes señalados se une la problemática del uso de la eCG (gonadotropina coriónica equina) ya que siendo una proteína de origen animal, puede generar problemas sanitarios en cuanto a transmisión de enfermedades emergentes. Desde un punto de vista de la eficacia del tratamiento, la mayor limitación se debe a la presencia de anticuerpos anti-eCG, una vez que se hacen tratamientos sucesivos, lo que implica un descenso de la fertilidad y la posibilidad real de utilizar sólo dos tratamientos por animal.

En este contexto se buscan alternativas con otro tipo de tratamientos libres de hormonas, con capacidad de inducir y sincronizar la ovulación que permitan la IA a tiempo fijo, pero que a su vez deben reunir características como seguridad, facilidad de aplicación y viabilidad económica.

La respuesta al efecto de la presencia de los machos (efecto macho) es un método natural (bioestimulación) capaz de inducir la ovulación en hembras en anestro,

y cuyos mecanismos en pequeños rumiantes han sido extensamente estudiados y detalladamente descritos desde los años 60.

A pesar de los avances en el uso del efecto macho como método limpio y efectivo en la inducción de la ovulación en hembras, dos son las mayores limitaciones a su uso. En primer lugar la falta de respuesta en las razas y latitudes más septentrionales, donde los animales, manifiestan periodos profundos de anestro estacional, en los que el estímulo de los machos no es suficiente para romper el estatus endocrino característico de este período, y en segundo lugar la falta de sincronización de las primeras ovulaciones inducidas que impide el uso inmediato de la IA.

En el primer caso, las soluciones han apuntado hacia la aplicación de tratamientos fotoperiódicos previos a la introducción de los machos, haciendo uso de la manipulación de la luz artificial para generar una cierta desestacionalización de machos y hembras.

En el caso de la sincronización de las ovulaciones inducidas, las aproximaciones más efectivas han sido las relacionadas con la administración de bajas dosis de progesterona (no genera residuos) y el uso de tratamientos luteolíticos ($\text{PGF}_{2\alpha}$ o sus análogos) que tampoco presentan limitaciones debido a su rápida eliminación.

En este contexto se desarrolló el método IMA-PRO2[®] (López Sebastián et al., 2007) para la inducción y sincronización de la ovulación en ganado caprino. Este protocolo combina el efecto macho con una inyección intramuscular de una reducida dosis de progesterona en el momento de la introducción (lo cual evita la presencia de un ciclo corto después de la primera ovulación inducida), y el tratamiento 9 días después, con cloprostenol para provocar la lisis temprana del cuerpo lúteo inducido y de esta manera sincronizar la siguiente ovulación que permite la inseminación artificial sistémica a tiempo fijo.

Con este método se obtienen buenos resultados de fertilidad comparables a los tratamientos convencionales, pero la directiva europea (2008/97/EC) que ha prohibido la administración de hormonas esteroides por vía intramuscular, permitiendo exclusivamente la vía intravaginal, ha supuesto que se planteen alternativas al protocolo anteriormente descrito.

El objetivo general de este trabajo es desarrollar una metodología alternativa, sustituyendo la administración de progesterona por vía intramuscular por la vía intravaginal, manteniendo las características de la aplicación práctica del protocolo, así como su eficacia en términos de fertilidad, con el uso de la IA a tiempo fijo.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

5.1.- INTRODUCCIÓN Y CONTEXTO DE LA PRODUCCIÓN CAPRINA

La cabra (*Capra hircus*) fue una de las primeras especies domesticadas por el hombre (Fig.1), y aunque se acepta la corriente de un origen polifilético, puede considerarse a la cabra salvaje (*Capra aegagrus*) como ancestro de la cabra doméstica (Takada et al., 1997). Sus orígenes se remontan hacia el 8.500 a.C., así lo evidencian los restos encontrados en las más antiguas civilizaciones del Creciente Fértil de Oriente Próximo (Zeder y Hesse, 2000). Los datos arqueológicos sugieren dos zonas geográficas distintas donde se inició la domesticación de la cabra: el valle del río Éufrates en el 9.000 a.C. y los Montes Zagros en Irán en el 8.000 a.C. (Zeder, 2006). En España los primeros indicios de cabras domesticadas se remontan al Neolítico Antiguo Cardial (Perez Ripoll, 1980), datado por carbono-14 en Andalucía entre el 4.300 y el 3.980 a.C.

El ganado caprino se ha explotado desde sus orígenes hasta nuestros días para la producción de leche, carne, piel, pelo y estiércol (Boyazoglu et al., 2005).

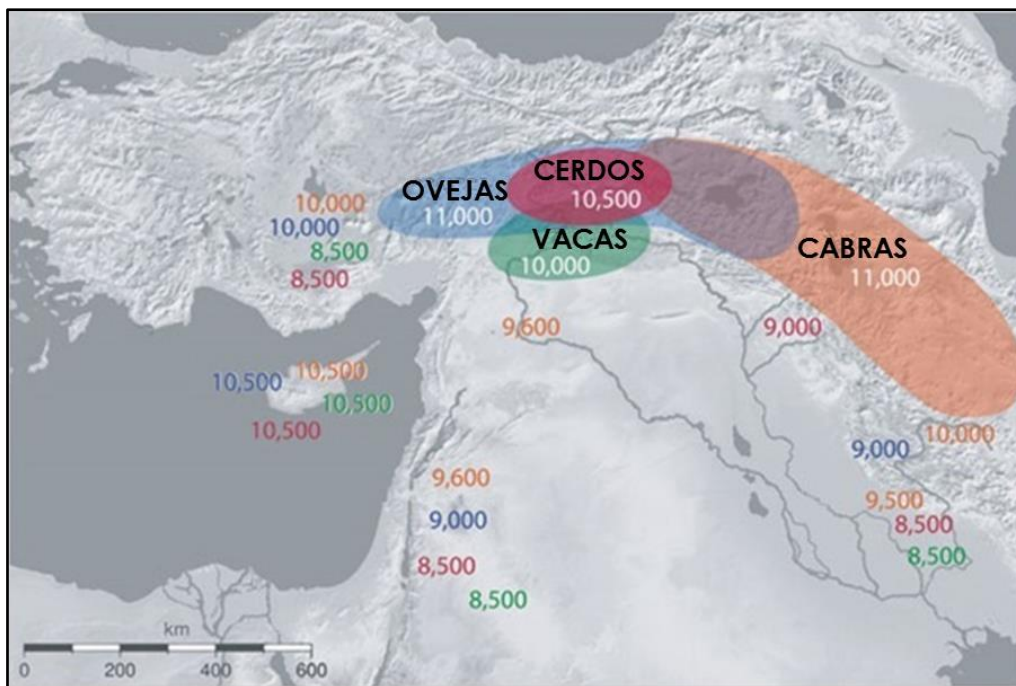


Fig.1. Origen y dispersión de las especies domésticas en el Creciente Fértil. Las zonas sombreadas muestran las regiones y las fechas aproximadas donde se piensa que se inició la domesticación. Las fechas fuera de las zonas sombreadas muestran la fecha aproximada donde la domesticación apareció en esa región. Naranja, cabras (*Capra hircus*); azul, oveja (*Ovis aries*); verde, vaca (*Bos taurus*); rosa, cerdos (*Sus scrofa*). Adaptado de Melinda A. Zeder, 2008

La explotación caprina ha permitido el desarrollo ganadero desde el inicio de las sociedades hasta nuestros días, en donde el manejo tradicional de rebaños de cabras asegura la presencia humana en las zonas rurales menos favorecidas frenando el riesgo de despoblación y contribuyendo a mantener en buenas condiciones agroambientales dehesas, montes, prados y rastrojeras (Castel et al., 2010).

El reducido formato corporal de este animal, su agilidad y habilidad para el pastoreo y su reconocida rusticidad determina que la especie caprina sea idónea para el aprovechamiento de áreas áridas y semiáridas caracterizadas por la baja pluviosidad, escasas disponibilidades forrajeras, topografía accidentada para la utilización de rastrojos y subproductos derivados de cultivos agrícolas, logrando productividades aceptables en medios ecológicos difíciles (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2015). Al mismo tiempo, este animal es capaz de adaptarse a la intensificación, debido a su alta capacidad de transformación de alimentos. Su gran potencial productivo y reproductivo ofrece enormes perspectivas de desarrollo, principalmente por su gran aptitud lechera y por las características organolépticas de su carne (Aréchiga et al., 2008).

El ganado caprino no tiene una gran importancia cuantitativa como proveedor de alimentos para el hombre (Tabla 1.) (Fig.2), pero es una especie que por sus particulares condiciones tiene una especial importancia en las áreas económicamente frágiles, siendo en estas regiones donde se concentra la gran mayoría de su censo (FAOSTAT, 2013).

Tabla 1. Contribución del ganado caprino a la producción mundial de leche y de carne (FAOSTAT, 2013)

Producto	Producción (tn)	% sobre el total
Total leche	746.707.663	100
Leche de cabra	17.957.371	2,4
Total carne	310.379.920	100
Carne de cabra	5.372.407	1,7

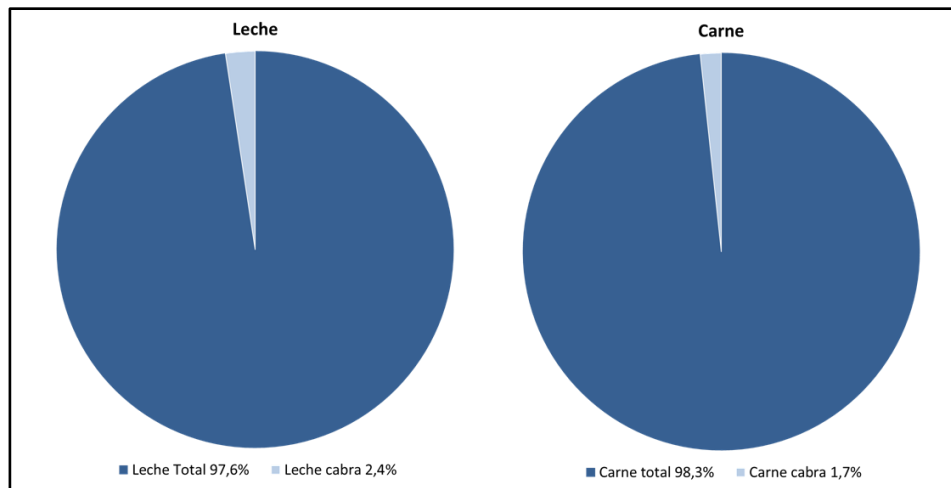


Fig.2. Contribución del ganado caprino a la producción mundial de leche y de carne (FAOSTAT, 2013)

Los países pobres y en vías de desarrollo, presentan un censo de más del 90% del total de las cabezas de caprino y este tipo de ganadería juega un papel socioeconómico muy destacado, sustentando a las poblaciones más pobres y marginales, ya que significa en muchos casos el único recurso para el consumo de proteínas de origen animal. En el otro extremo están los países desarrollados donde el ganado caprino es muy escaso, su población es aproximadamente el 7% de la cabaña mundial, pero presenta una interesante labor como productor de alimentos de muy alta calidad y precio, siendo una industria de gran importancia regional en algunos países europeos y más concretamente los del área Mediterránea (Sánchez-Rodríguez et al., 2007). (Fig.3).

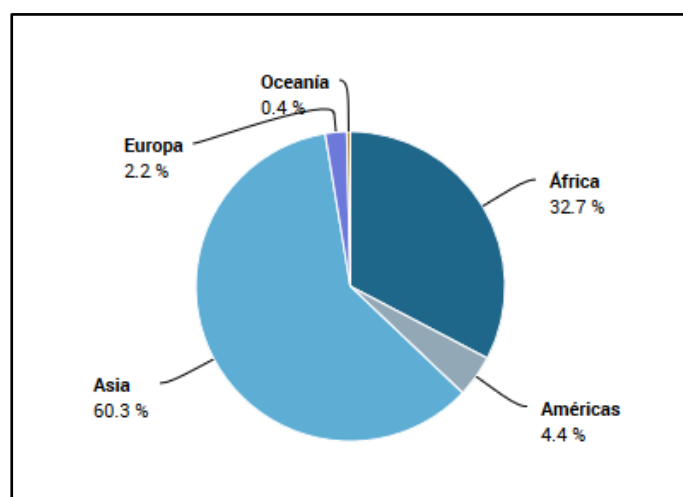


Fig.3. Promedio de cabezas de caprino por región (FAOSTAT, 2013)

El censo mundial de cabras ascendió en el 2013, según la FAOSTAT, a 975.803.262 cabezas; el principal productor de leche de cabra fue India, seguido de Bangladesh, Pakistán y Francia. Respecto a la producción de carne de cabra, el primer lugar lo ocupa China, seguido de India, Pakistán y Nigeria.

En la Unión Europea el caprino se concentra en la Cuenca Mediterránea. En 2013 el censo fue de 12.376.508 de cabezas, siendo los países con mayor número de animales Grecia, España, Francia, Rumania, Italia y Portugal. Entre los seis poseen casi el 90% del ganado caprino de la U.E. (FAOSTAT, 2013).

Dentro de estos países mediterráneos, Francia es el que más ha desarrollado su ganadería caprina merced a una tradicional y potente industria quesera, siendo muy competitivos en producción de quesos frescos y madurados. Su ganado caprino está muy seleccionado, y sus sistemas de explotación bastante intensificados y muy optimizados, ya que contando con poco más de un millón de cabras (1.291.028), son el mayor productor de leche en Europa, la cual es transformada en su totalidad en una variada gama de quesos puros de cabra, la gran mayoría bajo denominaciones de origen protegidas.

Grecia cuenta con el censo más alto de caprinos de toda la U. E. cerca de cinco millones de cabezas (4.250.000), pero sus sistemas de producción siguen siendo mayoritariamente tradicionales, produciendo menos cantidad de leche que Francia con cinco veces más de animales. Esta situación de escaso desarrollo del sector tiene como contrapartida el enorme valor que esos sistemas tradicionales siguen jugando en Grecia, tanto en el mantenimiento de las poblaciones en las áreas rurales más desfavorecidas, como en la conservación de sus razas autóctonas y su cultura tradicional (Sánchez-Rodríguez, 2007)

En una situación intermedia se encuentra España, con cerca de tres millones de cabras (2.704.229) y aproximadamente 500 millones de litros de leche anuales. Se conserva un excelente patrimonio genético, con razas autóctonas muy rústicas y otras bastante seleccionadas y productivas, conservando sistemas tradicionales de producción junto con otros más modernos y optimizados. Asimismo, los productos de las cabras están dejando de ser productos tradicionales locales y están desarrollando un mercado

de alimentos de calidad con alta demanda y precio, siendo una industria creciente dentro de la Unión Europea (Sánchez-Rodríguez, 2007).

En los países de cultura anglosajona (Centro y norte de Europa, Norteamérica y Australia), el ganado caprino es muy escaso, ya que no existe la tradición quesera mediterránea, pero se han desarrollado algunas ganaderías de alto nivel en base a las excelentes características nutricionales de la leche de cabra.

En enero de 2014 en España había un total de 2.704.229 de cabras, repartidas en 77.472 explotaciones. Los sistemas de producción caprina en España tienen como objetivo preferente la producción de leche, siendo, en general, la carne un producto secundario. Esta actividad es particularmente importante en regiones de Andalucía, Castilla la Mancha, Murcia, Extremadura y Canarias, donde se concentran el 75% de las cabras lecheras (Fig.4). En 2014, según datos del MAGRAMA (Panel de Consumo Alimentario y Encuesta de Sacrificio de Ganado), se consumieron un total de 5.136.040 kg de leche de cabra; y 1.213.751 de animales fueron sacrificados para la producción de carne. Así como el consumo de leche de cabra per cápita en España se ha mantenido estable desde el 2008, la producción de carne va descendiendo con algún pico de recuperación, pero en ningún momento vuelve a situar la producción en los niveles de antaño.

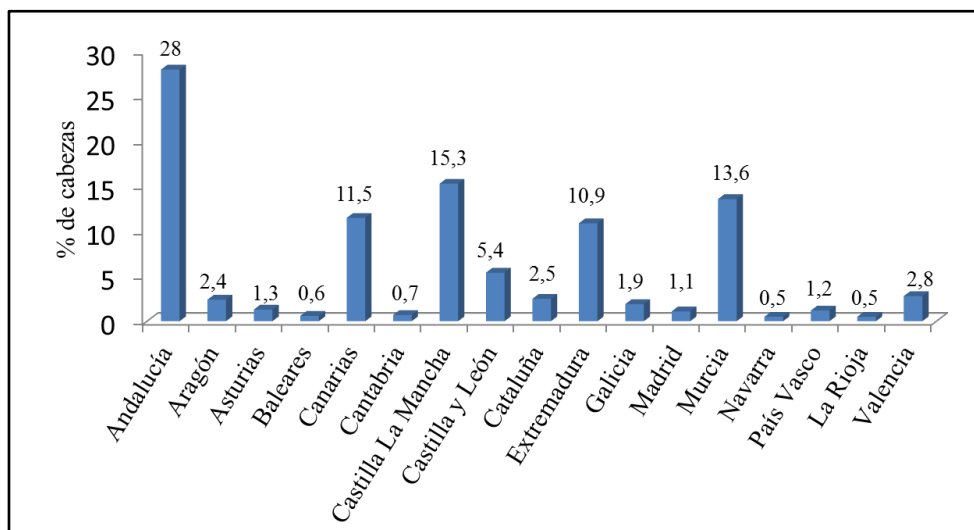


Fig.4. Distribución del censo caprino en España (MAGRAMA, 2014)

Los sistemas de producción caprina, están sufriendo cambios importantes, debido en parte a la adaptación que requieren hacia las nuevas prioridades en la calidad de los productos, así como rentabilidad por los cambios necesarios en la estructura y sistema de explotación, muy relacionados con las bruscas variaciones en precios de materias primas y productos, y con un control cada vez más exhaustivo del bienestar animal.

El proceso evolutivo que ha llevado a esta especie a adaptarse a los ambientes más desfavorables ha pasado por una estrategia reproductiva de mínimos, donde a una duración prolongada de la gestación, se une una escasa prolificidad (muy limitada genéticamente y muy condicionada por factores externos) y una marcada estacionalidad reproductiva regulada por el ritmo endógeno circanual sincronizado por el fotoperiodo (López-Sebastián et al., 2009). Esta estacionalidad reproductiva de la especie es el limitante principal de la productividad de las explotaciones, y se manifiesta tanto en las hembras como en los machos. En el ganado caprino, el inicio y la duración de la estación reproductiva pueden estar afectados por la interacción del fotoperiodo con otros factores tales como la raza, latitud, clima, lactación y estado nutricional, época de parto y sistema de explotación.

Recientemente, se ha demostrado en las razas caprinas españolas mediterráneas, cuál es el papel y la influencia del fotoperiodo sobre la estacionalidad reproductiva, demostrándose que éste es el principal factor que controla la actividad sexual a lo largo del año (Santiago-Moreno et al., 2003; Gómez-Brunet et al., 2010).

Estas variaciones estacionales en la eficacia reproductiva, se traducen en variaciones en la oferta de leche y carne a lo largo del año, viéndose afectados los rendimientos económicos de los productores y los precios al consumidor (Gómez-Brunet et al., 2012). Bajo estas condiciones se hace evidente la necesidad de aplicar sistemas de control del ciclo reproductivo, que permitan manipular los mecanismos endocrinos responsables de esta estacionalidad reproductiva, para poder asegurar el mantenimiento de la oferta de estos productos a lo largo de todo el año.

5.2.- CICLO REPRODUCTIVO DE LA CABRA

El ciclo estral comprende todos aquellos cambios morfológicos y fisiológicos que se producen en el ovario y en el tracto genital de la hembra no gestante y que desencadenan la expresión del celo, la ovulación, la posible fecundación y posterior implantación del embrión (Fatet et al., 2010). Estos cambios se suceden de forma regular durante los periodos de actividad sexual cíclica correspondientes a la estación reproductiva (Chemineau y Delgadillo, 1994).

En el curso de la estación reproductiva, la cabra presenta ciclos estrales con una duración variable, alrededor de 21 días, que se asocia generalmente con una ovulación que se produce de 30-36 horas después del inicio del estro (González-Stagnaro et al., 1993). Se entiende por ciclo sexual el intervalo de tiempo entre la sucesión de dos celos o dos ovulaciones. Una característica que se observa en esta especie es la aparición de ciclos cortos (de 3 a 9 días) (Chemineau et al., 1992a).

El ciclo estral se divide en dos fases: la fase folicular que se corresponde con las fases de proestro y estro, y la fase luteal que se corresponde con el metaestro y el diestro (Fig.5). El proceso ovulatorio sucede a los cambios morfológicos (crecimiento y reclutamiento folicular), bioquímicos (maduración folicular) y funcionales (regulación endocrina) que se desencadenan en el ovario (Evans, 2003).

El crecimiento folicular terminal durante el ciclo sigue un patrón de ondas foliculares (Ginther y Kot, 1994) (Fig.5). Cada una de estas ondas se caracteriza por la secuencia de tres eventos dependientes de las gonadotropinas que son: reclutamiento, selección y dominancia (Driancourt, 2001). Las posibilidades de observación continua del crecimiento individual de cada folículo mediante ultrasonografía, ha permitido la comprensión de este sistema de ondas, sugiriendo la existencia de entre dos a seis ondas de crecimiento folicular durante el ciclo estral (Evans, 2003; Simões et al., 2006). Ginther y Kot (1994) señalan la existencia de cuatro ondas foliculares para esta especie apoyándose en la coincidencia del número de ondas foliculares con el número de picos en las concentraciones de FSH, además de la existencia de intervalos entre ondas altamente correlacionados con los intervalos entre picos de FSH. La última onda del ciclo sería la que aportaría el folículo ovulatorio. En aquellas ocasiones en las que se

produce una doble ovulación, suelen ser folículos que proceden de una misma onda folicular, aunque a veces derivan de dos ondas foliculares consecutivas (Ginther y Kot, 1994). El número de ovulaciones durante el ciclo sexual, inmediatamente después de la luteolisis, está relacionada con el número de folículos que se desarrollan hasta alcanzar el estadio preovulatorio. A su vez, la dinámica de crecimiento de estos folículos está condicionada por un equilibrio entre mecanismos de estimulación y de inhibición del crecimiento folicular, que pueden actuar tanto a nivel sistémico como intraovárico. Los factores sistémicos son aquellos pertenecientes al eje hipotálamo-hipófisis-ovario; destacan las gonadotropinas hipofisarias (FSH y LH), con acción estimulante, y el estradiol y la inhibina, con acción inhibidora. Los factores intraováricos se originan y actúan a nivel del ovario; igualmente pueden ser estimulantes (activina y factores de crecimiento) o inhibidores (estradiol e inhibina) (González-Bulnes et al., 2002). La emergencia de una onda folicular es consecuencia de un incremento transitorio de la secreción de FSH, la cual está regulada por el estradiol y la inhibina (Campbell et al., 1995a). Esto, que es muy evidente para la primera y última ondas- cuando la pulsatilidad de la LH es muy alta-, se refleja en la secreción de estradiol; pero después, en plena fase luteal, cuando disminuye la secreción de LH como consecuencia de los elevados niveles de progesterona, parece que es la inhibina el mayor regulador de la FSH (López-Sebastián et al., 2002).

La fase folicular tiene una duración de unos 5-6 días, que se corresponden con los días 18-21 de un ciclo y 1-2 del siguiente (Fig.5). En el proestro se lleva a cabo el reclutamiento, la selección y la dominancia folicular, durante este periodo se va incrementando la secreción de estradiol producida por los folículos ováricos en desarrollo, lo que induce el inicio del celo o estro de la hembra. El inicio del estro se corresponde con el día 0 del ciclo y, durante el mismo, la concentración de estradiol en sangre, procedente de los folículos dominantes, es máxima, finalizando con la ovulación (Chemineau et al. 1991).

Durante esta fase la FSH hipofisaria es responsable junto con la LH de la selección y crecimiento folicular terminal. De la última onda de crecimiento folicular de la cohorte de folículos antrales reclutados y dependientes de gonadotropinas de 2-3mm de diámetro, serán seleccionados 1 ó 2 para entrar en su fase de crecimiento final. Bajo la influencia de la LH, alcanzarán el estadio de folículo pre-ovulatorio (6-9mm), el resto

de los folículos entrarán en atresia y degenerarán. Se producirá un incremento de las concentraciones plasmáticas de estradiol 17β , secretado por los folículos de mayor tamaño, que inducirá al comportamiento típico de celo, a la vez que actúa como un mecanismo de retroalimentación positiva en el eje hipotálamo-gonadotrópico (Chemineau et al. 1982). El inicio de esta fase, antes de que aparezcan los síntomas de celo, se denomina proestro. La fase de celo comprendería desde que aparece el comportamiento de celo hasta la ovulación (Fig.5).

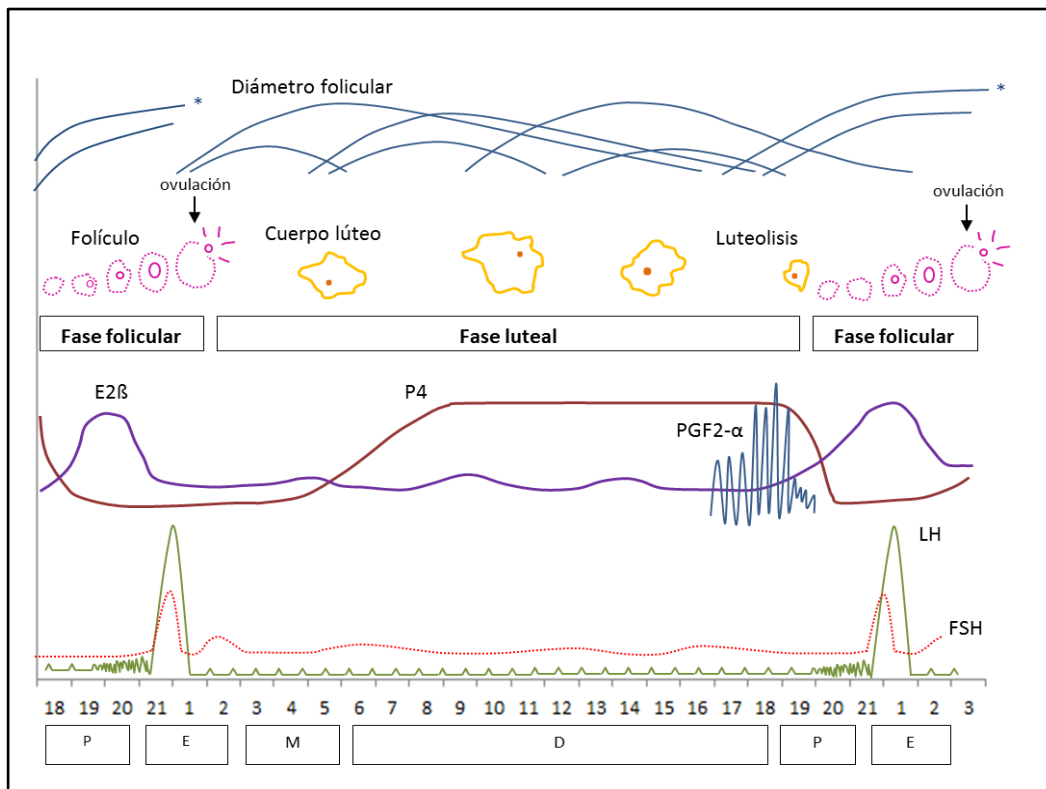


Fig.5. Representación esquemática de los diferentes sucesos durante el ciclo estral en la cabra: patrón de desarrollo folicular, ciclo ovárico y regulación endocrina. *Folículo ovulatorio. P: proestro; E: celo; M: metaestro; D: diestro. Adaptado de A. Fatet et al.(2011)

El celo se manifiesta en la cabra por un incremento en su actividad física, así como pequeñas descargas de mucus por la vagina, agitaciones constantes de la cola, aumento en la frecuencia de micción y enrojecimiento de la vulva (BonDurant, 1981). El comportamiento de celo se divide en dos fases: atracción del sexo opuesto o proceptividad y receptividad (Beach F.A., 1976). La primera consiste en la búsqueda y estimulación del macho por parte de la hembra, y en la segunda se produce el reflejo de

inmovilización de la cabra como respuesta al estímulo por parte del macho, lo que induce a la monta y a la cópula (Fabre-Nys, 2000) (Fig.6).

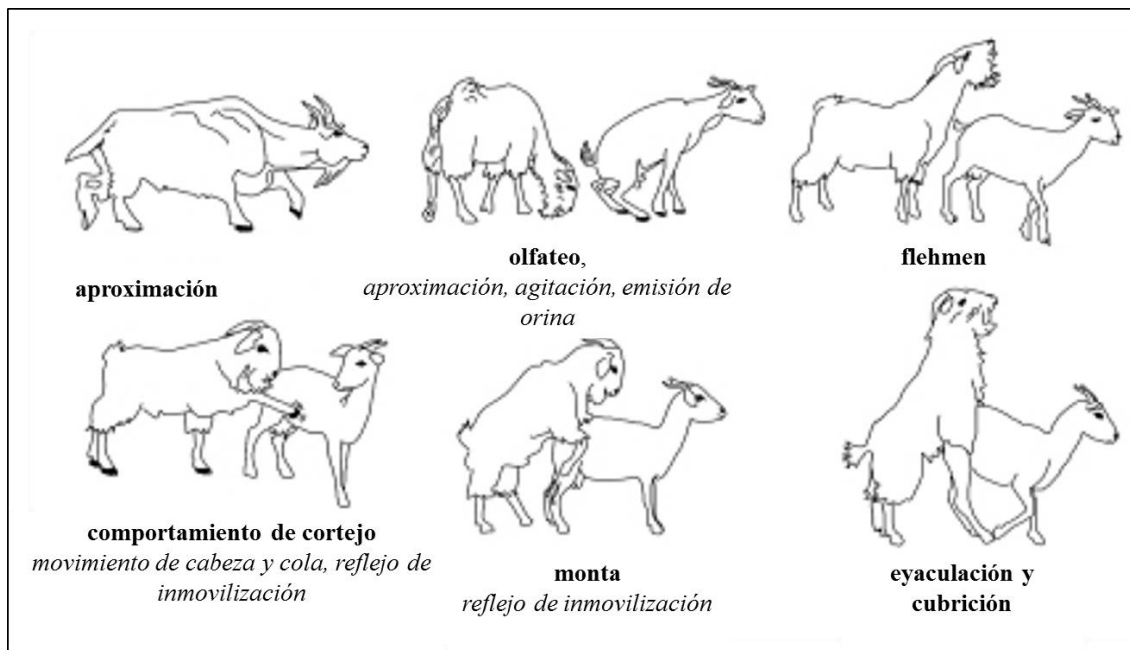


Fig.6. Comportamiento sexual en caprino. La actividad del macho se indica con caracteres en negrita, y los de la hembra en cursiva. Adaptado de Hart y Jones (1975)

La duración del comportamiento del celo es de aproximadamente 36 horas, pero puede variar entre 24 y 48 horas dependiendo de la edad, de los individuos, de las razas, de la estación y de la presencia del macho. Así, en las razas Angora y Mossi es conocido que tienen un comportamiento de celo relativamente corto, de 22 y 20 horas, respectivamente (Shelton, 1978; Tamboura et al., 1998). En caprinos Criollo de México la duración del comportamiento de estro está en torno a 27 horas y en la raza Alpina francesa se describen duraciones de 31 horas (Baril et al., 1993). En la raza Boer la duración promedio es de 37 horas (Greyling, 2000) y en la raza Matou de China central es de 58 horas (Moaeen-ud-Din et al., 2008).

El efecto de la edad se manifiesta en una duración más corta del celo en hembras jóvenes. Igualmente, la continua presencia del macho durante el estro puede reducir la duración del mismo, pero no afecta a la tasa de ovulación, como ha sido descrito en la raza Nubiana (Romano y Fernández Abella, 1997). El intervalo entre el inicio del celo y

la descarga preovulatoria de LH también es muy variable, puede oscilar dependiendo de la raza desde 8 horas en la raza Boer (Greyling, 2000) hasta 14 horas en la raza Alpina (González-Stagnaro et al., 1993).

La descarga preovulatoria de LH tiene una duración de 8 a 10 horas con un nivel que supera los 50 ng/ml en plasma (Chemineau et al., 1982; Mori et al., 1987), y el pico máximo se produce de 10 a 15 horas después del inicio del estro (Chemineau et al., 1982; Mori et al., 1987, González-Stagnaro et al., 1993).

En el periodo preovulatorio sobre la túnica albugínea del ovario actúan enzimas colagenasas, activando el proceso de colagenolisis, vasoconstricción y también apoptosis en las células de la teca externa en la superficie del folículo preovulatorio. Estos mecanismos de transformación de las células foliculares, conducen a la ovulación que se produce alrededor de 20 horas después del pico preovulatorio de LH (Pelletier et al., 1982). Las células foliculares de la teca interna y granulosa se transforman entonces en las nuevas células del cuerpo lúteo que comienzan a ser activas en la síntesis y secreción de progesterona, al menos parcialmente, bajo la influencia de la LH que tiene una actividad pulsátil elevada (4-7 pulsos en 8 horas) hasta el día 7 del ciclo cuando la frecuencia se estabiliza alrededor de 1,5 pulsos en 8 horas (Sutherland, 1987a).

La fase luteal se inicia a partir de la ovulación y su duración es de unos 16-18 días. Se corresponde con el metaestro y el diestro. En el metaestro, las concentraciones de progesterona empiezan a aumentar, y en el diestro estas concentraciones se mantienen altas hasta que se produce la luteolisis. Durante la fase luteal del ciclo, la LH es liberada bajo la forma de descargas pulsátiles y su frecuencia de liberación está relacionada inversamente con el nivel de progesterona plasmática de origen luteal (Cheminea et al., 1993). La amplitud de estos pulsos es limitada (no más de 1ng/ml). La progesterona desempeña un papel esencial de retroalimentación negativa en la regulación de la LH durante el ciclo, además de preparar al endometrio para la implantación del embrión y ayudar a mantener la gestación, siendo indispensable su presencia durante toda la gestación en el ganado caprino (Hunzicker-Dunn y Mayo, 2006)

Alrededor de los días 16-17 del ciclo, si no ha habido fecundación o el ciclo no ha sido fértil, las prostaglandinas uterinas ($\text{PGF}_{2\alpha}$) provocarán la luteolisis (Horton et al., 1976). Inmediatamente después, la brusca disminución de la progesterona provoca un fuerte incremento de la frecuencia de descarga de los pulsos de LH y de su amplitud (Chemineau et al, 1999; Baril et al., 1993). Este aumento de la actividad gonadotrópica provoca una estimulación del crecimiento de los folículos de diámetro superior a 1mm y de la actividad esteroidea de estos (Kanai et al., 1988). Los folículos secretaran estradiol 17β en cantidades crecientes (Mori et al., 1984), el nivel plasmático se eleva de 10 a 30 pg/ml en los días que preceden al estro (Bono et al., 1983; Chemineau et al., 1982), y será este nivel elevado el responsable del comportamiento sexual en la cabra durante este periodo (Sutherland, 1987b).

Durante el ciclo estral se producen también cambios en el tracto genital para facilitar el transporte espermático y la fecundación, así como para la preparación de la implantación del embrión. Debido a los altos niveles de estrógenos durante el estro, la mucosa vaginal, cervical y uterina se congestiona y se vuelve edematosa (Hamilton y Harrison, 1951). Además, las glándulas de estas mucosas van secretando según avanza el estro un moco cada vez más viscoso. El papel que juega la secreción mucosa de las glándulas cervicales es muy importante en el control del transporte espermático. Los estrógenos estimulan la secreción de sialomucinas y sulfomucinas por parte de las células mucosas de los pliegues del cérvix, que permitirán el avance de los espermatozoides hacia el útero (Heydon y Adams, 1979). Esta secreción se verá inhibida cuando las concentraciones de progesterona aumenten durante la fase luteal.

Respecto a los cambios citológicos a lo largo del ciclo estral en cabras, existe una relación entre las células vaginales que se descaman y la secreción de hormonas esteroides secretadas en cada momento. Las células superficiales aparecen durante el proestro, estro y metaestro temprano (Hulet y Shelton, 1980). Las células parabasales e intermedias se observan durante la fase luteal, cuando es mayor la secreción de progesterona. Las células de exfoliación que se pueden apreciar en la luz vaginal son el resultado del incremento plasmático de estrógenos que causan un adelgazamiento paulatino de la pared vaginal (Pérez-Martínez et al., 1999). La distribución de los mastocitos en las distintas zonas del tracto genital y tejido ovárico también varía dependiendo de los cambios fisiológicos que se producen durante el ciclo estral. El

número de estas células es máximo en proestro y mínimo en metaestro (Karaca et al., 2008). Los mastocitos derivan de precursores hematopoyéticos y participan en la respuesta alérgica liberando histamina, pero además intervienen como células centinelas para la defensa del tejido uterino durante la implantación embrionaria.

5.2.1.- CONTROL HIPOTALÁMICO

La influencia del hipotálamo sobre el control de la reproducción se realiza mediante su conexión con la hipófisis a través del sistema porta-hipofisario, por el que se va a transportar la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) (Karsch et al., 1984), hormona fundamental en el control de la reproducción.

La GnRH sintetizada en el hipotálamo, se libera hacia el sistema porta hipofisario y llega a sus receptores a nivel hipofisario. Una vez en la adenohipófisis estimulará la síntesis y liberación de la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) (Clarke IJ, 2002). La FSH estimula el crecimiento folicular y la producción de estradiol. El estradiol a su vez controla la frecuencia de pulsos de GnRH y finalmente es responsable de la descarga preovulatoria de LH. Con la descarga de LH se produce la ovulación en un intervalo aproximado de 24 horas. Estos procesos son los que determinan los acontecimientos que se suceden durante el ciclo estral a lo largo del periodo de la estación reproductiva (Evans et al., 2003). La liberación de GnRH está controlada también por factores metabólicos, endocrinos (sensibilidad a los esteroides gonadales, melatonina), nutricionales, ambientales (fotoperiodo), etc. (Zarazaga et al., 2005). Estos factores causan una reducción en la secreción de gonadotropinas durante el anestro estacional, lo que podría reflejarse en cambios en la acción del estradiol sobre la liberación de GnRH (Chemineau et al., 2010).

La secreción de GnRH es de tipo pulsátil, y de forma similar la LH. La frecuencia de estos pulsos se reduce considerablemente durante el periodo de anestro estacional debido a un incremento de la sensibilidad del hipotálamo (feed-back negativo) frente a los esteroides gonadales y la escasa secreción de estradiol de los folículos ováricos es suficiente para bloquear el grado de secreción pulsátil de GnRH. (Chemineau et al., 2010).

5.2.2.- CONTROL HIPOFISARIO

La FSH estimula el crecimiento y la maduración de nuevas ondas foliculares, que constituyen cohortes de folículos. Su liberación no se produce en forma de pulsos. Y durante la fase folicular del ciclo se describen dos descargas de FSH, la primera coincide con la descarga preovulatorio de LH y la segunda es simultánea con el proceso ovulatorio, aproximadamente 24 horas después (Chemineau et al., 1982). Esta segunda descarga está relacionada con el reclutamiento de folículos que constituyen la primera onda de crecimiento folicular que madurarán en el próximo ciclo (Mohamed et al., 2003). Con la regresión de los folículos de la primera onda se inicia un incremento de la secreción de FSH iniciándose una nueva onda de desarrollo folicular terminal (Mohamed et al., 2005).

La LH durante el ciclo se secreta en forma de pulsos como respuesta a la liberación de GnRH. Su función es estimular el desarrollo folicular de los folículos seleccionados hasta la fase terminal de formación del folículo preovulatorio (Fatet et al., 2010). Al final de la fase folicular y coincidiendo con el principio del celo se produce la descarga fásica preovulatoria de LH con una duración en la cabra de aproximadamente 10-14 horas, consecuencia del feed-back positivo del incremento de la secreción de estradiol por parte del folículo preovulatorio. Durante la fase luteal del ciclo, la LH se secreta en pulsos de baja frecuencia (1 pulso cada 3-12 horas) debido al efecto inhibitorio de la progesterona secretada por el cuerpo lúteo. Cuando el cuerpo lúteo regresa, la frecuencia de los pulsos de LH se va incrementando hasta llegar a 1 pulso cada 1-2 horas, lo que provoca un proceso rápido del desarrollo y maduración de los folículos, un incremento de la secreción de estradiol, la aparición del celo y un nuevo pico preovulatorio de LH (Goodman et al., 1981).

Durante el anestro estacional, las concentraciones plasmáticas de progesterona se encuentran en niveles basales debido a la ausencia de cuerpos lúteos. Durante este periodo la frecuencia de pulsos de LH es muy baja debido a la alta sensibilidad del hipotálamo frente a la secreción de estradiol, muy diferente a la situación que aparece durante el periodo de estación sexual (Chemineau et al., 1982).

La prolactina sigue un patrón de secreción estacional alcanzándose las máximas concentraciones plasmáticas durante los periodos de días más largos (solsticio de verano), siendo las más reducidas las correspondientes al periodo de final de otoño y comienzo del invierno (Prandi et al., 1988). No se ha puesto en evidencia ningún efecto inhibitorio de los niveles de prolactina sobre la actividad ovulatoria cíclica en el periodo de anestro estacional.

5.3.- LIMITACIONES DE LA EFICACIA REPRODUCTIVA

5.3.1.- ANESTRO ESTACIONAL

El fotoperiodo se puede definir como la variación estacional de la duración del número diario de horas de luz (Malpaux, 2006; Chemineau et al., 2010). La importancia del fotoperiodo en el control de la estacionalidad reproductiva de las especies animales se debe a que es una variable medioambiental muy estable, siendo la señal que todas las especies utilizan para establecer su periodo de actividad reproductiva en función de la estación más favorable para los partos y la duración de la gestación (Gómez-Brunet et al., 2012) (Fig.7).

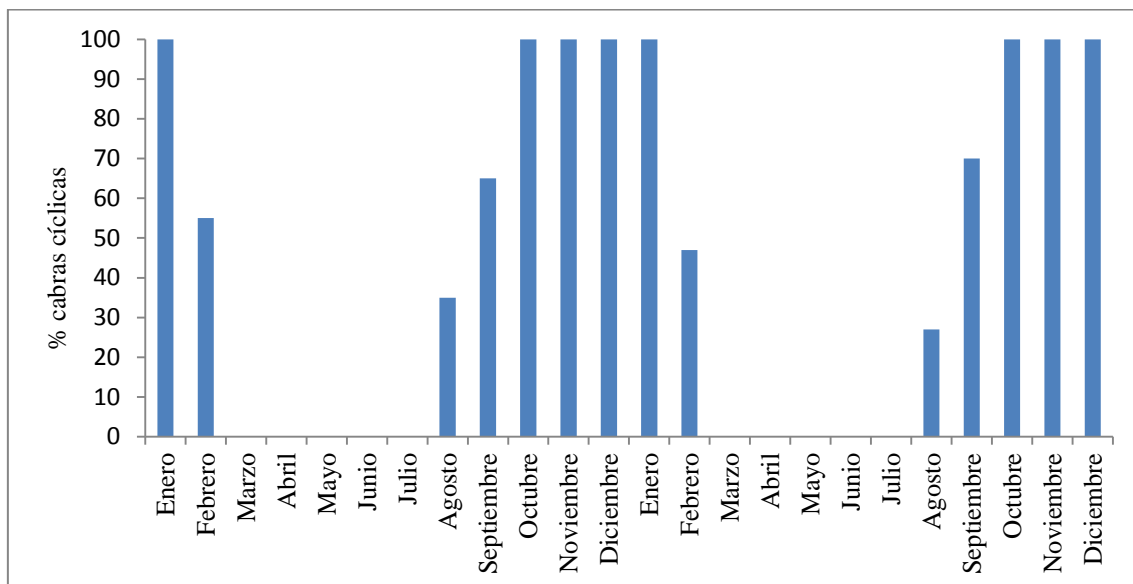


Fig.7. Porcentaje de hembras cíclicas en cada mes del año de cabras de raza Murciano-Granadina

La magnitud de la estacionalidad reproductiva depende de la latitud geográfica, en zonas templadas por encima de los 35°, la actividad sexual de las cabras se caracteriza por unos periodos con aparición espontánea de actividad ovulatoria cíclica y comportamiento de celo seguidos de otro periodo de anestro profundo (Shelton, 1978). En los periodos de transición entre ambos, se pueden observar ovulaciones silenciosas junto con la presencia de ciclos cortos de baja secreción de progesterona. En latitudes bajas, regiones ecuatoriales, tropicales y subtropicales, los cambios en la duración de los días no es tan pronunciado, por lo que la estacionalidad reproductiva está menos marcada, y la mayoría de las razas de cabras de estas regiones geográficas tienen periodos de anestro estacional más reducidos o incluso actividad cíclica todo el año en las zonas más próximas al ecuador, además de presentar un anestro post-parto relativamente corto (Chemineau, 1986). En estos animales, sin embargo, factores medioambientales como la condición corporal (disponibilidad de alimento) y cambios de temperatura suponen una gran influencia en sus ciclos reproductivos, impidiendo en muchos casos poder expresar en su totalidad este potencial (Chemineau, 1986).

Los caprinos son llamados especies de días cortos, debido a que el periodo de actividad reproductiva ocurre en otoño-invierno, cuando el fotoperiodo es decreciente, esta información de los días cortos (8 horas de luz diarias) se traduce en señales estimuladoras, una vez que los días largos han cumplido los efectos inhibitorios y generado la sensibilidad al cambio hacia los días cortos (Chemineau et al, 1992b).

Las variaciones en la duración del día inducen cambios en la secreción de melatonina, que es el transductor que transforma la señal fotoperiódica en una señal endocrina, provocando cambios en la secreción de gonadotropinas. La información fotoperiódica es traducida por la glándula pineal estableciendo un ritmo circadiano de su secreción, exclusivamente nocturna, lo que implica una mayor amplitud de su periodo de secreción en los días más cortos del año. (Malpaux, 2006). La melatonina no sólo se sintetiza en la glándula pineal, sino que también lo hace en otras estructuras donde se encuentra el complejo enzimático suficiente para su síntesis, como en la retina, tracto gastrointestinal, glándula lacrimal y en los leucocitos (Pang et al., 1993), sin embargo, la síntesis a nivel de la glándula pineal es la más importante (Gatica., 2012).

La información fotoperiódica es captada por las células ganglionares de la retina, conducida a través del tracto retinohipotalámico (TRH) y transmitida a los núcleos supraquiasmáticos (NSQ) del hipotálamo, principal reloj circadiano de los mamíferos, desde donde llega hasta los ganglios cervicales superiores pasando por los núcleos paraventriculares, y por último, a la glándula pineal (Tamarkin et al., 1985). Esta glándula tiene como misión la síntesis de melatonina, que se sintetiza únicamente durante las horas de oscuridad, ya que la información lumínica captada por la retina durante el día inhibe la síntesis de la hormona. De esta manera, hay una mayor duración de la secreción de melatonina durante los días cortos y respecto de los días largos (Delgadillo et al., 2001). La percepción de esta duración permite a los animales, entre otras muchas funciones, regular su actividad reproductiva.

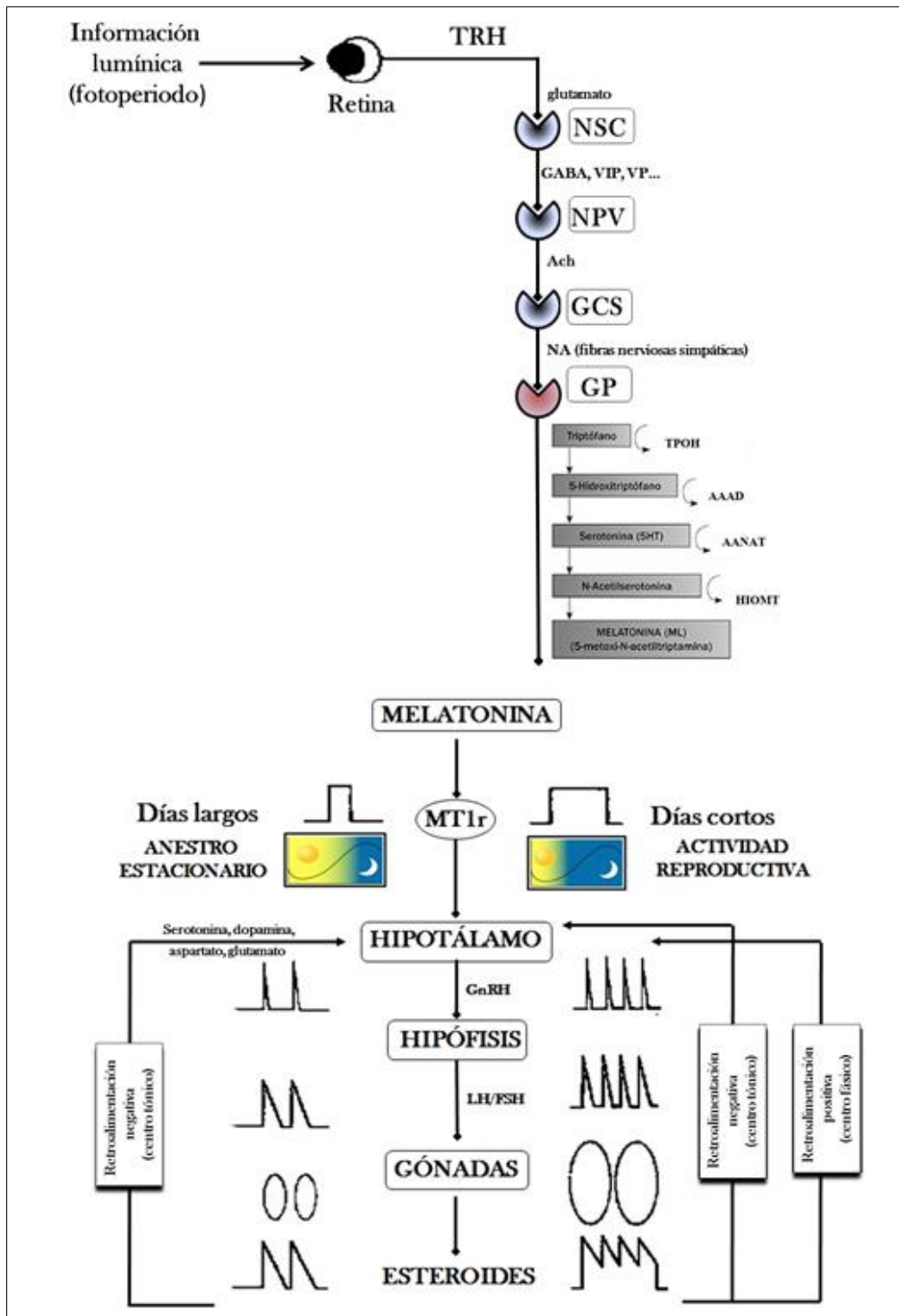


Fig.8. Representación esquemática de los mecanismos fisiológicos de la acción del fotoperíodo. Adaptado de Karsch *et al.*, 1984; Chemineau, 1992 y Arendt, 2011.

TRH: tracto retino-hipotalámico; NSC: núcleo supraquiasmático; VIP: péptido intestinal vasoactivo; VP: vasopresina; NPV: núcleo paraventricular; Ach: acetilcolina; GCS: ganglio cervical superior; NA: noradrenalina; GP: glándula pineal; TPOH: triptófano-hidroxilasa; AAAD: 5-hidroxitriptófano-decarboxilasa; AANAT: arilalkilamina N-acetil-transferasa; HIOMT: hidroxindol-O-metil-transferasa; GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas; LH: hormona luteinizante; FSH: hormona foliculoestimulante

El comienzo de la oscuridad provoca un incremento en la síntesis de melatonina por parte de los pinealocitos de la epífisis, que son estimulados por la secreción de noradrenalina, proveniente del ganglio cervical superior (GCS), que se une a los receptores α_1 y β de la membrana del pinealocito. La activación de estos receptores desencadena una reacción intracelular que culmina con la estimulación de la expresión del ARNm para la síntesis de la enzima arilalkilamina N-acetil-transferasa (AANAT) encargada de la transformación de la serotonina en N-acetil-serotonina (NAS). Una vez sintetizada, ésta se transforma en melatonina por la acción de la enzima hidroxindol-O-metil-transferasa (HIOMT). La serotonina deriva del triptófano con el 5-hidroxitriptófano como intermediario. La conversión de triptófano a 5-hidroxitriptófano es catalizada por la enzima triptófano-hidroxilasa (TPOH). Posteriormente se transformará en serotonina por medio de la 5-hidroxitriptófano-descarboxilasa. (Malpaux et al., 2001).

La melatonina ejerce su acción a través de receptores acoplados a proteínas G (MTr), que han sido identificados y caracterizados en una gran variedad de tejidos en distintas especies por autorradiografía y ensayos con iodomelatonina (Poon et al., 1997). En caprinos, estas técnicas demostraron la presencia de sitios de unión para 2-iodoMT en la *pars tuberalis* de la adenohipófisis, el núcleo supraquiasmático, al área pre-óptica, el *septum* lateromedial, el fornix, el hipocampo y la corteza cerebral (Devenson et al., 1992). Existen importantes neurotransmisores implicados en la regulación de la acción de la melatonina, entre ellos la dopamina, la serotonina y el aspartato.

La melatonina no actúa directamente sobre las neuronas GnRH hipotalámicas, su acción tiene lugar de forma indirecta a través de rutas de interneuronas que terminan por conectar con las neuronas secretoras de GnRH y que retardan la respuesta al cambio de duración de los días (Malpaux et al., 1999). Dichos autores en 1997 comprobaron en ovejas el incremento en la secreción de GnRH, a los 40-60 días después de haberse iniciado los días cortos. En el caso de la cabra, la estimulación de la secreción de LH se produce aproximadamente a los 45 días de haber comenzado los días cortos, y la inhibición a los 30 días de haber comenzado los días largos (Zarazaga et al., 2011a, 2011b).

El control que ejerce la melatonina sobre la actividad reproductiva se debe a que estimula la liberación de LH al actuar sobre receptores específicos en el hipotálamo medio basal (receptores MT1) (Mailliet et al., 2004) dado que, además de ser vertida a circulación sanguínea (glándula pineal-yugular-carótida-órgano diana), la melatonina es vertida al líquido cerebrospinal del III ventrículo (glándula pineal-III ventrículo-órgano diana) (Tricore et al., 2002) desde donde es difundida al hipotálamo. Su acción sobre la liberación de GnRH es realizada de forma indirecta, interviniendo diferentes neuromediadores, como son el sistema dopaminérgico y serotoninérgico (Zarazaga et al., 2009; Malpaux et al., 2001). En caprinos mediterráneos se ha observado como estos dos sistemas están implicados en la inhibición de la secreción de LH al inicio del periodo de anestro estacionario (Zarazaga et al., 2011c) (Fig.8).

5.3.2.- ANESTRO POST-PARTO

El intervalo entre el parto y la primera ovulación después del parto está condicionado por diferentes factores como son la raza, la edad, la alimentación (Maia, 1998), el estado corporal en el momento del parto, la época del año en que se produce el parto (Andrioli et al., 1992), la duración de la lactación (Acosta, 1996), la involución uterina (Tielgy et al., 1982; Fasany et al., 1987), o la presencia de machos (Chemineau et al., 1988; Delgadillo et al., 1996).

Por ejemplo, el anestro post-parto se prolonga en animales desnutridos respecto de los bien alimentados (Thimonier et al., 1986), así como en hembras lactantes respecto de aquellas destetadas precozmente (Peters et al., 1990).

De entre todos estos factores, la época de parto es uno de los que mayor influencia tiene en la aparición del siguiente ciclo estral. La influencia del momento del parto está determinada por un efecto estacional a través del fotoperiodo. De este modo, cuando el parto ocurre al final del periodo reproductivo, el anestro postparto se continúa con el anestro estacional, no recuperando la ciclicidad hasta la siguiente época reproductiva, pero cuando el parto se produce dentro de la estación reproductiva, el anestro postparto puede tener una duración media de 40 días (Delgadillo et al., 1998).

Durante este tiempo, se produce una fase de inactividad ovulatoria intensa de unos 21 días de duración que se corresponde con el post-parto temprano, y una segunda fase de duración variable determinada sobre todo por la lactación. Los efectos depresores de la lactación sobre la eficacia reproductiva vienen determinados en parte por el reflejo de succión, que estimula la liberación de oxitocina y prolactina, y esto da lugar a un retraso de las primeras ovulaciones en comparación con hembras paridas en la misma época y mantenidas secas (Schirar et al., 1989).

La actividad cíclica tras el parto es precedida por uno o más ciclos cortos con baja secreción de progesterona y ovulaciones silenciosas (sin sintomatología de celo) (Pelletier et al., 1975). Estos ciclos previos son necesarios para la manifestación de los síntomas de celo, determinándose así el intervalo mínimo necesario de 40 días entre el parto y el primer celo (Devendra et al., 1982).

En base a la influencia que estos factores ejercen sobre el intervalo entre el parto y el restablecimiento de la actividad cíclica, podemos evitar situaciones de anestro profundo con sencillas prácticas de manejo como una alimentación adecuada en el último mes de gestación, el destete precoz, el evitar parideras al final de la estación sexual o la utilización del efecto macho (Gonzalez-Stagnaro, 1991).

En un estudio realizado por Delgadillo et al., (1998) se demostró que cabras que habían parido en enero no reiniciaban la actividad ovárica hasta el comienzo de la siguiente estación reproductiva (después de unos 200 días). Hembras que habían parido en mayo, tampoco reiniciaron su actividad hasta la siguiente época de actividad (después de unos 100 días). Sin embargo, hembras que parieron en octubre, dentro de la estación reproductiva, iniciaron su actividad tan sólo 50 días después. En el mismo estudio también se demostró la influencia que ejerce la lactación de las crías, pues el intervalo entre el parto y la primera ovulación fue más largo en las hembras lactantes hasta los 90 días, que en aquellas en las que las crías fueron retiradas a los 30 y a los 2 días (Delgadillo et al., 1998). Todas las hembras fueron ordeñadas después del destete hasta la misma fecha, por lo que la mayor duración del anestro es más una consecuencia del amamantamiento que de la producción de leche.

Se observó una interacción entre el mes de parto y la duración de la lactación, en concreto, ausencia del efecto de la duración de la lactación en las hembras paridas en enero y junio, en contraste con la fuerte influencia en las paridas en octubre (Delgadillo et al., 1998). Esto viene a reforzar el hecho de que la estacionalidad es el factor más influyente en el anestro postparto.

5.4.- CONTROL HORMONAL DE LA ACTIVIDAD REPRODUCTIVA. INDUCCIÓN Y SINCRONIZACIÓN DEL CICLO REPRODUCTIVO EN CAPRINOS

El patrón reproductivo de la especie caprina es el reflejo de la expresión de un ritmo endógeno que es sincronizado y orientado por el fotoperiodo a través de su intermediario, la melatonina (BonDurant., 1981). Sin embargo, existen otros factores medioambientales, como la disponibilidad de alimento (Mani et al., 1996; Walkden-Brown et al., 1994a) o las interacciones sociales (Restall et al., 1995; Walkden-Brown et al., 1994b), que también tienen un papel importante en la regulación de la estacionalidad reproductiva.

Reducir el anestro estacional, provocando que las hembras presenten actividad sexual durante todo este periodo de reposo reproductivo ha sido un objetivo prioritario en el control de la reproducción del ganado caprino. Este manejo de la reproducción presenta varias ventajas, ya que permite elegir con anticipación los periodos de reproducción, reducir la mortalidad perinatal, disminuir los periodos de anestro, optimizar la prolificidad, realizar una mejora genética, adaptarse a las demandas del mercado, etc. (Chemineau et al., 1993).

El concepto de control de la reproducción en las hembras se basa en las posibilidades de actuación sobre el ciclo reproductivo, tanto para determinar el momento de aparición del celo y de la ovulación durante la estación sexual, y por tanto en periodos de actividad cíclica ovulatoria; como la inducción del ciclo reproductivo en los periodos de anestro estacional (Corteel., 1971). Dentro de estas posibilidades la de mayor interés desde el punto de vista de incrementos de los rendimientos reproductivos sería la inducción de la ovulación durante los periodos de anestro estacional. La aplicación de los métodos de inducción, introdujo el concepto de sincronización de celos y ovulaciones, utilizada para cualquier otro tipo de práctica zootécnica,

principalmente el uso de la inseminación artificial (IA) a tiempo fijo sin detección previa de celos (López-Sebastián et al., 2009).

Una vez que se caracterizó el perfil endocrino del ciclo sexual en la especie caprina, las primeras estrategias en el manejo reproductivo se enfocaron hacia el desarrollo de tecnologías que utilizaban la simulación de las secreciones hormonales, administrando hormonas exógenas (Corteel et al., 1967).

5.4.1.- PROGESTERONA Y ANÁLOGOS (PROGESTÁGENOS)

La administración de progesterona o progestágenos simula los niveles circulantes de progesterona plasmática característicos de la fase luteal del ciclo. La progesterona es un potente inhibidor de la secreción pulsátil de GnRH hipotalámica, lo que implica la disminución de la secreción de LH y por tanto la ausencia de formación de folículos preovulatorios y ovulación. En hembras cíclicas, prolonga artificialmente el efecto bloqueante de la progesterona del cuerpo lúteo, después de la regresión de éste y así impedir la ovulación (Corteel et al., 1982). En hembras en anestro, este tratamiento hormonal sensibiliza al sistema nervioso central para responder de forma fisiológica al estímulo por una gonadotropina, sin esta asociación de tratamientos no se obtiene con éxito el desencadenamiento del celo y de la ovulación (Corteel et al., 1985).

Fue en 1953 cuando los investigadores Dauzier et al. señalaron el papel inhibidor que sobre la ovulación ejercía la progesterona producida por el cuerpo lúteo en la cabra cíclica. Estos autores observaron que se podía bloquear la ovulación durante 19 días mediante la inyección diaria de una dosis mínima de 5 mg de progesterona. Los mismos autores en otra publicación en el mismo año (Dauzier et al., 1953b), combinaron la acción de la progesterona con un tratamiento de gonadotropinas para mejorar los resultados de fertilidad en cabras.

En el ganado caprino, las inyecciones de progesterona daban lugar a una buena sincronización, pero aparte del inconveniente de aplicación diaria del tratamiento, proporcionaba unos malos índices de fertilidad (Corteel et al., 1967a; Corteel, 1971). En los años 50 como consecuencia del desarrollo de anticonceptivos orales para la especie humana se dispuso de numerosos compuestos de acción progestativa. La incorporación

de sustancias de acción progestativa por vía oral en los piensos de los animales simplificaba el tratamiento, pero no permitía obtener un bloqueo perfecto del ciclo, ni resolver el problema de la baja fertilidad (Corteel et al., 1971).

El éxito que supuso el desarrollo en ganado ovino de un método basado en el empleo de un progestágeno (FGA, acetato de fluorogestona) aplicado vía vaginal en un soporte de esponja de poliuretano (Robinson, 1967); llevó a la realización de las primeras pruebas en ganado caprino con excelentes resultados (Barker, 1966; Corteel et al., 1967a).

Dependiendo de factores de disponibilidad en cada mercado, estos dispositivos pueden tener la forma de esponjas intravaginales impregnadas con progestágenos (FGA, acetato de fluorogestona y MAP, acetato de medroxiprogesterona); dispositivos intravaginales de liberación controlada “CIDR” impregnados en progesterona; o incluso implantes subcutáneos de silicona impregnados en el progestágeno norgestomet (Evans y Maxwell, 1987; Freitas et al., 1997; Chemineau et al., 1999)

Desde principio de los años sesenta los dispositivos intravaginales impregnados con progestágenos han sido los tratamientos de elección para la inducción de celos y ovulaciones en cabras (Corteel et al., 1967), tanto en épocas de actividad sexual, como en épocas de anestro estacionario. La aplicación intravaginal de progesterona o sus análogos facilita la retirada brusca del tratamiento hormonal. Las formas comerciales más utilizadas de progestágenos son el acetato de fluorogestona (FGA; 45 mg/esponja) y el acetato de medroxyprogesterona (MAP; 60 mg/esponja) (Evans et al, 1990). Estos progestágenos presentan más efectividad que la progesterona natural a dosis más bajas.

Una vez introducidas las esponjas se mantienen durante periodos de 9 a 19 días. Se han realizado experimentos en ganado caprino con el objetivo de reducir los días del tratamiento progestativo. Corteel et al. (1988) demostraron que reduciendo los días de tratamientos de esponjas vaginales de FGA de 18 a 11 mejoraba la fertilidad de las cabras. Las últimas experiencias ponen de manifiesto que incluso con protocolos de 6 días la inducción de celo también se alcanza con éxito (Fonseca et al., 2005). Cuando estos tratamientos se combinan con prostaglandinas (luteolíticos), se consigue reducir notablemente la duración de los mismos (Menchaca et al., 2007).

En épocas de anestro estacional, este tratamiento progestativo se acompaña con Gonadotropina Coriónica Equina (eCG) inyectada en el momento de la retirada de la esponja o 48 horas antes. Las hembras normalmente salen en celo en las 24-48 horas después de la retirada del dispositivo (Córdova-Izquierdo et al., 2008).

De igual manera, el CIDR (controlled internal drug release) otro de los dispositivos de silicona de administración intravaginal impregnado con progesterona, ha sido utilizado para el control de la reproducción en ganado caprino. Este dispositivo fue diseñado para ganado ovino en Nueva Zelanda a principio de los años ochenta (Welch et al., 1984) y contenía 0.30 g de progesterona. Las concentraciones plasmáticas de progesterona se van incrementando rápidamente una vez se ha insertado el dispositivo, alcanzan su máximo nivel a los tres días y después comienzan a disminuir gradualmente (Wheaton et al., 1993). Se han seguido distintos protocolos con este tipo de método, con duraciones que varían entre 5 y 11 días de mantenimiento del dispositivo.

Otro tipo de progestágeno es el norgestomet (NOR), también utilizado con éxito en el control de la reproducción en cabras (Wildeus, 1999; Mellado et al., 1998). Este dispositivo es de administración subcutánea, mediante un implante en la base de la oreja. El periodo de implantación usualmente se extiende entre 9 a 14 días y frecuentemente es combinado con eCG y/o PGF_{2α}. El método es efectivo, pero causa estrés al animal tanto en el momento de la inserción del implante como en el de su retirada debido a la incisión que se realiza en la piel (Evans et al., 1990).

Kusina et al. (2000), realizaron un estudio comparativo, entre los implantes y las esponjas vaginales impregnadas con progesterona, y los resultados de efectividad fueron muy similares para los dos tratamientos.

Aparte de los factores relacionados con el tratamiento, existen otros que vienen definidos por el animal o por el medio ambiente, y que tienen una importancia decisiva en los resultados obtenidos, como son:

- Profundidad del anestro: los primeros ensayos realizados por Corteel et al. (1967a) indicaban que la fertilidad aumentaba a medida que la fecha del

tratamiento se acercaba a la estación sexual. La modificación del protocolo original permitió mejorar los resultados aun en el periodo de anestro más profundo (Corteel et al., 1985)

- Intervalo post-parto: para un periodo dado la fertilidad aumenta con el intervalo transcurrido desde el parto hasta el inicio del tratamiento (Corteel et al., 1975)
- Raza: dentro de una misma latitud, los resultados obtenidos son diferentes tras la aplicación del mismo tratamiento a distintas razas de cabra (Corteel et al., 1985)
- Manejo de los animales en la explotación: organización de las cubriciones en monta natural o controlada, proporción de machos y hembras, actividad sexual de los machos, etc... (Bretzlaff y Madrid, 1989)
- Otros: edad, co-tratamientos que acompañen al dispositivo vaginal, dosis de eCG, etc.

5.4.2.- GONADOTROPINAS

Con la administración de gonadotropinas exógenas se pueden simular las descargas preovulatorias de FSH y LH, y con ello inducir la ovulación (Armstrong et al., 1983). Como se ha mencionado antes, el uso de estas hormonas se incorpora de manera habitual en los protocolos de inducción de celos y ovulaciones, combinado con los dispositivos intravaginales con progestágenos en hembras en anestro. El producto comercial más utilizado es la gonadotropina coriónica equina (eCG), anteriormente conocida como “Pregnant Mare Serum Gonadotropin” (PMSG). Esta hormona fue descubierta por Cole y Hart en 1930, es una glicoproteína placentaria obtenida del suero de las yeguas gestantes, y presenta en una misma molécula simultáneamente actividad biológica propia de la hormona folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH) (Papkoff, 1974). La eCG es capaz de provocar en cabras el crecimiento folicular, el incremento de la secreción de estradiol, la sintomatología del celo, el pico preovulatorio de LH y la ovulación (Chemineau et al., 1982; González-Stagnaro et al., 1984).

La molécula está compuesta por dos subunidades (α y β), la primera es la responsable de las actividades FSH y LH, mientras que la segunda determina la amplitud de su actividad. El alto contenido en ácido siálico de la molécula de eCG le

confiere una larga vida media, que supera ampliamente a las de la FSH y la LH (Martinuk et al., 1991). La vida media de la molécula se cifra en torno a las 40 horas, aunque puede llegar a persistir en plasma hasta 5-6 días. Esta presencia prolongada de la eCG en sangre puede originar una sobreestimulación del desarrollo folicular (Betteridge, 1977; Elsdén et al., 1978), aún después de las primeras ovulaciones inducidas, resultando en un gran número de folículos persistentes anovulatorios y elevadas concentraciones de estradiol durante la fase luteal (Murphy, 2012)

Otra de las limitaciones en el uso de la eCG tiene que ver con aspectos sanitarios, principalmente en cuanto a transmisión de enfermedades emergentes, o incluso a la propia disponibilidad de un producto de origen animal cuya producción está concentrada en determinadas zonas que en algún momento pueden ser susceptibles de restricciones en la salida de sus productos (López Sebastián et al., 2009). De cualquier manera, desde un punto de vista funcional y especialmente en ganado caprino, la mayor limitación de este tratamiento se debe a la aparición de anticuerpos anti-eCG después de un uso repetido, con una relación directa entre las concentraciones residuales del anticuerpo y la tasa de fertilidad (Maurel et al., 2003). En caprinos es muy evidente la relación de animales tratados de forma sucesiva con eCG y la disminución de la fertilidad (Baril et al., 1996). Estas alteraciones se deben a un alto nivel de respuesta inmune frente a la administración sucesiva de eCG que afecta a la descarga preovulatoria de LH (Roy et al., 1999) pero también afecta de forma importante a la bioactividad del efecto FSH de la eCG, lo cual deprime sus posibilidades de estimulación ovárica (Hervé et al., 2004).

Otra gonadotropina que ha sido utilizada para la inducción de la ovulación en ganado caprino es la hCG (Gonadotropina Coriónica Humana), la cual tiene actividad similar a la LH. Es una glucoproteína heterodimérica compuesta también por dos subunidades. La subunidad α es idéntica a la que presentan hormonas como la LH, FSH y TSH. La subunidad β es única para cada una de estas hormonas y responsable de sus funciones específicas (Gupta y Dighe, 2000; Senger, 2005; De Rensis et al., 2010). La subunidad β presenta una homología del 80% con la subunidad β de la LH (Norman y Litwack, 1997). Esta similitud estructural hace que la hCG pueda unirse a los receptores de LH (Lei y Rao 1994; Birken et al., 1996). Al igual que la eCG, la hCG presenta una

tasa de glicosilación muy alta en su estructura, lo que la confiere una actividad más prolongada y un aclaramiento más lento que la LH endógena (Cole, 2010).

Son varias las aplicaciones que ha tenido esta hormona en el ámbito de la ganadería caprina, ha sido utilizada para la inducción de la ovulación (Saleh et al., 2012), contrarrestar el efecto negativo de la regresión prematura del cuerpo lúteo después de un tratamiento de superovulación (Saharrea et al., 1998) y mejorar la tasas de gestación (Rajamahendran y Sianangama, 1992; Fonseca y Torres, 2005).

5.4.3.- HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROPINAS (GnRH)

La GnRH es un decapeptido sintetizado en el núcleo ventromedial, núcleo arqueado y eminencia media del hipotálamo en donde es almacenado, proporcionando un enlace humoral entre los sistemas neural y endocrino. En respuesta a las señales neurales, se liberan pulsos de GnRH hacia el sistema porta-hipofisario llegando a la adenohipófisis donde se sintetizará y liberará LH y FSH (Hafez y Hafez, 2002; Brebion et al., 1995).

Por su acción liberadora de gonadotropinas, esta hormona también ha sido utilizada para el control de la reproducción en cabras. En 1988, Knight et al. demostraron que bajas dosis de GnRH repartidas en múltiples inyecciones inducían tasas de ovulación normales en cabras en anestro estacional. En esta misma experiencia observaron que asociando el tratamiento hormonal con el “efecto macho”, las tasas de gestación eran altas. Robin et al. (1994) valoraron el uso de la GnRH junto con esponjas vaginales impregnadas en FGA o MAP, concluyendo que la utilización de esta hormona no era tan efectiva como la eCG en la reactivación del eje hipotálamo-pituitario-gonadal, ya que sólo inducía ovulación en los folículos preovulatorios pero no estimulaba en crecimiento folicular, retrasando el inicio del estro.

5.4.4.- PROSTAGLANDINA F_{2α} (PGF_{2α}) Y ANÁLOGOS

En cabras, la prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) y sus análogos actúan como agentes luteolíticos muy eficaces (Bosu et al., 1978; Ott et al., 1980). El cuerpo lúteo de las cabras es muy sensible a estos compuestos, lo que permite la utilización de dosis más

bajas que en otros rumiantes (Bretzlaff et al., 1981; Duque et al., 2012). Su utilización como métodos de sincronización del celo sólo es efectiva por tanto, en hembras cíclicas (Wildeus, 2000).

La administración exógena de $\text{PGF}_{2\alpha}$ o sus análogos inducen la lisis del cuerpo lúteo, seguida inmediatamente de una disminución abrupta de las concentraciones plasmáticas de progesterona (Wentzel et al., 1978), lo que induce el incremento de la pulsatilidad de la secreción de LH y la secreción de estradiol 17β , conduciendo a la aparición del celo y la descarga preovulatoria de LH (Greyling et al., 1986; Mori y Kano, 1984). Los dos productos de síntesis más utilizados son prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ como sal (trometamina de la $\text{PGF}_{2\alpha}$) y el cloprostenol.

Una de las limitaciones en la utilización de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ como tratamiento hormonal eficaz de sincronización del celo y ovulación, es que tiene que ser aplicada en presencia de un cuerpo lúteo activo. Las prostaglandinas no inducen la regresión luteal antes del día 4 del ciclo (Bosu et al., 1978; Rubianes et al., 2003), por lo tanto, aquellos animales que se encuentren en anestro o en una fase luteal temprana o folicular tardía en el momento de la administración no responderán al tratamiento (Thimonier, 1981).

La imposibilidad de conocer la fase exacta del ciclo en la que se encuentra un grupo de hembras, hace que sea necesaria la administración de dos dosis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ con un intervalo de 8 a 15 días (Chemineau et al., 1993). Con este protocolo de administración se consigue que en la aplicación de la segunda dosis, casi la totalidad de las hembras se encuentren en plena fase luteal lo que les permite responder al tratamiento. La primera inyección del cloprostenol induce el celo en el 77% de las hembras 62,4 horas después de la inyección, mientras que en la segunda inyección 14 días después de la primera, permite registrar celos en el 94% de las hembras 55,3 horas después del tratamiento (Chemineau et al., 1993).

Estos protocolos de sincronización se pueden aplicar durante todo el año en razas tropicales que no presentan anestro estacional (Godfrey et al., 1997, 1999), pero únicamente son aplicables en la estación reproductiva en áreas templadas (Acritopoulou y Haresign, 1980), o en los periodos de transición entre estaciones sexuales, donde las

hembras responden al estímulo de los machos y la ovulación inducida puede ser sincronizada con el tratamiento con prostaglandinas (Walkden-Brown y Restall, 1996).

Los tratamientos de sincronización son efectivos con la administración de dosis con intervalo de 8-15 días, pero estos no siempre están acompañados de los mismos resultados de fertilidad que se consiguen con los tratamientos progestativos y eCG (Godfrey et al., 1999). El problema parece estar causado por el hecho de que ese intervalo, asegura en la mayoría de los animales la presencia de un cuerpo lúteo en la segunda administración de prostaglandinas, pero a la vez altera la funcionalidad y la maduración final de los folículos preovulatorios, ya que la presencia de altas concentraciones de progesterona durante la mitad de la fase luteal del ciclo, genera un descenso de la secreción de LH, crucial para el crecimiento final de los folículos preovulatorios (Gonzalez-Bulnes et al., 2004), además de causar una variabilidad del momento de la ovulación después de inducir la luteolisis mediante $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Barret et al., 2002).

Estos inconvenientes que comprometen la funcionalidad de los folículos y generan bajos porcentajes de sincronización de celos, se puede superar cuando se trata a los animales durante la fase luteal temprana (Viñoles y Rubianes, 1998). Tratar a las hembras en este periodo es una buena opción debido a la presencia de folículos en crecimiento derivados de la primera onda de desarrollo folicular (Ginther et al., 1995). En este sentido, existen numerosos estudios que indican que este tipo de protocolo origina un gran número de hembras con sintomatología de celo, así como un adelanto en la aparición de los mismos y mayor porcentaje de hembras que ovulan después de haber sido tratadas en la fase luteal temprana (Acritopoulou y Haresign, 1980; Deaver et al., 1986). Este protocolo puede utilizarse desde el día 4 del ciclo estral, cuando el cuerpo lúteo de los pequeños rumiantes ya es sensible a la $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Rubianes et al., 2003).

Tratar a las hembras en la fase luteal temprana favorece la maduración de los folículos y la sincronización del pico preovulatorio de LH y la ovulación, además de adelantar la vuelta a la normalidad de los pulsos de LH, debido a la presencia de un cuerpo lúteo más joven que secreta menos cantidades de progesterona (Deaver et al., 1986). Reducir el periodo en que los animales muestran celos y ovulaciones, supone una

ventaja a la hora de poner en marcha protocolos de inseminación artificial a tiempo fijo (Menchaca y Rubianes, 2004).

La variabilidad del momento de la ovulación se puede reducir aún más aplicando el “efecto macho” en el momento de la segunda administración de $\text{PGF}_{2\alpha}$, ya que la presencia de los machos incrementa la secreción de LH (Abecia et al., 2012).

Una de las ventajas desde el punto de vista sanitario del uso de prostaglandinas es que los residuos químicos que deja esta hormona son mínimos ya que se metaboliza rápidamente y casi en su totalidad por los pulmones (Light et al., 1994).

5.4.5.- MELATONINA

La melatonina es una indolamina segregada por la glándula pineal y fue descubierta por Lerner et al. (1960). La glándula pineal ejerce su función como transductor endocrino, transformando las señales luminosas del ritmo circadiano noche/día en una secreción endocrina que se corresponde con la síntesis y liberación de melatonina exclusivamente durante la noche. Los cambios estacionales del fotoperiodo se traducen también en variaciones de la amplitud de secreción de melatonina, lo que dio comienzo a su utilización como método de control del ciclo reproductivo, en las especies de animales y latitudes geográficas de marcada estacionalidad reproductiva (Arendt et al., 1983).

Su secreción se caracteriza por actuar como un transductor de la señal noche/día del ritmo circadiano, con altas concentraciones plasmáticas durante la fase oscura del día, estando inhibida su síntesis durante el período de luz (Delgadillo y Chemineau, 1992). El perfil de secreción en el caso de la especie caprina y ovina es diferente a otros mamíferos, ya que se inicia rápidamente después del comienzo de la oscuridad (menos de diez minutos) y posteriormente permanecen elevados durante el resto de la noche (Malpoux et al., 1988).

En climas templados con variaciones estacionales de la duración del día y noche, la secreción de melatonina incrementa la amplitud de su secreción nocturna desde el solsticio de verano hasta el solsticio de invierno, alcanzando el máximo durante los días

más cortos del año, siendo así también el transductor de la señal fotoperiódica del ritmo circanual (Delgadillo et al., 1991; Zarazaga et al., 2009a).

En los reproductores de días cortos como es el caso de los ovinos y caprinos, la administración de melatonina se ha empleado para estimular la actividad reproductiva cíclica durante el periodo de anestro estacional (Arendt et al., 1983; Chemineau et al., 1996). A partir de su síntesis (Lerner et al., 1960) la administración de melatonina en forma de implantes subcutáneos (Zarazaga et al., 2012) ha sido utilizada en ganado caprino, con el objetivo de mejorar los resultados de fertilidad en las cubriciones de primavera (Zarazaga et al., 2009).

La melatonina se sintetiza a partir del triptófano en los pinealocitos. Al contrario de lo que sucede con otras hormonas, la melatonina no es almacenada en vesículas antes de su liberación (Reiter, 1981). La melatonina actúa a diferentes niveles del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal. El efecto más importante es la modificación de la liberación de GnRH desde el hipotálamo, lo que conlleva una modificación en la liberación de LH y de la actividad de las gónadas.

Una vez que la melatonina ha sido sintetizada, es liberada directamente a la circulación general y alcanza sus puntos de acción a nivel del SNC mediante dos vías: una gran vía vascular que fluye desde la glándula pineal a la vena de Galieno, venas yugulares y mediante las arterias carótidas es transportada al cerebro, y otra directa al líquido cefalorraquídeo en los ventrículos cerebrales. La melatonina actúa en el hipotálamo mediobasal para modular la pulsatilidad de la secreción de GnRH. Esto fue demostrado en oveja, donde microimplantes de melatonina en el hipotálamo aplicados en animales en condiciones de inhibición de la actividad reproductiva, lograron estimular la actividad gonadotrópica (Malpaux et al., 1993). Sin embargo, se han localizado receptores a la melatonina en otras estructuras como las proximidades de la *pars tuberalis* y *distalis* de la hipófisis (Bittman, 1983; Malpaux et al., 1997).

A nivel del sistema nervioso central, el punto final de la acción de la melatonina es la modificación de la secreción pulsátil de GnRH. Los cuerpos celulares de estas neuronas están localizados en el área preóptica (Caldani et al., 1995). Estas neuronas se proyectan a la eminencia media para liberar la GnRH en el sistema porta hipofisario. La

ausencia de receptores a la melatonina y de acción de los microimplantes de melatonina en la región preóptica sugiere que la acción de la melatonina sobre las neuronas que secretan la GnRH es indirecta y pone en juego una serie de interneuronas (Malpaux et al., 1999).

Los primeros trabajos para la utilización de la melatonina exógena en el control de la actividad reproductiva fueron realizados en la oveja e intentaban determinar la eficacia de la vía de administración. La administración diaria de la hormona se mostró como un requisito imprescindible para la estimulación de la actividad reproductiva. Así, se investigó la administración por vía oral o mediante dispositivos intravaginales (Nowak y Rodway, 1985), inyecciones diarias (Kumar y Purohit, 2009) e incluso bolos solubles intrarruminales (Poulton et al., 1987), pero la inserción de implantes subcutáneos se mostró como la vía más eficaz para su aplicación en caprino (Chemineau et al., 1988), ya que garantiza una liberación continua y requiere de muy poca intervención.

En conjunto, parece que la administración diaria de melatonina o la utilización de otras vías que aseguren una liberación continua de la hormona son requisitos esenciales para conseguir un comienzo precoz de la actividad ovulatoria. Ronayne et al. (1989) observaron que las ovejas que recibían melatonina vía oral una o tres veces por semana reanudaron su actividad sexual a la vez que ovejas no tratadas, mientras que aquellas con una administración diaria o a través de un implante subcutáneo reanudaron su actividad ovulatoria un mes antes.

Los implantes subcutáneos contienen 18 mg de melatonina y permiten mantener unas concentraciones de esta hormona de 100-300 pg/ml durante al menos unas 10 semanas en caprino (Delgadillo et al., 2001). Estos implantes proporcionan una liberación continua de la hormona, elevan tanto los niveles basales de melatonina en plasma durante el día, como los de la secreción endógena característica de la noche (Lincoln y Ebling, 1985; Nowak et al., 1990).

El protocolo de aplicación de los implantes de melatonina conlleva la colocación de tres implantes subcutáneos colocados en la base de la oreja a los machos cabríos y de un solo implante de las mismas características a las cabras, al mismo tiempo que ambos

sexos son separados para evitar cualquier contacto visual, olfativo o auditivo. La separación de machos y hembras debe ser de, al menos, 45 días, momento en el que ambos sexos pueden permanecer juntos e iniciar las cubriciones (Gatica et al., 2012).

Otro punto clave para obtener buenos resultados en cuanto a la utilización de este tratamiento es el momento óptimo para iniciarlo. Para asegurar la eficacia del tratamiento con melatonina, los animales deben haber experimentado un número suficiente de días largos (Nowak y Rodway, 1985). Cuando se trabaja con razas procedentes de latitudes altas ($>40^\circ$), donde el anestro estacional es muy profundo y el tratamiento solo es eficaz para adelantar la estación sexual, se inicia el tratamiento en torno al solsticio de verano, obteniéndose en general buenos resultados, tanto en adelanto de la estación sexual como en lo que a mejora de tasa de ovulación y prolificidad se refiere (Chemineau et al., 1986b; 1988; 1992b; 1996).

En el área mediterránea en latitudes próximas a subtropicales, el efecto estacional es menos marcado y los tratamientos se pueden hacer en pleno anestro. En algunas razas españolas la máxima efectividad se ha conseguido cuando los implantes son colocados en torno al equinoccio de primavera (Zarazaga et al., 2009; Chemineau et al., 1996). No obstante, en ovejas, se ha demostrado que la colocación de implantes de melatonina inmediatamente después del solsticio de invierno, puede avanzar el periodo de actividad reproductiva en ausencia de machos y mejorar los resultados reproductivos (Forcada *et al.*, 2002). Igualmente, también se ha observado una elevada efectividad de la colocación de implantes de melatonina en cabras en el solsticio de invierno, independientemente de que fueran sometidas o no a efecto macho (Zarazaga et al., resultados no publicados).

5.5.- USO DEL EFECTO MACHO PARA LA INDUCCIÓN DE LA OVULACIÓN

Las interacciones sociales entre individuos de la misma especie pueden modificar su estado reproductivo (Bronson, 1985). En caprinos silvestres, los machos permanecen apartados de las hembras la mayor parte del año, para juntarse únicamente con los grupos matriarcales en la estación reproductiva (Santiago-Moreno et al., 2006). Las cabras domésticas durante el periodo de anestro no desarrollan ciclos estrales ovulatorios, pero su exposición a los machos puede estimular inmediatamente cambios en la secreción pulsátil de GnRH y a su vez de la secreción de LH, seguida por la ovulación y el establecimiento de ciclos estrales.

El primer autor que describió este fenómeno en cabras de raza Angora fue Shelton (1960), cuando observó cómo al introducir los machos en un grupo de hembras, previamente aisladas de estos, adelantaban el inicio de la estación reproductiva con la instauración de ciclos ovulatorios fértiles, cuando el estímulo se realizaba en el periodo de transición, próximo al inicio de la estación reproductiva. Este fenómeno de estimulación sexual o bioestimulación, se conoce como “efecto macho” (Walkden-Brown et al., 1999; Chemineau et al., 2006). La respuesta de las cabras a este efecto depende de múltiples factores tanto endógenos como exógenos que operan en ambos sexos (Delgadillo et al., 2009).

5.5.1.- RESPUESTA ENDOCRINA

El anestro estacional está asociado con una reducción en la pulsatilidad de la GnRH y la LH comparada con el periodo de actividad reproductiva. Esta disminución en la frecuencia de pulsos de LH se debe a dos mecanismos inhibitorios: (1) un incremento del efecto de retroalimentación negativa (feed-back negativo) del estradiol sobre el hipotálamo; y (2) un efecto directo del fotoperiodo sobre el sistema de control hipotálamo-hipofisario que regula la secreción de LH (Fig.9) (Ungerfeld, 2007).

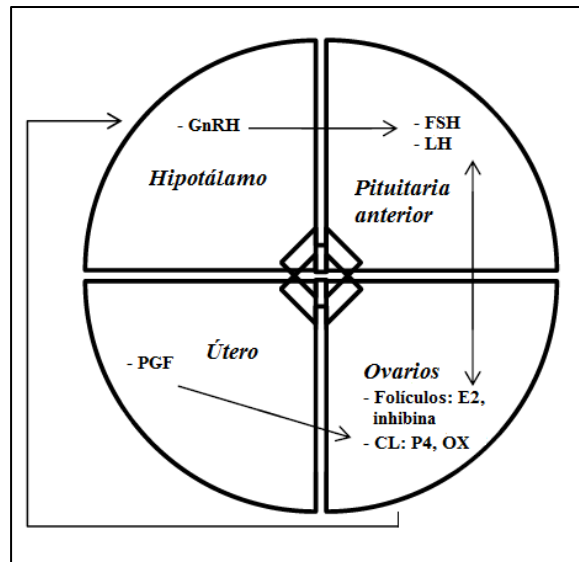


Fig.9. Representación esquemática de la interacción entre hormonas implicadas en los procesos reproductivos y secretadas desde el hipotálamo, adenohipófisis, ovarios y útero. Adaptado de Rantala, MH (2015)

La introducción del macho desencadena de forma inmediata en las hembras un conjunto de cambios endocrinos, comenzando por un rápido aumento en la frecuencia de pulsos de LH. El tiempo transcurrido desde la introducción de los machos hasta el primer incremento plasmático de LH es muy corto, cerca de 20 minutos en cabras (Chemineau et al., 1987). Este incremento estimula el desarrollo folicular, originando un aumento plasmático de estradiol 17β que por feed-back positivo estimulará la descarga fásica preovulatoria de LH y la ovulación entre las 48 y 72 horas después de la primera exposición (Ungerfeld, 2007). El porcentaje de hembras que ovulan en respuesta a este estímulo es generalmente alto durante todo el periodo de anestro en razas mediterráneas (>85%), mientras que en razas más estacionales estos porcentajes sólo se alcanzan durante el mes o mes y medio antes del comienzo de la estación reproductiva (Chemineau et al., 2006). La secreción de LH pasa de 0,3 pulsos cada tres horas antes de la introducción de los machos, a una frecuencia de 2,2 pulsos cada hora, promoviendo de esta manera el crecimiento folicular. La amplitud de los pulsos también se ve afectada, pasando de 0,5 ng/ml antes de la entrada del macho a 1,7 ng/ml después del primer contacto (Fig.10) (Chemineau et al., 1986b y c).

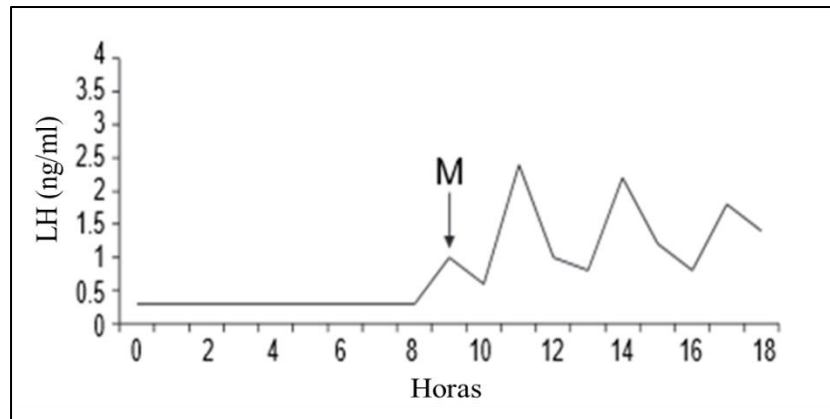


Fig.10. Concentraciones plasmáticas de LH con relación al momento de la introducción de los machos (M) en cabras domésticas. Las muestras de sangre para determinación de LH se recogieron cada 20 minutos durante 6 horas. Adaptado de Chemineau et al., 1986b

Los cambios en la secreción pulsátil de LH culminan con la descarga preovulatoria y la ovulación en prácticamente la totalidad de las hembras dentro de los primeros tres días posteriores a la introducción de los machos (Chemineau, 1983; Chemineau et al., 1986b). La primera ovulación inducida se asocia con sintomatología de celo sólo en aproximadamente un 20% de las hembras, dicha ovulación, con o sin sintomatología de celo, es seguida de un ciclo corto de cuatro-cinco días de duración en la mayoría de los animales que responden (Chemineau, 1987). El ciclo corto se caracteriza por una secreción baja y un incremento transitorio de progesterona por parte del cuerpo lúteo generado (Ott et al., 1980; Chemineau et al., 1984). Este cuerpo lúteo también presenta una luteolisis temprana, apareciendo una segunda ovulación, alrededor de ocho días después de la introducción de los machos (Fig.11) (Chemineau et al., 1984). En esta segunda ovulación, el folículo ovulatorio es suficientemente maduro y su secreción de estradiol implica la sintomatología de celo en estas hembras, así como la formación de un cuerpo lúteo de buena calidad, que permite el desarrollo de un ciclo de duración normal de 21 días y secreción normal de progesterona.

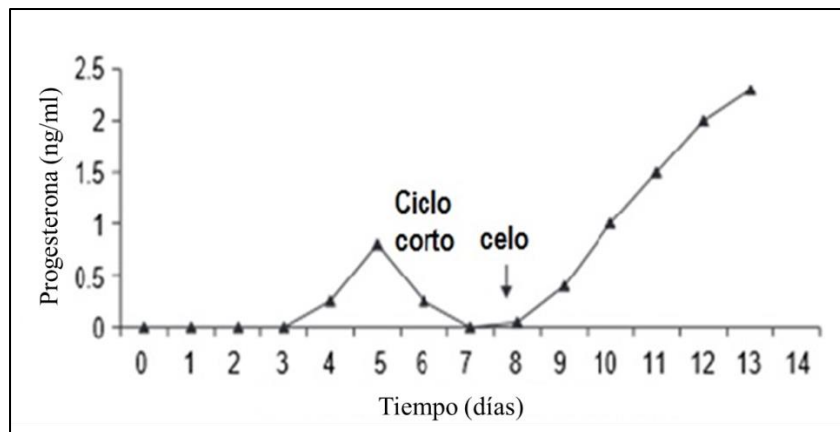


Fig.11. Niveles plasmáticos de progesterona en cabras expuestas a la presencia del macho. Se puede identificar la ocurrencia de ciclos cortos con una duración, 4-5 días, después de la primera ovulación inducida. Adaptado de Chemineau et al., 1984

5.5.2.- RESPUESTA OVÁRICA

Las concentraciones plasmáticas de progesterona liberada por un cuerpo lúteo procedente de un ciclo de duración normal, son superiores a las que alcanza el primer cuerpo lúteo de corta duración inducido por la presencia de los machos (Chemineau et al., 1984). Esta diferencia en la concentración de progesterona probablemente se deba a que el cuerpo lúteo procedente de un ciclo corto sea distinto en estructura y función a uno procedente de un ciclo normal (Chemineau et al., 2006).

Las grandes células luteales procedentes de la granulosa, son las responsables de la secreción de la mayor parte de la progesterona y oxitocina, mientras que las pequeñas células luteales procedentes de la teca interna, no aportan gran cantidad de progesterona al plasma (Stouffer et al., 1976; O'Shea et al., 1984). Una respuesta pobre a la pulsatilidad de LH durante la maduración final de los folículos en anestro, puede generar una inadecuada función luteal y las subsiguientes diferencias en la evolución de las células luteales (Hunter et al., 1986).

En cabras, durante la fase luteal temprana del ciclo, entre los días 3 y 9, la LH se libera de forma pulsátil, con una frecuencia estrechamente asociada a las concentraciones plasmáticas de progesterona de origen luteal (Sutherland, 1987a). Estos bajos niveles plasmáticos de progesterona pueden ser los responsables de un

insuficiente feed-back negativo a nivel central, permitiendo de esta manera aumentar la frecuencia de pulsos y la secreción de LH (Chemineau et al., 2006).

Al final de un ciclo normal, la $\text{PGF}_{2\alpha}$ secretada por las células endometriales inducen la luteolisis y comienza un nuevo ciclo. Esta secreción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ está controlada a su vez por el estradiol 17β procedente del ovario, liberado en la nueva onda folicular. Los mismos mecanismos se suceden en los ciclos cortos con la excepción de que el inicio de la luteolisis es mucho más temprano. La nueva onda folicular después de la introducción de los machos aparece en los días 3-4, justo cuando el CL recién formado se hace sensible a la $\text{PGF}_{2\alpha}$. Las ondas foliculares en cabras emergen cada 5-7 días y van asociadas a la secreción de estradiol (Medan et al., 2005). Probablemente el primer pico de E2 sobre los días 3-4 sea el responsable de la luteolisis temprana de los CL de corta duración.

Un ciclo corto es el resultado de una luteolisis temprana del cuerpo lúteo, debido a una secreción precoz de $\text{PGF}_{2\alpha}$, por la aparición anticipada de receptores para oxitocina en el endometrio (Peter et al., 1989; Zarco et al., 1988). La $\text{PGF}_{2\alpha}$ se secreta en respuesta a la unión de la oxitocina a sus receptores uterinos. La progesterona inhibe la formación de receptores para estradiol en el endometrio, y el estradiol estimula la síntesis de receptores para oxitocina (Beard et al., 1994). Durante un ciclo normal, la progesterona ejerce un efecto inhibitorio sobre la secreción de $\text{PGF}_{2\alpha}$, debido a que inhibe la formación de receptores para estradiol en el endometrio, y por lo tanto el estradiol no puede estimular la síntesis de receptores a oxitocina (McCracken et al., 1984). Si el útero no ha sido expuesto suficientemente a la progesterona, secretará prematuramente $\text{PGF}_{2\alpha}$. Las bajas concentraciones de P4 que aparecen en los ciclos cortos, suponen deficiencias en la acción sobre sus receptores y no puede bloquear de forma efectiva la síntesis de receptores para estradiol (Ginther, 1971), permitiendo el estímulo de la oxitocina, y la secreción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ en forma de grandes pulsos, lo que culminará en la lisis del cuerpo lúteo.

Un tratamiento con progesterona en el momento de la introducción de los machos actúa rápidamente reduciendo la secreción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ por parte del útero, y posiblemente también la concentración plasmática de oxitocina de origen ovárico, reforzando de esta manera la hipótesis de un efecto local de la P4 a nivel uterino, más

que un efecto central para retrasar la descarga preovulatoria de LH (Chemineau et al., 2006).

En el artículo de Chemineau et al. (2006) aparece la secuencia de los mecanismos que generan la aparición de cuerpos lúteos de corta duración después de la introducción de los machos en periodo de anestro estacional (Fig. 12):

- (1) Los folículos inducidos a ovular son de pobre calidad porque no han podido permanecer bajo una actividad gonadotrópica mantenida en el tiempo durante el periodo de anestro. Estos folículos presentan células de la granulosa de poca calidad comparados con los folículos que se desarrollan durante la estación reproductiva.
- (2) Los cuerpos lúteos procedentes de esos folículos tienen un desarrollo anormal, presentan una proporción insuficiente de grandes células luteales procedentes de la granulosa, esto hace que se secrete poca cantidad de progesterona. Estas bajas concentraciones de P4 se reflejan tanto en el plasma de la vena ovárica como en la circulación general.
- (3) Los mecanismos de contracorriente que actúan localmente, amplifican la diferencia de concentración de P4 en las arterias uterina y ovárica.
- (4) Debido a esa concentración insuficiente de P4 que alcanza el ovario y el útero, la cascada de eventos responsable de la liberación de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ y la oxitocina es más sensible a los estrógenos.
- (5) La concentración plasmática de P4 en la circulación sistémica es insuficiente para bloquear la actividad gonadotrópica entre los días 3 y 5 después del pico de LH.
- (6) La nueva onda folicular iniciada en los días 3-4 del primer ciclo inducido por el macho continua creciendo y secretando estrógenos. El cuerpo lúteo inicia entonces su respuesta a las prostaglandinas.
- (7) Estos estrógenos estimulan la secreción de prostaglandinas en el útero y la liberación de oxitocina desde el cuerpo lúteo, causando finalmente la luteolisis temprana del mismo.

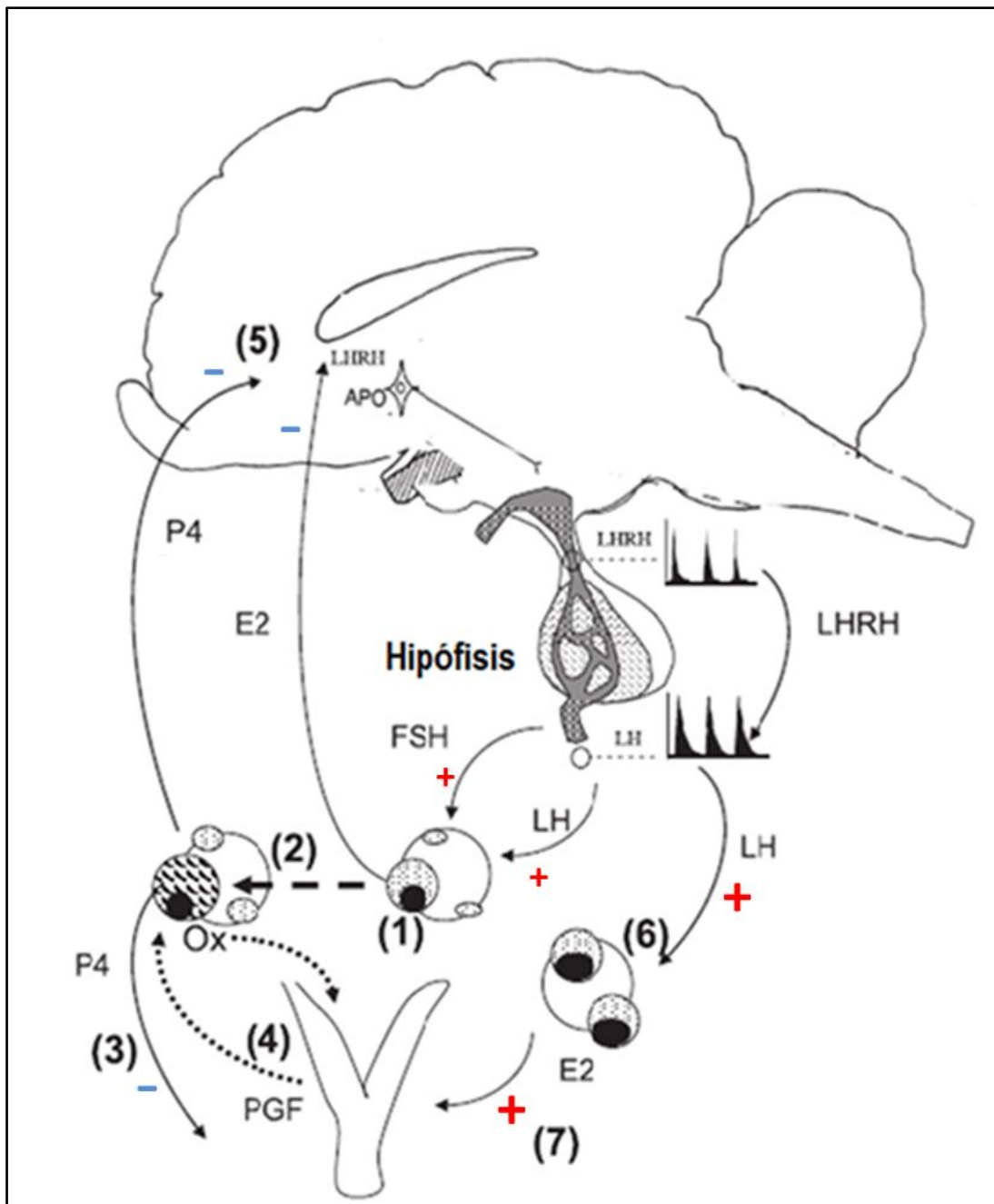


Fig.12. Hipótesis sobre los mecanismos que controlan la vida media del cuerpo lúteo inducido por el macho en cabras: (1) baja calidad de las células de la granulosa en los folículos durante el anestro en el D0, (2) baja proporción entre grandes/pequeñas células luteales en el cuerpo lúteo inducido a D5, (3) mecanismos de contracorriente que actúan localmente amplificando la diferencia de concentración de P4 en la arteria uterina y ovárica, (4) alta sensibilidad de la cascada de eventos responsable de la liberación de la PGF y la oxitocina a los estrógenos, (5) la concentración plasmática de P4 en la circulación sistémica es insuficiente para bloquear a nivel central la pulsatilidad de la LH, (6) la alta pulsatilidad de la LH estimula el crecimiento de la nueva onda folicular que empezó el D0, (7) los estrógenos estimulan la secreción de prostaglandinas uterinas y la liberación de oxitocina desde el cuerpo lúteo, causando finalmente la luteolisis temprana del mismo. Adaptado de Chemineau et al., 2006

5.5.3.- FUNDAMENTOS DE LA RESPUESTA

El efecto macho es un fenómeno multisensorial que involucra el olfato, la vista, el tacto y el oído (Claus et al., 1990) y la respuesta de las hembras depende de las señales emitidas por los machos. La máxima respuesta se obtiene cuando todas las señales están presentes, es decir, cuando el macho mantiene un contacto directo con las hembras (Shelton, 1980).

Está demostrado que el efecto macho se desencadena principalmente vía feromonas, secretadas por glándulas sebáceas en la piel, folículos pilosos de la zona parietal de la cabeza y en la orina del macho (Rekwot et al., 2001). Las feromonas son mensajeros químicos capaces de regular aspectos de la fisiología reproductiva y el comportamiento (Keller et al., 2012), y estas sustancias alcanzan el sistema nervioso central de la hembra a través del sistema olfatorio. En el macho cabrío, el componente mayoritario presente en el pelo, responsable del olor, es el ácido 4-etiloctanoico (Sugiyama et al., 1981), pero éste no es el responsable del desencadenamiento en las hembras de su respuesta en términos de pulsatilidad de la LH (Claus et al., 1990). Iwata et al., en un estudio realizado en 2003, sugirieron que la sustancia con mayor actividad como feromona en el macho cabrío era una molécula derivada del ácido 4-etiloctanoico.

En la mayoría de los mamíferos, al menos existen dos sistemas olfatorios capaces de detectar señales químicas como las feromonas, el sistema olfatorio principal y el accesorio (o vomeronasal) (Keller et al., 2012). Estos dos sistemas llevan a cabo, al menos parcialmente, los procesos de reconocimiento del macho, pero difieren tanto en anatomía como en función, poseen sus propios receptores sensitivos y diferentes proyecciones al sistema nervioso central (Gelez y Fabre-Nys, 2004).

El sistema olfatorio accesorio se conecta esencialmente con estructuras hipotalámicas: los axones de los neurorreceptores del órgano vomeronasal se proyectan en el bulbo olfatorio accesorio, que a su vez envía sus proyecciones hacia la amígdala medial, la cual tiene conexiones directas con los núcleos hipotalámicos ventromediales y el área preóptica (Jansen et al., 1998).

Al contrario que el sistema accesorio, el sistema olfatorio principal está conectado directamente con varias áreas corticales: el bulbo olfatorio principal se proyecta sobre la amígdala cortical y la corteza piriforme, las cuales conectan vía tálamo con las cortezas orbitofrontal e insular, así como con la corteza entorrinal y el hipocampo (Jansen et al., 1998). De acuerdo con la disposición anatómica de los dos sistemas, así como sus diferencias funcionales, normalmente se ha pensado que el sistema olfatorio principal detectaba sustancias volátiles mientras que el vomeronasal era sensible a las no volátiles. Estudios recientes han puesto de manifiesto que tales diferencias no son tan claras (Leinders-Zufall et al., 2000). La información procedente de ambos sistemas olfatorios converge a nivel de la amígdala antes de alcanzar regiones hipotalámicas, como son los receptores del núcleo arqueado, provocando cambios a nivel hipotalámico (Murata et al., 2011).

No está bien definido a qué nivel las feromonas son capaces de activar el eje gonadotrópico pero se sabe que las células del hipotálamo secretoras de GnRH, son un tejido diana para esta señalización. Estas neuronas reciben estímulos directos o indirectos desde los dos sistemas olfatorios, y a su vez afectan al control de la secreción de LH (Boehm et al., 2005; Yoon et al., 2005). En cabras se ha demostrado mediante diferentes métodos que el olor del macho produce la activación de las neuronas GnRH, ya sea a través de cuantificación por inmunoreactividad de la expresión de la proteína Fos en el área preóptica o por activación electrofisiológica (Gelez y Fabre-Nys, 2006).

La respuesta al efecto macho, sin embargo, no es consecuencia únicamente de una señalización química, existen otros factores que hacen a la hembra poder reconocer al macho, como las vocalizaciones o incluso señales visuales (Delgadillo et al., 2009). La realización de una bulbectomía no impide el incremento de la LH en presencia del macho (Cohen-Tanoudji et al., 1986), Gelez y Fabre-Nys (2004) demostraron que cuando el macho está presente, la destrucción del epitelio olfatorio o la inactivación de la amígdala cortical, no interrumpe totalmente el incremento de la LH. Todos estos estudios vendrían a demostrar las características del efecto macho como fenómeno multisensorial.

5.5.4.- FACTORES QUE AFECTAN A LA RESPUESTA

El efecto macho es un fenómeno que involucra en la hembra a múltiples sentidos como son el olfato, la vista, el tacto y el oído (Shelton, 1980). La respuesta por parte de la hembra va a depender de la calidad del estímulo que otorga el macho (Walkden-Brown et al., 1999; Delgadillo et al., 2006). Se considera que el estímulo adquiere mayor intensidad cuando se permite un grado de contacto más alto entre hembras y machos, lo que logra su máximo cuando existe un contacto físico total (Álvarez y Zarco, 2001), pero la calidad del estímulo depende también de la actividad sexual del macho, lo que implicaría la situación de “machos activos”.

Durante el periodo de reposo sexual de los machos, la secreción de LH y testosterona es baja, en consecuencia, el olor de los machos y el comportamiento sexual, dependientes de la testosterona, son bajos o ausentes en la mayoría de los individuos (Delgadillo et al., 1999; Walkden- Brown et al., 1994). Las posibilidades del uso del efecto macho durante el periodo de reposo (anestro estacional para las hembras) dependen de la raza y la latitud geográfica. En situaciones de anestro profundo, el uso del efecto macho pasa por la estimulación previa de la actividad sexual de los machos en este periodo, mejorando la calidad de las señales y en consecuencia, incrementando la respuesta de las hembras. En machos con muy baja actividad sexual es posible mejorar su capacidad de estímulo durante el periodo de anestro estacional, mediante tratamientos fotoperiodicos (Flores et al., 2000; Rivas-Muñoz et al., 2007).

Algunos aspectos a tener en cuenta en la eficacia del efecto macho son:

1. Intensidad de la libido y señales olfativas

Varios estudios han demostrado que la intensidad del comportamiento sexual de los machos es un factor determinante en la respuesta de las hembras expuestas al efecto macho. Los machos castrados pierden la capacidad para estimular la actividad sexual en las hembras, lo que demuestra que el proceso es dependiente de los andrógenos. Iwata et al. (2000), demostraron que los machos con mayor nivel de secreción de testosterona desencadenan una respuesta mayor en las hembras, así como aquellos que expresan una intensa libido, inducen la ovulación en un mayor porcentaje de hembras que aquellos con nivel de libido más débil (Flores et al., 2000). En cabras, el olor del macho estimula la secreción de LH sin embargo, el porcentaje de hembras que ovulan al ser expuestas al

olor de los machos, es menor que el obtenido en hembras en contacto directo con ellos (Claus et al., 1990; Walkden-Brown et al., 1993a). En estos estudios no se ha determinado claramente el papel que corresponde al comportamiento sexual y al olor, esto se debe, muy probablemente, a que es difícil separar los efectos de ambos estímulos, los cuales pueden actuar sinérgicamente para estimular la actividad sexual de las hembras.

Existen estímulos no olfativos que también se encuentran implicados en la respuesta de las hembras al efecto macho. Chemineau et al. (1986c) demostraron que existía algún otro estímulo capaz de sustituir el efecto de las feromonas de los machos, ya que hembras anósmicas respondían de igual manera a la presencia de los machos, con un aumento en la secreción de LH.

2. Importancia de las vocalizaciones de los machos

Delgadillo et al. (2008) sugieren que las vocalizaciones de los machos cabríos estimulan el estro de las cabras en anestro. Vielma et al. (2005) demostraron que en aquellas hembras en anestro a las que se les impidió el contacto directo con machos sexualmente activos o el estímulo auditivo de las vocalizaciones de los mismos (directamente emitidas por los machos o por grabaciones), no llegaron a ovular ni a experimentar comportamiento de estro. En conjunto los datos recogidos en este estudio demuestran que la calidad de las señales emitidas por el macho es determinante en la respuesta de las cabras sometidas al efecto macho.

3. Estación del año, latitud y raza

Uno de los factores que más limitan la respuesta al efecto macho es la estación del año, y está a su vez relacionada directamente con la profundidad del anestro y por tanto a la receptividad de las hembras que permita su capacidad de respuesta a este estímulo. En las hembras de razas que manifiestan una estacionalidad reproductiva muy marcada, la respuesta al efecto macho varía en los diferentes meses del anestro estacional. Si el efecto macho se realiza en pleno anestro estacional la respuesta puede ser baja o nula (Flores et al., 2000; Delgadillo et al., 2009), y si se realiza al final del anestro, en el periodo previo al reinicio de la actividad reproductiva, periodo de

transición, la respuesta mejora (Ott et al., 1980; Restall, 1992), aunque sólo se pueda adelantar la estación reproductiva unas semanas (Chemineau, 1987).

Sin embargo, existen razas que muestran una estacionalidad reproductiva moderada, como la Murciano-Granadina o la Criolla de Guadalupe, que pueden responder a este estímulo en pleno periodo de anestro (Diaz Delfa et al., 2002; Chemineau, 1983). La latitud suele ser la variable más utilizada para identificar la profundidad del anestro. En latitudes templadas de los hemisferios norte y sur ($>40^\circ$), todas las razas caprinas presentan una marcada estacionalidad de su actividad sexual (Chemineau et al., 1992a), en cambio, otras razas caprinas locales o adaptadas a las latitudes subtropicales ($23^\circ-40^\circ$) muestran una estacionalidad menos marcada (Walkden-Brown y Restall, 1996).

La eficacia del efecto macho implica la presencia de machos activos, siendo ésta una situación que se alcanza cuando confluyen de forma favorable distintos factores como la estación del año, la latitud y la raza, lo cual se traduce en un incremento del volumen testicular, mayor libido e incremento de la secreción de testosterona (Lincoln y Short, 1980; Delgadillo et al., 2006), siendo ésta la limitante para la inducción de ciclos estrales en cabras en anestro. Delgadillo et al., 2008 demostraron que machos cabríos sexualmente activos permiten estimular la actividad sexual incluso en razas de cabras muy estacionales en los meses del anestro estacional.

El éxito del efecto macho en genotipos muy estacionales se puede ver mejorado con tratamientos de melatonina o tratamientos fotoperiódicos, en un intento por “desestacionalizar” a los animales antes de permitir el contacto entre ambos sexos.

La manipulación artificial del fotoperiodo es el modo más sencillo de sincronizar el ritmo endógeno reproductivo, induciendo la receptividad por parte de las hembras y la efectividad por parte del macho (Chemineau et al., 1992b). Para conseguir este objetivo se debe someter a los animales a una secuencia de luz artificial simulando días largos, seguidos de otra secuencia de días cortos. Estos tratamientos lumínicos pueden ser también sustituidos en la práctica con la aplicación de implantes de melatonina simulando el inicio de los días cortos en la estación sexual.

4. Duración del contacto entre machos y hembras

La duración del contacto entre los dos sexos influye en la secreción de LH y en la ovulación de las hembras expuestas al efecto macho. En cabras, el 19% de las hembras ovula al estar en contacto con los machos 16 horas al día durante 10 días, mientras que el 95% lo hace al estar en contacto continuo con los machos (Walkden-Brown *et al.*, 1993b). Estos resultados sugieren que es necesaria la presencia continua de los machos para obtener una alta respuesta de las hembras expuestas al efecto macho. Sin embargo, recientemente Delgadillo *et al.* (2008) demostraron que la presencia continua de los machos, descrita anteriormente, no es necesaria para estimular el estro en la mayoría de las cabras en anestro si se utilizan machos sexualmente activos; de forma que sólo 4 horas de contacto entre los machos y las hembras son suficientes para obtener una adecuada respuesta al efecto macho (Bedos *et al.*, 2010).

5. Separación previa (aislamiento) entre machos y hembras, ratio macho:hembras

La separación previa entre los dos sexos durante un periodo mínimo de tres semanas, ha sido considerada, al menos en ganado ovino, un factor indispensable para estimular la secreción de LH y la ovulación de las hembras expuestas al efecto macho (Schinckel, 1954; Underwood *et al.*, 1944). Sin embargo, posteriormente en cabras se demostró que esta separación puede, en algunos casos, no ser necesariamente tan prolongada si se utilizan machos sexualmente activos, y la respuesta es todavía mejor si los machos que se introducen son nuevos, es decir, no conocidos previamente por las hembras o alternando distintos machos diariamente evitando la presencia continua de los mismos machos (Delgadillo *et al.*, 2008).

Otra práctica de manejo considerada esencial para el buen funcionamiento del efecto macho es aplicar una ratio macho:hembra adecuada. Aunque un número elevado de hembras ovulan después de la introducción de los machos, un incremento del número de machos de 6 a 29 por cada 100 cabras, aumentó la tasa de ovulación de $1,8 \pm 1,3$ a $2,6 \pm 0,6$ (Chemineau *et al.*, 1987), en la práctica la relación 1:10 se considera la más adecuada.

6. Experiencia sexual de los machos

Otro factor a tener en cuenta es la experiencia sexual de los machos, si éstos han sido privados desde el destete del contacto con las hembras el comportamiento sexual es menos intenso y por lo tanto menos eficiente para estimular a las hembras (Ungerfeld, 2008). Sin embargo, la inexperiencia sexual de los machos no disminuye la respuesta de las hembras sometidas al efecto macho si estos son sexualmente activos.

7. Número de partos o edad de las hembras

La respuesta ovulatoria y el establecimiento de ciclos estrales en las cabras nulíparas es menor que el de las multíparas al ser expuestas al efecto macho (Walkden-Brown et al., 1993b; Mellado et al., 2000). Esta diferencia parece que no se debe a una deficiente secreción hormonal, ya que la secreción de LH no difiere entre hembras nulíparas y multíparas al ser sometidas al efecto macho (Luna-Orozco et al., 2008). Más bien, esta diferencia puede deberse a un desconocimiento del olor del macho en las hembras sin experiencia sexual, o a las características de su comportamiento sexual, en efecto, el comportamiento proceptivo y receptivo de las hembras nulíparas es menor que el de las multíparas en el primer contacto con los machos. En consecuencia, las hembras nulíparas requieren más montas por eyaculación (Luna-Orozco et al., 2008), y el comportamiento sexual de los machos, puede entonces, ser un factor determinante en la respuesta de las hembras nulíparas expuestas al efecto macho.

5.5.5.- SINCRONIZACIÓN DE LA OVULACIÓN INDUCIDA CON EL EFECTO MACHO

5.5.5.1.- Uso y efecto de la progesterona y progestágenos

Una de las características de la primera ovulación inducida por la introducción de los machos es la formación de un cuerpo lúteo de escasa secreción de progesterona y duración menor de lo normal, lo que supone la presencia de un primer ciclo corto sin manifestaciones de celo en la mayoría de los casos. Después de este primer ciclo de 4-5

días de duración el primer celo aparece entre los días 7-9 después de la introducción de los machos (Ott et al., 1980; Chemineau, 1983).

La eliminación de ciclos cortos y por tanto la posibilidad de conseguir celos tempranos, fértiles y sincronizados, ha pasado básicamente por la utilización del tratamiento combinado con progesterona o progestágenos previamente o en el momento de la introducción de los machos. El objetivo básico de estos tratamientos combinando efecto macho con progesterona o sus análogos es sincronizar la primera ovulación y de esta manera generar un ciclo normal después del primer contacto de machos y hembras, y por tanto mejorar la fertilidad de la primera ovulación inducida. Este tipo de tratamientos mejora la sincronización de la ovulación inducida pero no incrementa la capacidad de respuesta por parte de las hembras al estímulo procedente del macho (Mellado et al., 2000).

Los primeros experimentos que se realizaron para intentar suprimir los ciclos cortos inducidos por el efecto macho, fueron de dos tipos: tratamientos de larga duración consistentes en la aplicación de una esponja intravaginal impregnada con FGA (45 mg) durante 17 días, o tratamientos de corta duración que consistían en la administración de una única dosis intramuscular de FGA (5,2 mg en 13 ml de aceite de sésamo) (Chemineau et al., 1985). Ambos tratamientos provocan un retraso de unas 20 horas tanto de la descarga preovulatoria de LH como de la subsiguiente ovulación después de la introducción de los machos, además de suprimir totalmente los cuerpos lúteos de corta duración y alcanzar una mejor sincronización de los celos en un solo periodo (Chemineau et al., 2006).

Estos experimentos apoyan la hipótesis de que la existencia de los cuerpos lúteos de corta duración, se debe a una maduración insuficiente de los folículos antes de esa primera ovulación inducida. Ambos tratamientos consiguen un periodo más dilatado de pulsatilidad de la LH a alta frecuencia, un mayor desarrollo y maduración folicular, consiguiendo alta actividad estrogénica. Estos folículos son capaces de generar cuerpos lúteos de buena calidad, con un nivel de secreción de progesterona similar al de un cuerpo lúteo de características funcionales normales. (Chemineau et al., 1982;1984).

Con el fin de reducir los efectos nocivos de la administración de progestágenos a largo plazo, se han llevado a cabo experimentos en los que se reducía la duración de estos tratamientos. En el periodo de transición a la estación reproductiva, la utilización de los dispositivos intravaginales con progesterona (CIDR) durante 5 días antes de la introducción del macho, es suficiente para inducir la sincronización del celo y conseguir que éste sea fértil (Knights et al., 2001). Sin embargo, este mismo tratamiento en hembras en anestro profundo, no da resultado (Rubianes et al., 1998). Los tratamientos con progesterona de menos de 5 días de duración también son efectivos en hembras en transición al periodo reproductivo, formándose folículos preovulatorios de buena calidad y consiguiendo que las hembras presenten sintomatología de celo. Mellado et al. (2000) demostraron cómo un tratamiento con implantes de Sincromate-B (SMB; 2 mg de norgestomet) durante 9 días, era igualmente efectivo.

La alternativa efectiva y más práctica a la aplicación de tratamientos prolongados con progestágenos como tratamiento previo a la introducción de los machos, es la aplicación de una sola inyección intramuscular de una baja dosis de progesterona. Lassoued et al. (1995) demostraron que con una inyección de 20 mg de progesterona en vehículo oleoso en cabras en el momento de la introducción de los machos, se consigue el 100% de sintomatología de celo durante la primera ovulación (3-4 días después del contacto macho-hembras). Después de este ciclo, el siguiente presenta una secreción normal de progesterona.

Díaz Delfa et al. (2002), aportaron resultados similares en cabras de raza Murciano-Granadina, donde la administración de 25 mg de progesterona vía intramuscular en vehículo oleoso, concentra el primer celo y ovulación en los 3-4 días siguientes a la introducción del macho, pero las tasas de ovulación y fertilidad comparadas con las del grupo control siguen siendo muy parecidas (79,6% en hembras tratadas y 75,0% en no tratadas). Los niveles plasmáticos de progesterona con este tratamiento mantienen el incremento de la pulsatilidad de la LH cerca de dos días, permitiendo así, la maduración del folículo preovulatorio y la sincronización de la primera ovulación (González-Bulnes et al., 2006).

Contreras et al. (2008) observaron que una inyección de 25 mg de progesterona en propilenglicol, utilizado como vehículo en hembras ovariectomizadas, mantenía la concentración plasmática de progesterona por encima de 0,5 ng/ml durante 60 horas, mucho más tiempo que el conseguido cuando se utiliza un vehículo oleoso (36 horas). Sin embargo, no existen evidencias que hagan pensar que una mayor duración suponga mejoras en la respuesta de las hembras al contacto con los machos.

5.5.5.2.- Uso y efecto de las prostaglandinas

La $\text{PGF}_{2\alpha}$ y sus análogos como el cloprostenol, son agentes luteolíticos muy eficaces en las cabras, lo que hace que pequeñas dosis sean suficientes para generar la regresión del cuerpo lúteo (1.75 mg de $\text{PGF}_{2\alpha}$, Bretzlaff et al., 1981; 62,5 μg de cloprostenol, Greyling y Van Niekerk, 1986), siendo este un método eficaz en la sincronización de celos en esta especie (Greyling and Van Niekerk, 1986).

La edad del cuerpo lúteo es un factor determinante en la respuesta al tratamiento con prostaglandinas, siendo los cuerpos lúteos más jóvenes los que permiten un mayor grado de sincronización del celo inducido y un menor intervalo tratamiento-celo. (Acritopoulou and Haresign, 1980) La monitorización de la dinámica folicular en cabras mediante el uso de la ultrasonografía ha demostrado que la lisis temprana del cuerpo lúteo (días 5-6 del ciclo) implica no sólo un adelanto en la ovulación, sino que el periodo de ovulaciones se presenta mucho más sincronizado, comparado con lo que sucede cuando la lisis se lleva a cabo en una fase luteal avanzada (días 11-16 del ciclo) (González-Bulnes et al., 2005), esto se debe a las diferencias en las características de la onda folicular existente en el momento del tratamiento luteolítico, estando siempre asegurada la presencia de un folículo joven en crecimiento en la primera onda folicular.

Las ovulaciones inducidas por el efecto macho se pueden sincronizar con un tratamiento luteolítico durante el primer ciclo de duración normal, López Sebastián et al. (2007) propusieron el método IMA.PRO2[®], que implica la lisis temprana del cuerpo lúteo (día 6 del ciclo) inducido por el efecto macho junto con inyección intramuscular de una baja dosis de progesterona. Este método consiste en la aplicación de una única dosis de 25 mg i.m. de progesterona en vehículo oleoso en el momento de la introducción de los machos seguida de una dosis simple de 75 μg de cloprostenol 9 días

después, generando la lisis temprana del cuerpo lúteo inducido. Con este método se observa un comportamiento de celo en el 87% de las hembras a las $37,0 \pm 1,4$ horas después de la administración del cloprostenol, y un pico de la descarga preovulatoria de LH a las $40,5 \pm 1,6$ horas después de la inyección.

Recientemente se han puesto en marcha protocolos libres de progesterona asociados a la aplicación del efecto macho, en épocas de anestro estacional en distintas razas de cabras europeas (www.flock-reprod.eu). Estos tratamientos de sincronización con prostaglandinas después del efecto macho, en razas con anestro estacional más profundo, implica el uso de tratamientos fotoperiódicos previos que consiguen un cierto grado de desestacionalización y una respuesta adecuada al efecto macho.

La respuesta a los tratamientos luteolíticos ha sido efectiva en diferentes periodos después de la introducción de los machos. Con tratamientos el día 13 (correspondiente al día 5 del segundo ciclo, después del primer ciclo corto), el intervalo entre la aplicación del cloprostenol y el pico preovulatorio de LH es de $48,7 \pm 4,6$ horas, mientras que si se aplica el día 17 (día 9 del ciclo) este intervalo es de $53,8 \pm 6,7$ horas.

OBJETIVOS

Conforme al objetivo general del desarrollo de un protocolo alternativo al IMA-PRO2[®], sustituyendo la administración intramuscular de progesterona por la vía intravaginal, y para confirmar la hipótesis de la eficacia de una cápsula intravaginal que consiga niveles plasmáticos de progesterona similares a los de la vía intramuscular, se establecieron los siguientes objetivos:

1. Determinar el efecto de la duración de un tratamiento progestativo de 24, 48 y 72 horas, respecto de la administración de una dosis de 25 mg de progesterona en vehículo oleoso por vía intramuscular en el momento de la introducción de los machos, sobre las características de la respuesta del ciclo inducido, celo, descarga preovulatoria de LH y función luteal.
2. Diseño de una cápsula intravaginal de liberación de progesterona (tipo de cápsula, vehículo y dosis de progesterona) que alcance y mantenga niveles plasmáticos de esta hormona similares a los de la inyección intramuscular de 25 mg de progesterona en vehículo oleoso.
3. Evaluar la validez de la nueva cápsula diseñada, cuando se aplica en el momento de la introducción de los machos, mediante la valoración de la respuesta del ciclo inducido por el efecto macho: celo, descarga preovulatoria de LH y función luteal.
4. Resultados de la aplicación en campo de la nueva metodología, donde en el protocolo IMA-PRO2[®] se ha sustituido la inyección intramuscular por la cápsula intravaginal, valorando los resultados de fertilidad después de la aplicación de la inseminación artificial a tiempo fijo.

MATERIAL Y MÉTODOS

7.1.- Experimento 1: Efecto de la duración del tratamiento progestativo en el momento de la introducción de los machos, sobre la descarga de LH y función del cuerpo lúteo, en cabras con ovulación inducida mediante el efecto macho.

7.1.1.- Animales

Se utilizaron 24 cabras de raza Murciano-Granadina, de entre 3 a 6 años, paridas en septiembre-octubre, con buena condición corporal. Las cabras estaban en periodo de ordeño en un sistema de explotación de un parto al año. Para llevar a cabo el efecto macho, así como la detección de celos se utilizaron 4 machos vasectomizados de la misma raza, con libido comprobada, y provistos de arneses con pastillas marcadoras.

Los animales estaban localizados en la granja experimental del Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA) en Guadalupe, Murcia (38° de latitud Norte). Todos los animales estaban bajo control sanitario que incluía tratamientos preventivos de desparasitación interna y externa, así como protocolos de vacunación.

La alimentación consistía en una ración equilibrada (1,4 kg/animal) de pienso complementario-mezcla de granos para caprino en producción (U.A.G. G-30, Alimer, S.Coop.) y 0,5 kg de heno de alfalfa, así como paja de cereales suministrados *ad libitum*. Se disponía de bebederos con agua corriente, bloques de sal y corrector vitamínico mineral *ad libitum*.

7.1.2.- Diseño experimental

Las hembras fueron aisladas de los machos (visión y olor), retirando los machos a otra instalación, durante 8 semanas antes de empezar el experimento en el mes de abril. En el momento de la introducción de los machos en el grupo de hembras (efecto macho) los animales se dividieron en cuatro grupos iguales, y cada grupo recibía los siguientes tratamientos:

- Grupo A1 (6 cabras): grupo control, inyección intramuscular de 25 mg de progesterona en 2ml de aceite de oliva

- Grupo A2 (6 cabras): Esponja intravaginal de poliuretano con 20 mg de acetato de fluorogestona (Intervet. Boxmeer, Holanda). Estas esponjas se retiraban 24 horas después.
- Grupo A3 (6 cabras): Esponjas intravaginales de 20 mg de acetato de fluorogestona (Intervet. Boxmeer, Holanda). Las esponjas se retiraban 48 horas después.
- Grupo A4 (6 cabras): Esponja intravaginal de 20 mg de acetato de fluorogestona (Intervet. Boxmeer, Holanda). Las esponjas se retiraban 72 horas después.

Desde el momento de la introducción de los machos (cuatro machos) se detectaron celos y se recogieron muestras de sangre para determinación de concentraciones de LH y progesterona.

- Efecto macho y detección de celos: 2 machos permanecían con las hembras provistos de arneses con pastillas marcadoras. Para lograr una mejor estimulación de las hembras los machos se intercambiaban cada 12 horas. Cada 4 horas y coincidiendo con los muestreos de sangre se retiraban las hembras en celo que habían sido marcadas.
- Para la determinación de las concentraciones de LH se recogieron muestras cada cuatro horas. En el grupo A1 a partir de las 24 horas después de la inyección intramuscular, y en los grupos A2, A3 y A4 a partir de las 24 horas después de la retirada de la esponja y hasta 24 horas después de detectados los primeros síntomas de celo.
- Para las determinaciones de progesterona, previamente a la introducción de los machos se recogieron dos muestras de sangre con un intervalo de 9 días para asegurar el estado de anestro previo a la estimulación por los machos. Desde la introducción de los machos y hasta 14 días después se recogió una muestra diaria para determinar la actividad luteal inducida por los machos.

7.2.- Experimento 2: Liberación de progesterona y cinética en plasma sanguíneo, en cabras ovariectomizadas, después de la administración de cápsulas de gelatina intravaginales que contenían 120 mg de progesterona.

7.2.1.- Animales

Se utilizaron 14 cabras de raza Murciano-Granadina ovariectomizadas, de entre 3 y 6 años, con buena condición corporal. Los animales estaban ubicados en la granja animalario del Departamento de Reproducción Animal del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (I.N.I.A.), Madrid, a 40° 25' de latitud Norte. Todos los animales eran sometidos a un control sanitario que incluía, tratamientos preventivos de desparasitación interna y externa, así como protocolos de vacunación.

La alimentación consistía en una ración equilibrada de pienso compuesto para caprino (Visan K-59, Visan Ind. Zoot., S.A), cebada en grano y heno de alfalfa, así como paja de cereales suministrados *ad libitum*. Se disponía de bebederos con agua corriente, bloques de sal y corrector vitamínico mineral *ad libitum*. Las instalaciones consistían en locales con 125 m² de superficie cubierta, y parques descubiertos.

7.2.2.- Diseño experimental

Los animales se dividieron en dos grupos, con los siguientes tratamientos:

- Grupo control, C1 (7 cabras): Inyección intramuscular de 25 mg de progesterona en 2 ml de aceite de oliva
- Grupo cápsula, C2 (7 cabras): Cápsula de gelatina intravaginal que contenía 120 mg de progesterona en contenido oleoso adecuado para la absorción vaginal de progesterona

Recogida de muestras de sangre:

- Para la determinación de las concentraciones plasmáticas de progesterona se recogieron muestras de sangre desde la aplicación del tratamiento (hora 0) y cada dos horas hasta 42 horas después de la aplicación del tratamiento.

7.3.- Experimento 3: Descarga de LH y función luteal después de la introducción de los machos, en cabras tratadas con esponja intravaginal de FGA durante 30 horas y cápsula intravaginal de progesterona.

7.3.1.- Animales

Se utilizaron 24 cabras de raza Murciano-Granadina, de entre 3 a 6 años, paridas en septiembre-octubre, con buena condición corporal. Las cabras estaban en periodo de ordeño en un sistema de explotación de un parto al año. Para llevar a cabo el efecto macho así como la detección de celos se utilizaron 4 machos vasectomizados de la misma raza, con libido comprobada, y provistos de arneses con pastillas marcadoras.

Los animales estaban localizados en la granja experimental del Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA) en Guadalupe, Murcia (38° de latitud Norte). Todos los animales estaban bajo control sanitario que incluía, tratamientos preventivos de desparasitación interna y externa, así como protocolos de vacunación.

La alimentación consistía en una ración equilibrada (1,4 kg/animal) de pienso complementario-mezcla de granos para caprino en producción (U.A.G. G-30, Alimer, S.Coop.) y 0,5 kg de heno de alfalfa, así como paja de cereales suministrados *ad libitum*. Se disponía de bebederos con agua corriente, bloques de sal y corrector vitamínico mineral *ad libitum*.

7.3.2.- Diseño experimental

Las hembras fueron aisladas de los machos (visión y olor), retirando los machos a otra instalación, durante 8 semanas antes de empezar el experimento en el mes de

abril. En el momento de la introducción de los machos en el grupo de hembras (efecto macho) los animales se dividían en tres lotes iguales y cada lote recibía el siguiente tratamiento:

- Grupo A (8 cabras): inyección intramuscular de 25 mg de progesterona intramuscular en 2 ml de aceite de oliva.
- Grupo B (8 cabras): Esponja intravaginal de poliuretano (Intervet. Boxmeer, Países Bajos) de 20 mg de acetato de fluorogestona. Las esponjas se retiraban 30 horas después.
- Grupo C (8 cabras): Cápsula de gelatina intravaginal que contenía 120 mg de progesterona en contenido oleoso adecuado para la absorción vaginal de progesterona

Desde el momento de la introducción de los machos (cuatro machos) se detectaron celos y se recogieron muestras de sangre para determinación de concentraciones de LH y progesterona.

- Efecto macho y detección de celos: 2 machos permanecían con las hembras provistos de arneses con pastillas marcadoras. Para lograr una mejor estimulación de las hembras los machos se intercambiaban cada 12 horas. Cada 4 horas y coincidiendo con los muestreos de sangre se retiraban las hembras en celo que habían sido marcadas.
- Para la determinación de las concentraciones de LH se recogieron muestras cada cuatro horas. En el grupo A y C a partir de las 24 horas después de la inyección intramuscular o de la aplicación de la cápsula intravaginal, y en el grupo B a partir de las 24 horas después de la retirada de la esponja y hasta 24 horas después de detectados los primeros síntomas de celo.
- Para las determinaciones de progesterona, previamente a la introducción de los machos se recogieron dos muestras de sangre con un intervalo de 9 días para asegurar el estado de anestro previo a la estimulación por los machos. Desde la introducción de los machos y hasta 14 días después se recogió una muestra diaria para determinar la actividad luteal inducida por los machos.

7.4.- Experimento 4: Fertilidad en cabras con ovulación inducida mediante efecto macho, y tratadas con una cápsula intravaginal de progesterona, sustituyendo a la inyección intramuscular en el protocolo IMA-PRO2®.

7.4.1.- Experimento 4.1

7.4.1.1.- Animales

Se utilizaron cabras de raza Murciano-Granadina en dos explotaciones pertenecientes a la Asociación Española de Criadores de la cabra Murciano-Granadina (ACRIMUR) en la región de Murcia.

En la explotación 1 se utilizaron 128 hembras y 100 hembras en la explotación 2. Las cabras eran adultas en lactación, y fueron tratadas durante el mes de abril (periodo de anestro). Las hembras tenían entre 2 y 8 años de edad estaban en un sistema de explotación intensivo de 1 parto/año y habían parido en los meses de septiembre-octubre del año anterior, manteniendo una buena condición corporal.

7.4.1.2.- Diseño experimental

Las hembras fueron separadas de los machos al menos con un mes de antelación siguiendo el protocolo descrito para el efecto macho. En el momento de la introducción de los machos (proporción 1/10), las hembras se dividían en dos lotes homogéneos (68 y 60 cabras en el explotación 1 y 50 y 50 en el explotación 2). En el momento de la introducción de los machos, las hembras eran tratadas en un lote con una inyección intramuscular de 25 mg de progesterona en vehículo oleoso (IMA-PRO2®) y el resto con una cápsula intravaginal que contenía 120 mg de progesterona, según el método descrito para la adición a la patente (Método de Inducción y Sincronización de la Ovulación para la inseminación artificial sistemática en ganado caprino (IMA-PRO2®). WO200303053).

Siguiendo el protocolo IMA-PRO2® (López Sebastián et al., 2007) las hembras se trataban 9 días después de la introducción de los machos con una inyección intramuscular de 75 µg de Cloprostenol, 0,3 ml de Estrumate® (Mallinckrodt Vet GmbH, Friesoythe, Alemania) y 55 horas después de la inyección se llevaba a cabo la inseminación artificial de todas las hembras, por un solo inseminador. Se utilizaba

semen congelado de machos de la raza Murciano-Granadina del centro Ovigen (Centro de Selección y Mejora Genética de Ovino y Caprino de Castilla y León. Toro, Zamora), en pajuelas de 0,25 ml, con una dosis de 200×10^6 espermatozoides. El semen se depositaba en la entrada del cuello cervical siguiendo la técnica habitual para esta especie.

7.4.2.- Experimento 4.2.

7.4.2.1.- Animales

Se utilizaron 144 animales de la raza Malagueña en una explotación perteneciente a la Asociación Española de Criadores de la Cabra Malagueña (A.E.C.C.M.), en la provincia de Málaga. Las cabras eran adultas entre 2-8 años de edad, en lactación, fueron tratadas durante el mes de mayo en un sistema de explotación semi-intensivo, habían parido en los meses de octubre –noviembre del año anterior, y mantenían buena condición corporal y estado sanitario.

7.4.2.2.- Diseño experimental

Las cabras fueron divididas en dos lotes iguales, un grupo control fueron tratado con el protocolo hormonal clásico para inducción y sincronización de ovulaciones en esta especie utilizando esponjas intravaginales de 20 mg de acetato de fluorogestona (Intervet. Boxmeer, Holanda) durante 11 días, administrando 300 UI de eCG (Folligon[®]. Intervet) y 75 µg de cloprostenol (Estrumate[®]. Mallinckrodt Vet GmbH. Friesoythe, Alemania) en el día 9, 48 horas antes de la retirada de las esponjas intravaginales. En este grupo, las cabras se inseminaron 46 horas después de la retirada de las esponjas.

Las cabras del lote 2 fueron tratadas siguiendo el protocolo del experimento 1 IMA.PRO2, con utilización de efecto macho y con administración de cápsulas intravaginales de 120 mg de progesterona en el momento de la introducción de los machos. Ambos protocolos, se hacían coincidir de forma que las cabras se inseminaron todas a la vez, por un mismo inseminador con semen refrigerado a 5 °C, perteneciente a los machos de la Asociación en pajuelas de 0,25 ml y una dosis de 200×10^6 millones de espermatozoides.

7.5.- Técnicas

7.5.1.- Detección de celo.

Para la detección del celo se utilizaban machos vasectomizados o machos enteros provistos de un mandil (Donaghys Ram Harness[®], Donaghys Ltd., Nueva Zelanda) que impedía la cubrición. Los machos estaban en un proporción aproximada de 1/10 respecto del número de hembras. Los machos también iban provistos de un arnés con pastillas marcadoras de cera de diferentes colores (Donaghys Ram Crayons[®], dureza media, Donaghys Ltd., Nueva Zelanda). Los machos se cambiaban cada doce horas, y cada 4 horas coincidiendo con las recogidas de muestras de sangre se retiraban las cabras que habían sido claramente marcadas, una sola marca no es identificativo de hembra claramente en celo.

7.5.2.- Preparación de la cápsula intravaginal.

Las cápsulas intravaginales de liberación de progesterona se preparaban según el protocolo descrito para la patente (Método de Inducción y Sincronización de la Ovulación para la Inseminación Artificial Sistemática en Ganado Caprino (IMAPRO2[®]). WO200303053).

Las cápsulas de gelatina (Cápsulas 1 blancas BA-05509, Fagron Iberica. S.A.U.) tenían capacidad para 600 µl, contenían 120 mg de progesterona micronizada (progesterona PH.EUR. Siemsgluss Iberica, S.A.) en vehículo oleoso a base de aceite de palma (Sigma-Aldrich, 70905-500G), 12 mg de lecitina de soja (Asolectina, Sigma-Aldrich, 11145-50G) y 60 mg de ciclodextrina (β ciclodextrina, SAFC, W40, 282-6).

En el aceite de palma precalentado en baño María a 40°C, se disolvían la asolectina y la ciclodextrina, a este medio oleoso se añadía la progesterona micronizada para alcanzar una concentración de 120 mg en 600 µl de vehículo. El producto líquido final se añadía mediante pipeta a las capsulas abiertas, que se cerraban a continuación manteniéndolas en refrigeración a 4°C hasta el momento de su utilización.

Para la administración intravaginal se utilizaba un catéter de plástico para óvulos intravaginales, de una longitud de 13 cm que permitía la deposición de la cápsula en el fondo de la vagina.

7.5.3.- Ovariectomía.

La ovariectomía se realizó por exposición de los ovarios mediante una laparotomía media, seguida de la realización de doble ligadura de la arteria y vena ováricas, y posterior extirpación del ovario, desprendiéndolo del hilio ovárico. Esta intervención quirúrgica se realizó con anestesia general, inducida mediante la administración de 10 mg/kg vía intravenosa de una solución al 5% de tiopental sódico (Tiobarbital B.Braun[®]) y se mantuvo con anestesia inhalatoria al 0,5-2% Isoflurano (ISOFLO[®], Esteve Veterinaria). Como premedicación anestésica se administraron 2 mg/kg vía intramuscular de flunixin meglumine (Finadyne[®], Intervet Schering Plough Animal Health) y atropina (Atropina B.Braun[®]) 0,02 mg/kg vía intravenosa. Durante el periodo anestésico se monitorizó la función cardíaca y respiratoria. Terminada la intervención los animales se mantuvieron durante 10 minutos exclusivamente con oxígeno. Después de la intervención se aplicó una antibioterapia profiláctica.

7.5.4.- Muestras de sangre (plasma sanguíneo).

Las muestras de sangre fueron recogidas de la vena yugular en tubos de vacío de 5 ml heparinizados (Vacutainer[®] Systems Europe, Becton Dickinson, Meylan Cedex, Francia). Inmediatamente después los tubos eran centrifugados a 1500 g durante 15 minutos. El plasma recogido se pasaba a tubos de poliestireno, de 3 ml. Los tubos herméticamente cerrados permanecían en congelación a -20°C hasta el momento de su análisis para la determinación hormonal.

7.5.5.- Analítica de LH.

En las muestras de plasma descongelado se determinaron las concentraciones de LH mediante un Kit de ELISA (LH DETECT[®], ReproPharm SAS, Francia) para LH caprina.

Las determinaciones analíticas se realizaban en alícuotas de 10 µl de la muestra de plasma, a las que se les añadía 90 µl de tampón fosfato, (0,04M a pH=7,0). Cada muestra se añadía a los pocillos de la placa por duplicado. De igual forma se añadían a

los pocillos del kit 100 µl de cada uno de los 7 puntos de la curva standard desde 0 ng/ml a 4 ng/ml, también por duplicado.

Después de una incubación de 45 minutos a temperatura ambiente, se lava la placa con PBS-Tween y se añade el anticuerpo 2 (AC2). De nuevo se incuba y se lava, antes de añadir el anticuerpo 3(AC3) y su posterior incubación. Se lava la placa por última vez con PBS-Tween y se añade el substrato TMB (SUB TMB), así como la solución de parada. La lectura de los resultados se realizaba en un equipo para lector ELISA (Microplate Reader MR-96^a, Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics) a longitud de onda de 405 nm.

Se consideraba el momento de inicio de la descarga preovulatoria de LH cuando un punto del muestreo era cinco veces superior a la media de la concentración basal de LH. El límite de detección fue de 0,04ng/ml y los coeficientes de variación inter e intraanálisis 12.8% y 11.7 % respectivamente.

7.5.6.- Analítica de progesterona.

Los niveles de progesterona en sangre periférica fueron medidos en alícuotas de 100 µl de plasma, según la técnica de análisis radioinmunológico descrita por López Sebastián et al., (1984). En este caso no se realizaba proceso de extracción de progesterona con hexano y el análisis se realizaba de forma directa en plasma, utilizando una curva standard en plasma sanguíneo con las siguientes concentraciones: 0,125 ng/ml 0,25 ng/ml 0,5 ng/ml 1 ng/ml 2 ng/ml hasta 4 ng/ml.

En los tubos que contenían el residuo seco (progesterona), así como en los pertenecientes a la curva standard, se añadieron 200 µl de tampón fosfato, (0,04 M a pH=7,0), 100 µl de antisuero antiprogesterona a la dilución de 1/700 (Anti- Progesterona, Mouse IgG1, Acris GmbH) y 100 µl (10.000 cpm) de progesterona marcada con tritio (1,2,6,7 Progesterona H³, Amersham), (85-110 Ci/mmol).

Después de un periodo de incubación de 24 horas a 4°C se separaron las fracciones, añadiendo en cada tubo 500 µl de una suspensión de carbón dextrano a partir de 250 mg de carbón activo (Norit® A, Serva) y 10 mg de dextrano (Dextrano, Sigma-Aldrich) en 200 ml de tampón fosfato (PBS). Después de 15 minutos de contacto a 4 °C se centrifugaron a 4.500 rpm durante 20 minutos en centrífuga refrigerada.

Posteriormente se recuperó el sobrenadante y se pasó a viales de polietileno, añadiendo 500 µl de líquido de centelleo a cada tubo.

Tras un periodo de agitación de 30 minutos, se detectó la actividad radiactiva de cada muestra en cpm, de la fracción de hormona ligada al anticuerpo, en un contador de centelleo líquido (Contador TRI-CARB 2100TR, Packard), a temperatura ambiente.

El porcentaje de recuperación fue de 84,3%, el límite de detección 0,06 ng/ml, y los coeficientes de variación inter e intraanálisis de 10,4% y 13,6% , respectivamente.

7.5.7.- Ecografía.

Las ecografías para diagnóstico de gestación (35-45 días post-inseminación) en el experimento 4, se llevaron a cabo mediante un equipo Aloka 500 provisto de una sonda transabdominal de 5 MHz. Las ecografías se realizaban con la hembra de pie, apoyando la sonda con gel para ultrasonografía por debajo de la ingle y entre la cara interna de la extremidad y flanco derecho. La identificación de cabras positivas era considerada una vez que se visualizaban estructurales embrionarias y placentarias correspondientes a ese periodo de gestación.

7.5.8.- Farmacocinética de la progesterona.

Para el análisis farmacocinético de las concentraciones de progesterona frente al tiempo, se utilizó el programa informático PK solution[®], versión 2.0. Se utilizó un modelo no compartimental para el análisis de los datos. El modelo no compartimental es independiente del efecto de variables como la edad, animales, vías de administración, estado fisiológico, etc., y a su vez los parámetros lo son respecto al número de compartimientos que se pudieran escoger en cada análisis (Kinabo y McKellar, 1989; Riviere, 2009).

La estimación de los parámetros farmacocinéticos se llevó a cabo utilizando el modelo de cálculo basado en la estimación del área bajo la curva (AUC), descrito por el perfil concentración – tiempo. En este caso, la estimación del AUC se realiza mediante la aplicación de la regla trapezoidal clásica.

Todos los valores de las concentraciones plasmáticas obtenidos de cada animal se procesaron y se ajustaron de forma individual y posteriormente, se procedió al cálculo de la media de los parámetros farmacocinéticos entre los individuos que conformaban cada uno de los ensayos realizados.

7.5.9.- Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se expresaron como media aritmética \pm error estándar de la media ($\bar{x} \pm S.E.M$). El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa *Statistica for Windows v.12.0 software* (Stat-Soft, Tulsa, OK, USA). El nivel de significación fue de $P < 0,05$.

Para determinar la realización de un test paramétrico o no paramétrico, previamente se evaluó si las variables se ajustaban a una distribución normal mediante el test de Shapiro-Wilk. Cuando los datos no se ajustaban a una distribución normal, incluso tras la pertinente transformación logarítmica, las variables se analizaron mediante test no paramétricos.

Los métodos estadísticos utilizados para cada uno de los experimentos fueron los siguientes:

- Experimento 1: Efecto de la duración del tratamiento progestativo en el momento de la introducción de los machos, sobre la descarga de LH en cabras con ovulación inducida mediante el efecto macho.
- Días que trascurren desde la inyección de progesterona o la retirada de la esponja intravaginal hasta alcanzar un nivel de progesterona plasmática ≥ 0.5 ng/ml: Test no paramétrico de Kruskal-wallis (*MULTIPLE COMPARISONS*).
- Concentración media de progesterona durante los nueve días siguientes a la retirada del dispositivo intravaginal: Análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas.
- Comparación de múltiples medias, relacionadas con los tiempos transcurridos entre la introducción de los machos y aparición de picos de LH: Análisis de varianza (ANOVA) de una vía.

- Experimento 2: Liberación de progesterona y cinética en plasma sanguíneo, administrada en cápsula intravaginal en cabras ovariectomizadas.
- Comparaciones de parámetros farmacocinéticos entre distintos grupos: Análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas.
- Experimento 3: Descarga de LH en respuesta al efecto macho en cabras tratadas con esponja vaginal de FGA durante 30 horas y con aplicación de cápsula intravaginal de progesterona.
- Concentración media de progesterona durante los nueve días siguientes a la retirada del dispositivo intravaginal: Análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas.
- Comparación de múltiples medias, relacionadas con el tiempo transcurrido entre la introducción de los machos y apariciones de picos de LH: Análisis de varianza (ANOVA) de una vía.
- Experimento 4.1 y 4.2: Fertilidad en cabras con ovulación inducida mediante el efecto macho y tratadas con una cápsula intravaginal de progesterona.
- Comparación de porcentajes de fertilidad entre distintos grupos según tratamiento farmacológico: Chi-cuadrado.

RESULTADOS

8.1.- Experimento 1: Efecto de la duración del tratamiento progestativo en el momento de la introducción de los machos, sobre la descarga de LH y función del cuerpo lúteo en cabras con ovulación inducida mediante el efecto macho.

En todas las hembras incluidas en el experimento se confirmó la ausencia de ciclicidad, mediante la determinación de las concentraciones plasmáticas de progesterona 9 días antes y en el momento de la introducción de los machos.

Las concentraciones de progesterona en ambas muestras fueron inferiores a 0,2 ng/ml lo que demuestra la situación de anestro para todas las cabras en el momento de la introducción de los machos.

- Concentraciones plasmáticas de LH

La descarga preovulatoria de LH se observó en el 100% de los animales, independientemente del tratamiento aplicado.

En la Tabla 2 se muestran las medias y errores estándar de las concentraciones de LH, calculadas a partir de los datos individuales dentro de cada grupo. En la tabla se han hecho coincidir las concentraciones medias correspondientes a los picos preovulatorios, con las medias de tiempo que transcurren en cada grupo desde la introducción de los machos a dichos picos de LH. La descarga preovulatoria de LH aparece en los grupos A2, A3 y A4, a partir de las 30 horas de la retirada del tratamiento progestativo (24, 48 y 72 horas respectivamente). En el caso del grupo A1, tratado con inyección intramuscular de progesterona, la descarga preovulatoria de LH tiene lugar 8 horas después del grupo A2, lo que indica que el descenso del nivel plasmático de progesterona conseguido mediante la administración intramuscular es unas horas posterior al efecto conseguido con 24 horas de tratamiento progestativo.

Tabla 2. Medias de las concentraciones de LH (ng/ml) después del efecto macho. Grupo A1: tratado con inyección intramuscular de progesterona en el momento de la introducción de los machos; Grupos A2, A3 y A4: tratados con esponja intravaginal de FGA durante 24, 48 y 72 horas respectivamente. En rojo se indica la concentración media del pico preovulatorio coincidiendo con la media de tiempo que transcurre desde la introducción de los machos

Tiempo (h)	A1		A2		A3		A4	
	Media	S.E.M	Media	S.E.M	Media	S.E.M	Media	S.E.M
34	0	0	0,24	0,59	0	0	0	0
38	0	0	0,32	0,50	0	0	0	0
42	0	0	1,04	1,06	0	0	0	0
46	0	0,13	0,97	0,86	0	0	0	0
50	0,15	0,24	0,83	0,66	0	0	0	0
54	0,26	0,33	2,19	1,47	0	0	0	0
58	0,46	0,35	17,18	5,81	0	0	0	0
62	1,53	1,68	7,39	7,05	0	0	0	0
66	19,30	5,96	1,08	0,81	1,17	0,61	0	0
70	3,30	2,82	0,39	0,41	1,66	0,84	0	0
74	0,65	0,48	0,03	0,06	1,85	1,12	0	0
78	0,12	0,29	0,06	0,15	3,35	3,30	0	0
82	0,06	0,15	0,04	0,09	16,37	6,41	0,46	0,72
86	0	0,15	0	0	5,83	4,50	1,06	0,63
90	0	0	0	0	2,23	0,59	1,53	0,48
94	0	0	0	0	0,90	1,46	1,64	0,25
98	0	0	0	0	0	0	2,08	1,19
102	0	0	0	0	0	0	20,57	7,88
106	0	0	0	0	0	0	8,48	5,68
110	0	0	0	0	0	0	0,82	0,90
114	0	0	0	0	0	0	0,13	0,31
118	0	0	0	0	0	0	0	0

Los intervalos entre la introducción de los machos y la descarga preovulatoria de LH se muestran en la Tabla 3 y en la Figura 12, así como los perfiles de secreción medios de esta hormona para cada uno de los grupos. El pico de LH del grupo A2 (24 horas de tratamiento progestativo) es el primero en aparecer, sin presentar diferencias significativas con el grupo A1 (inyección intramuscular de progesterona) (media±SEM 66,7±4,2 horas y 58±2,7 horas respectivamente). Las descargas preovulatorias de LH son posteriores en los grupos A3 y A4 (48 y 72 horas de tratamiento progestativo intravaginal) como consecuencia de la mayor duración en el mantenimiento de niveles plasmáticos de FGA con el dispositivo intravaginal (media±SEM 83,3±2,2 horas y 102±1,4 horas respectivamente) (P< 0,05).

Tabla 3. Horas desde la introducción de los machos al pico preovulatorio de LH (media \pm SEM). Diferentes letras (a, b y c) indican diferencias significativas ($P < 0,05$)

Grupo	Macho/LH
A1	66,7 \pm 4,2 ^a
A2	58 \pm 2,7 ^a
A3	83,3 \pm 2,2 ^b
A4	102 \pm 1,4 ^c

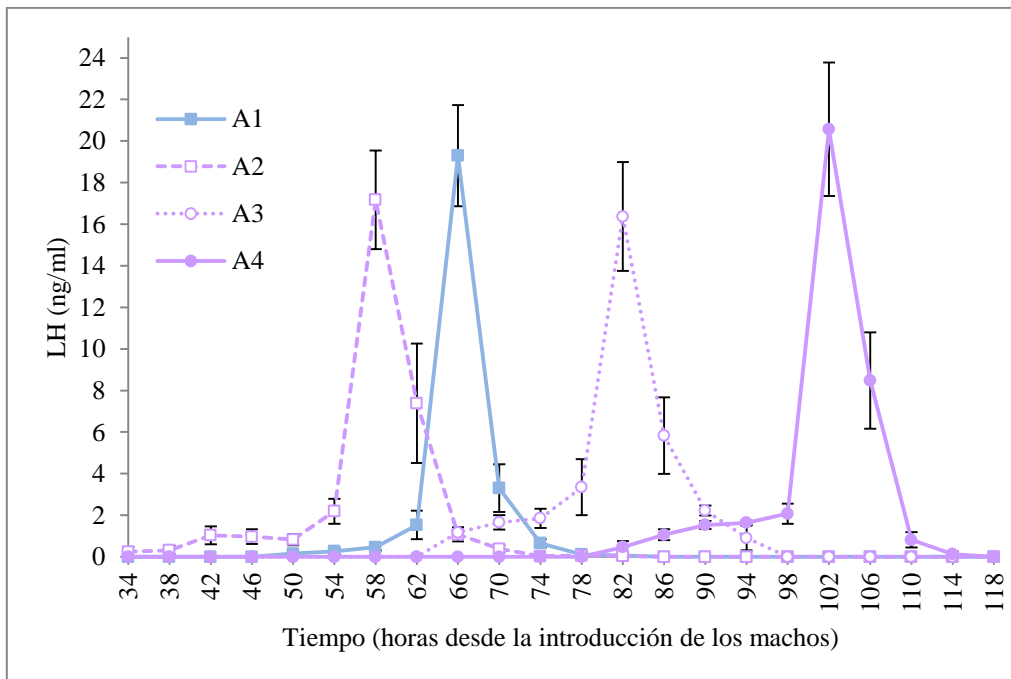


Fig.12. Descarga preovulatoria de LH (media \pm SEM) inducida por la introducción de los machos en cabras con tratamiento progestativo intravaginal (A2, A3 y A4; 24, 48 y 72 horas respectivamente) o inyección de progesterona (A1) el día de la introducción de los machos

Los datos de los intervalos desde la retirada de los dispositivos intravaginales a los picos preovulatorios de LH aparecen en la Tabla 4, y los perfiles de secreción medios de LH en la Figura 13. No existen diferencias significativas entre grupos (media \pm SEM 34 \pm 2,7h, 35 \pm 2,2h y 30 \pm 1,4h para los grupos A2, A3 y A4 respectivamente). Sin embargo el periodo más largo de tratamiento progestativo (72 horas) reduce el intervalo en aparición de esta descarga preovulatoria, cuando se compara con los otros dos grupos (30 \pm 1,4 vs 34 \pm 2,7 o 35 \pm 2,2 horas) ($P > 0,05$).

Tabla 4. Horas desde la retirada de la esponja intravaginal al pico preovulatorio de LH (media \pm SEM) en los grupos A2, A3 y A4 (24, 48 y 72 horas respectivamente). La misma letra (a) indica que no existen diferencias significativas ($P > 0,05$)

Grupo	Retirada esponja/LH
A2	34 \pm 2.7 ^a
A3	35 \pm 2.2 ^a
A4	30 \pm 1.4 ^a

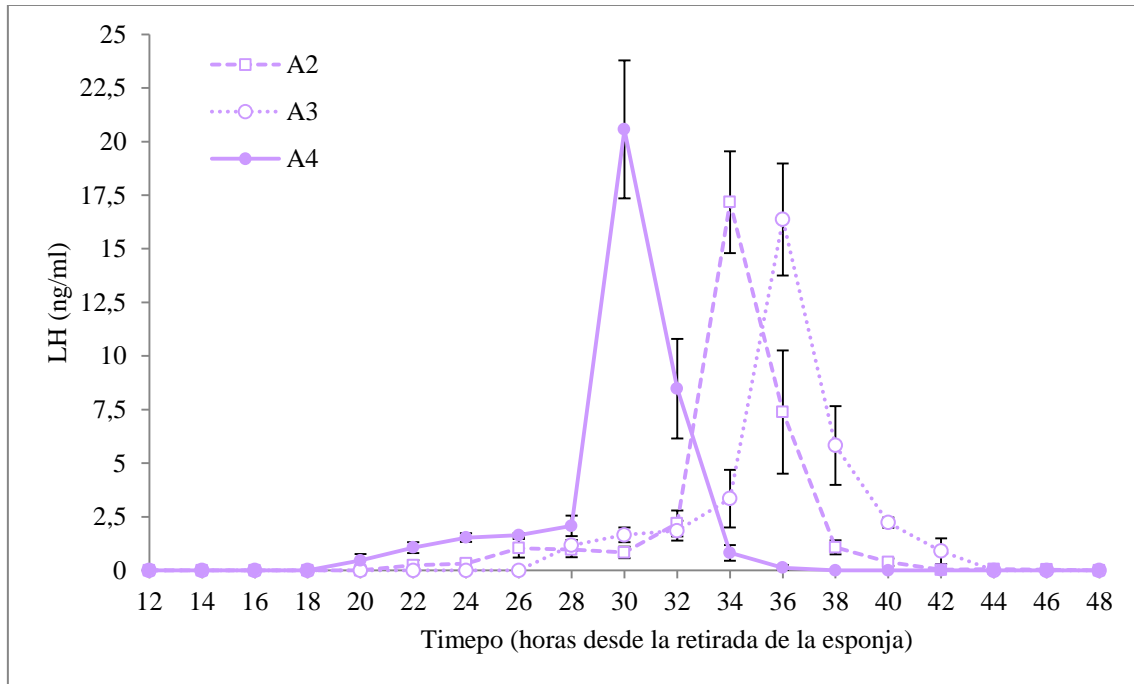


Fig.13. Intervalo entre la retirada de las esponjas intravaginales en los grupos A2, A3 y A4 (24, 48 y 72 horas respectivamente) y la descarga preovulatoria de LH (media \pm SEM)

- Concentraciones plasmáticas de progesterona

Si consideramos como reflejo de función luteal eficaz una concentración de progesterona plasmática $\geq 0,5$ ng/ml, en la Tabla 5 y Figura 14 se muestran los intervalos entre la retirada de las esponjas intravaginales y el momento en que las concentraciones de progesterona del cuerpo lúteo inducido alcanzan los 0,5 ng/ml. El tratamiento progestativo de menor duración (A2: 24horas) retrasa significativamente el momento en que la progesterona plasmática alcanza los 0,5ng/ml, en comparación con los otros dos tratamientos de mayor duración (5,3 \pm 0,2 vs 4,2 \pm 0,3 y 4 \pm 0,4 días) ($P < 0,05$).

Tabla 5. Días que transcurren desde la retirada de la esponja intravaginal hasta alcanzar un nivel de progesterona plasmática $\geq 0,5$ ng/ml (media \pm S.E.M.). La misma letra (a) indica que no existen diferencias significativas ($P > 0,05$)

Grupo	Media \pm S.E.M
A2	5,3 \pm 0,2 ^a
A3	4,2 \pm 0,3 ^a
A4	4 \pm 0,4 ^a

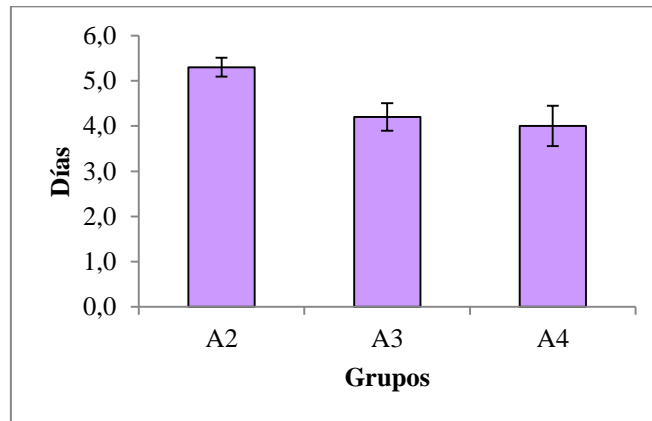


Fig.14. Días que transcurren desde la retirada de la esponja intravaginal, grupo A2, A3 y A4 hasta alcanzar un nivel de progesterona plasmática $\geq 0,5$ ng/ml (media \pm S.E.M.)

En la Tabla 6 aparecen los niveles plasmáticos de progesterona durante los nueve días posteriores a la retirada del tratamiento progestativo en los grupos A2, A3 y A4 (24, 48 y 72 horas de duración). Independientemente de la duración del tratamiento aplicado, se evita la aparición de ciclos cortos, y en todos los animales el ciclo inducido es de duración normal.

El perfil de liberación de la progesterona está asociado al tiempo que se mantiene el dispositivo vaginal en cada grupo, en la Figura 15 se muestran estos perfiles con las medias de las concentraciones durante los nueve días posteriores a la retirada del dispositivo vaginal en cada grupo. Si observamos este patrón en los días siguientes a la retirada de la esponja nos encontramos dos periodos bien definidos, uno comprende los primeros cuatro días (d0-d3), y el otro los cinco días restantes (d4-d9). No se observan diferencias significativas en la liberación de progesterona entre ninguno los tres grupos en el primer periodo ($P > 0,05$). En el día 4 ya aparecen diferencias entre grupos, siendo las concentraciones de progesterona inferiores en el grupo A2 (24horas de tratamiento)

respecto de los otros dos grupos (A3 y A4; 48 y 72 horas de tratamiento) ($P < 0,05$). Estas diferencias entre grupos se mantienen hasta el día 9, salvo en los días 5 y 6 donde no existen diferencias significativas entre los grupo A2 y A3 (24 y 48horas de tratamiento) ($P > 0,05$) (Tabla 6).

En el grupo A2 (24 horas), no sólo la secreción de progesterona por parte del cuerpo lúteo generado se retrasa comparado con los otros dos grupos, además los niveles que se alcanzan son inferiores y se mantienen menos tiempo en comparación con los otros dos tratamientos ($P < 0,05$).

Tabla 6. Medias de las concentraciones de progesterona durante los nueve días posteriores al de la retirada del tratamiento progestativo (día 0). Diferentes letras (a y b) indican diferencias significativas ($P < 0,05$)

Grupo	d0	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9
A2	0 ^a	0 ^a	0,017 ^a	0,035 ^a	0,017 ^a	0,472 ^a	1,335 ^a	1,562 ^a	1,79 ^a	1,602 ^a
A3	0 ^a	0,012 ^a	0,003 ^a	0,112 ^a	0,425 ^b	1,115 ^{ab}	1,855 ^{ab}	2,565 ^b	3,052 ^b	4,282 ^b
A4	0 ^a	0,003 ^a	0,07 ^a	0,162 ^a	0,563 ^b	1,35 ^b	2,32 ^b	3,28 ^b	3,885 ^b	4,073 ^b

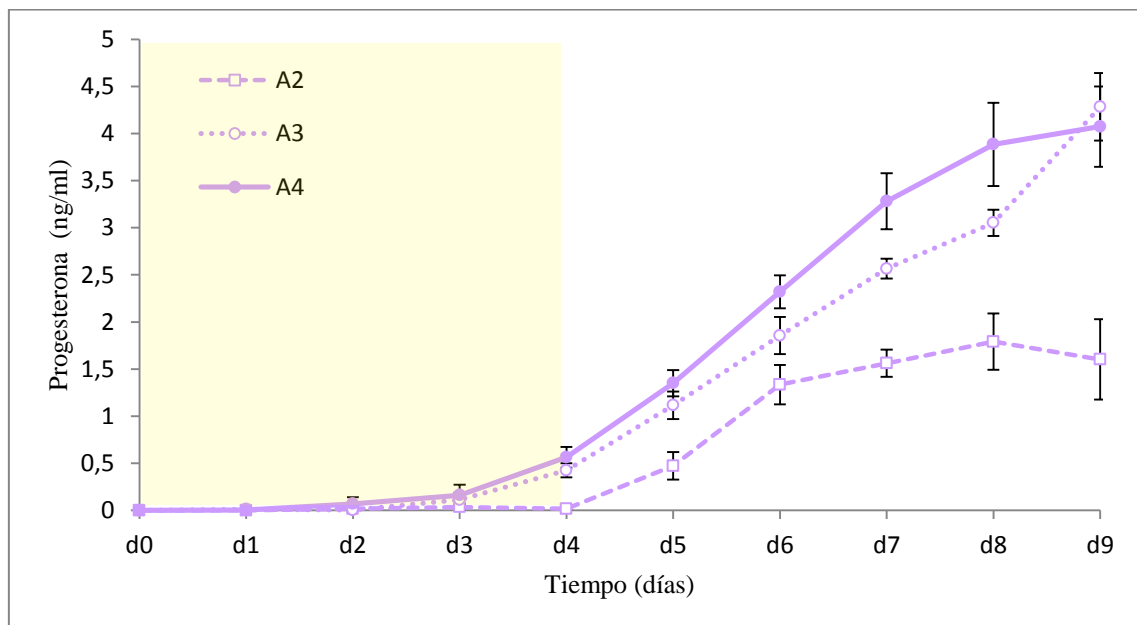


Fig.15. Evolución de las concentraciones plasmáticas de progesterona (media±S.E.M.) durante los nueve días siguientes a la retirada del dispositivo intravaginal en los tres grupos de tratamiento con esponjas intravaginales 24, 48 y 72 horas

8.2.- Experimento 2: Liberación de progesterona y cinética en plasma sanguíneo, en cabras ovariectomizadas, después de la administración de cápsulas de gelatina intravaginales que contenían 120 mg de progesterona.

En la Figura 16 se muestran las concentraciones plasmáticas de progesterona en cabras ovariectomizadas después de la administración de una inyección intramuscular de 25 mg de progesterona en vehículo oleoso (grupo control, C1) o mediante la aplicación de una cápsula intravaginal con 120 mg de progesterona (grupo cápsula, C2).

Las medias de estas concentraciones en ambos grupos fueron significativamente diferentes durante todo el experimento ($P < 0,05$), aunque las mayores diferencias se detectaron en las tres primeras y en las cinco últimas muestras. En ambos grupos se produjo un incremento muy marcado en la primera muestra (dos horas post tratamiento). La concentración máxima (C_{max}) de progesterona que se alcanzó con la inyección intramuscular en el grupo C1 fue mayor pero no significativamente diferente ($2,40 \pm 0,17$ vs $2,33 \pm 2,86$ ng/ml) ($P > 0,05$) y se alcanzó dos horas antes (T_{max} : $2,86 \pm 0,59$ vs $4,29 \pm 0,43$ horas) que en el grupo C2 (cápsula intravaginal) ($P = 0,05$).

Después del pico máximo, las concentraciones de progesterona disminuyen en ambos grupos, hasta alcanzar las concentraciones de 0,5 ng/ml, consideradas representativas del desbloqueo hipotalámico de la secreción fásica de GnRH. El grupo C1 mantuvo valores por encima de este nivel hasta las 36 ± 2 horas, sin embargo en el grupo C2 esta situación se mantiene solo hasta las 28 ± 2 cuando las concentraciones de progesterona descendieron por debajo de los 0,5 ng/ml. Al final del experimento, 42 horas después de la aplicación de los tratamientos, los niveles medios de progesterona habían descendido hasta niveles basales en ambos grupos.

En la Tabla 7 aparecen los parámetros farmacocinéticos valorados en ambos grupos. La vía de administración de la progesterona afecta al comportamiento y a la disponibilidad de la misma. La progesterona se mantiene en plasma durante un mayor periodo de tiempo después de una administración intramuscular (C1) de 25 mg en vehículo oleoso, que administrando 120 mg en una cápsula intravaginal (C2) ($t_{1/2 \lambda}$: $8,87 \pm 0,09$ vs $6,45 \pm 6,51$ horas, respectivamente) ($P > 0,05$).

En las Tablas 8 y 10, aparecen los datos individualizados de las concentraciones plasmáticas de progesterona en cada muestra de sangre recogida cada 2 horas. En las Tablas 9 y 11 se muestran los parámetros farmacocinéticos más relevantes para el estudio.

El tiempo medio de residencia fue mayor en el grupo C1 que en el C2 (MRT: $18,07 \pm 0,83$ vs $14,54 \pm 0,42$ horas) ($P < 0,05$). Además, el tiempo que permaneció la progesterona en concentraciones superiores a los $0,5$ ng/ml fue diferente entre grupos, siendo mayor en el grupo C1 que en el C2 (36 ± 2 vs 28 ± 2 horas) ($P < 0,05$). Existen diferencias en la disponibilidad de la progesterona según la vía de administración; el área bajo la curva durante el periodo de muestreo fue mayor en la administración intramuscular que en la intravaginal (AUC: $42,78 \pm 1,02$ vs $39,23 \pm 7,70$ ng.h/ml) ($P < 0,05$).

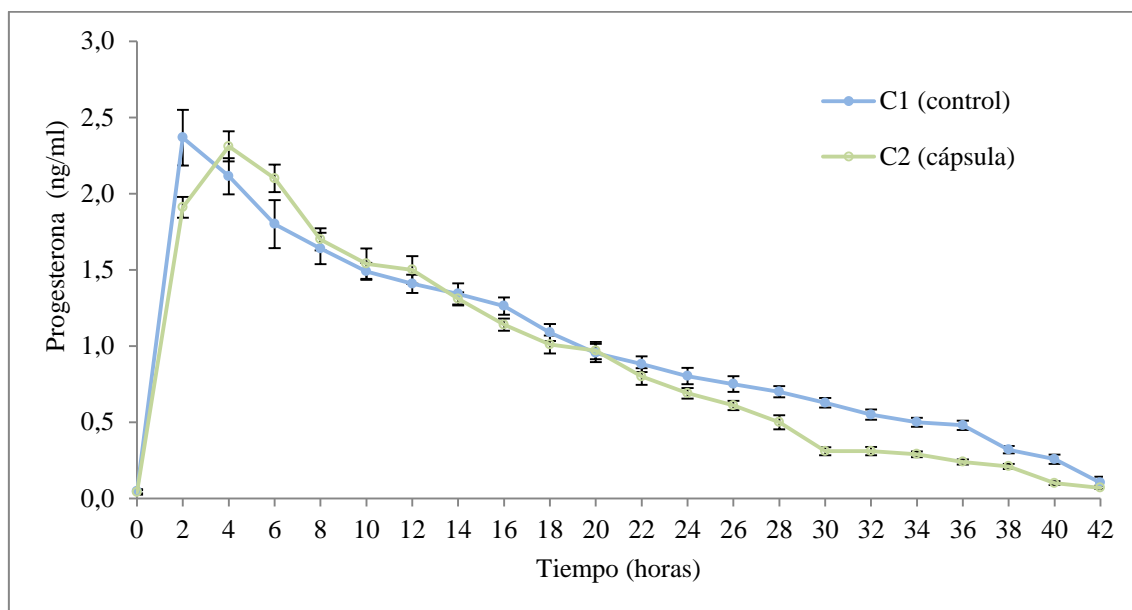


Fig.16. Evolución de las concentraciones plasmáticas de progesterona (media±S.E.M.) después de la administración de una inyección intramuscular de 25 mg de progesterona en vehículo oleoso (C1: grupo control) o mediante la aplicación de una cápsula intravaginal (C2: grupo cápsula) con 120 mg de progesterona, en cabras ovariectomizadas

Tabla 7.- Parámetros farmacocinéticos (media±S.D.) de progesterona en cabras ovariectomizadas después de la administración de una inyección intramuscular (25 mg) (C1: grupo control) o mediante la aplicación de una cápsula intravaginal (120 mg) (C2: grupo cápsula). Diferentes letras (a y b) indican diferencias significativas ($P < 0,05$)

Parámetros	Grupo C1 (intramuscular)	Grupo C2 (intravaginal)
T_{max} (h)	2,86±0,59 ^a	4,29±0,43 ^b
C_{max} (ng/ml)	2,4±0,17 ^a	2,33±2,86 ^a
AUC_{last} (ng×h/ml)	42,78±1,02 ^a	39,23±7,7 ^b
$t_{1/2\lambda}$ (h)	8,87±0,09 ^a	6,45±6,51 ^a
AUC_{∞} (ng×h/ml)	46,13±1,05 ^a	40,42±7,89 ^b
Vz(ml/kg)	6,85±1,52 ^a	27,77±5,82 ^b
Cl (ml/kg×h)	0,54±0,01 ^a	2,98±102,73 ^b
MRT_{last} (h)	14,92±0,4 ^a	13,35±0,28 ^b
MRT_{∞} (h)	18,07±0,83 ^a	14,54±0,42 ^b

C_{max} = concentración máxima de progesterona en plasma (pico)

T_{max} = tiempo en el que se alcanza la concentración máxima de progesterona

AUC_{last} = área bajo la curva de la concentración plasmática de progesterona respecto al tiempo, desde cero hasta 42 h.

$t_{1/2\lambda}$ = semivida de eliminación

AUC_{∞} = área bajo la curva de la concentración plasmática de progesterona respecto al tiempo, desde cero hasta el infinito.

Vz = volumen de distribución

Cl = aclaramiento total de la progesterona en plasma

MRT_{last} = tiempo medio de residencia desde tiempo cero hasta 42 h.

MRT_{∞} = tiempo medio de residencia desde cero hasta el infinito.

Resultados

Tabla 8.- Concentraciones plasmáticas individuales de progesterona (ng/ml) en las cabras del grupo control (inyección intramuscular de 25 mg de progesterona en aceite de oliva, 0,625 mg/kg) durante las 42 horas después de la administración (media±S.D.)

Tiempo(h)	1	2	3	4	5	6	7	Media	S.D.
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	2,22	1,86	2,42	3,14	2,03	2,90	2,00	2,37	0,18
4	1,90	1,92	2,21	2,40	1,82	2,65	1,90	2,11	0,12
6	1,53	1,53	1,35	1,71	2,20	2,53	1,75	1,80	0,16
8	1,35	1,43	1,34	1,97	1,62	1,90	1,87	1,64	0,10
10	1,41	1,36	1,32	1,43	1,57	1,73	1,61	1,49	0,06
12	1,26	1,39	1,30	1,21	1,60	1,58	1,52	1,41	0,06
14	1,20	1,32	1,22	1,10	1,52	1,60	1,44	1,34	0,07
16	1,30	1,15	1,19	1,02	1,44	1,41	1,33	1,26	0,06
18	1,05	1,12	1,15	0,81	1,30	1,12	1,07	1,09	0,06
20	0,96	1,01	0,99	0,75	1,25	0,82	0,90	0,95	0,06
22	0,95	0,83	0,87	0,67	1,06	0,78	1,01	0,88	0,05
24	0,90	0,75	0,91	0,63	1,01	0,65	0,77	0,80	0,05
26	0,82	0,67	0,88	0,53	0,91	0,66	0,78	0,75	0,05
28	0,79	0,64	0,76	0,57	0,82	0,60	0,72	0,70	0,04
30	0,75	0,59	0,70	0,51	0,67	0,58	0,59	0,63	0,03
32	0,67	0,45	0,64	0,43	0,52	0,58	0,56	0,55	0,03
34	0,61	0,49	0,54	0,48	0,42	0,39	0,57	0,50	0,03
36	0,53	0,37	0,61	0,46	0,45	0,42	0,52	0,48	0,03
38	0,42	0,28	0,39	0,33	0,25	0,30	0,27	0,32	0,02
40	0,40	0,24	0,19	0,30	0,15	0,23	0,29	0,26	0,03
42	0,32	0,10	LOQ	LOQ	0,07	0,12	0,09	0,14	0,04

(LOQ: por debajo del límite de cuantificación)

Tabla 9.- Parámetros farmacocinéticos (media±S.D.) individualizados, después de la administración intramuscular de una dosis 25 mg de progesterona (0,625 mg /Kg) en 2 ml aceite de oliva (modelo no compartimental)

Parámetros	1	2	3	4	5	6	7	Media	S.D.
T _{max} (h)	2	4	2	2	6	2	2	2,86	0,59
C _{max} (ng/ml)	2,22	1,92	2,42	3,14	2,2	2,9	2	2,40	0,17
AUC _{last} (ng·h/ml)	42,37	38,98	42,08	40,62	45,36	47,03	43,03	42,78	1,02
t _{½λ} (h)	9,8019	11,9851	0,9334	14,7968	2,2752	10,3302	11,9588	8,87	0,09
AUC _∞ (ng·h/ml)	47,07	43,0428	42,1148	47,3466	45,604	50,2562	47,4871	46,13	1,05
Vz(ml/kg)	7,5107	10,0428	0,7994	11,2718	1,7994	7,4137	9,0829	6,85	1,52
Cl (ml/kg·h)	0,5311	0,5808	0,5936	0,528	0,5482	0,4975	0,5265	0,54	0,01
MRT _{last} (h)	16,3002	15,1647	15,5751	13,3973	15,1451	13,5548	15,2782	14,92	0,40
MRT _∞ (h)	20,2784	19,3298	15,598	20,2097	15,3063	16,3375	19,4056	18,07	0,83

Tabla 10.- Concentraciones plasmáticas individuales de progesterona (ng/ml) en las cabras tratadas con cápsula intravaginal con 120 mg de progesterona en vehículo oleoso (3 mg/Kg) durante las 42 horas después de la administración (media±S.D.)

Tiempo(h)	1	2	3	4	5	6	7	Media	S.E.M.
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	2,07	1,76	2,23	1,74	1,80	1,93	1,87	1,91	0,07
4	2,52	2,11	2,65	2,07	2,54	2,00	2,31	2,31	0,10
6	1,87	1,90	2,32	1,83	2,43	2,12	2,23	2,10	0,09
8	1,43	1,81	1,95	1,65	1,85	1,72	1,49	1,70	0,07
10	1,21	1,67	1,88	1,46	1,77	1,61	1,20	1,54	0,10
12	1,23	1,65	1,71	1,30	1,80	1,57	1,24	1,50	0,09
14	1,14	1,41	1,36	1,28	1,31	1,48	1,22	1,31	0,04
16	1,05	1,12	1,30	1,14	0,99	1,25	1,13	1,14	0,04
18	1,03	0,90	1,13	0,97	0,87	1,30	0,90	1,01	0,06
20	1,01	1,00	1,06	0,96	0,71	1,18	0,86	0,97	0,06
22	0,77	0,84	0,85	0,62	0,70	1,07	0,72	0,80	0,05
24	0,75	0,73	0,81	0,54	0,62	0,65	0,70	0,69	0,03
26	0,71	0,67	0,69	0,53	0,51	0,60	0,59	0,61	0,03
28	0,63	0,46	0,67	0,44	0,43	0,32	0,55	0,50	0,05
30	0,30	0,29	0,42	0,20	0,37	0,28	0,34	0,31	0,03
32	0,34	0,25	0,40	0,23	0,32	0,22	0,38	0,31	0,03
34	0,33	0,25	0,32	0,22	0,29	0,24	0,35	0,29	0,02
36	0,27	0,20	0,27	0,19	0,28	0,20	0,29	0,24	0,02
38	0,26	0,18	0,25	0,19	0,20	0,15	0,27	0,21	0,02
40	0,08	0,07	0,15	0,13	0,09	0,06	0,12	0,10	0,01
42	0,11	0,07	0,08	0,09	LOQ	LOQ	0,10	0,09	0,01

(LOQ: por debajo del límite de cuantificación)

Tabla 11: Parámetros farmacocinéticos (media±S.D.) después de la administración de una cápsula intravaginal con 120 mg de progesterona (3 mg/Kg) en vehículo oleoso (modelo no compartimental)

Parámetros	1	2	3	4	5	6	7	Media	S.D.
T _{max} (h)	4	4	4	4	4	6	4	4,29	0,43
C _{max} (ng/ml)	2,52	2,11	2,65	2,07	2,54	2,12	2,31	2,33	2,86
AUC _{last} (ng·h/ml)	38,11	38,71	44,94	35,55	39,68	39,98	37,67	39,23	7,70
t _{½λ} (h)	9,7049	5,7097	2,4333	3,7106	8,6351	5,2514	9,7112	6,45	6,51
AUC _∞ (ng·h/ml)	40,3084	39,3671	45,2264	36,0308	41,6446	40,466	39,9288	40,42	7,89
Vz(ml/kg)	41,6823	25,1096	9,3145	17,8288	35,8977	22,4667	42,106	27,77	5,82
Cl (ml/kg·h)	2,977	3,0482	2,6533	3,3305	2,8815	2,9655	3,0054	2,98	102,73
MRT _{last} (h)	13,7754	13,3304	13,498	13,1449	12,7389	13,2391	13,7489	13,35	0,28
MRT _∞ (h)	16,0784	13,9464	13,7007	13,6014	14,6127	13,6755	16,1396	14,54	0,42

8.3.- Experimento 3: Descarga de LH y función luteal después de la introducción de los machos, en cabras tratadas con esponja intravaginal de FGA durante 30 horas y cápsula intravaginal de progesterona.

En todas las hembras incluidas en el experimento se confirmó la ausencia de actividad luteal mediante la determinación de las concentraciones plasmáticas de progesterona 9 días antes y en el momento de la introducción de los machos.

Las concentraciones de progesterona en todas las muestras fueron inferiores a 0,2 ng/ml, lo que demuestra la situación de anestro para todas las cabras en el momento de la introducción de los machos.

- Concentraciones plasmáticas de LH

La descarga preovulatoria de LH se observó en el 100% de los animales, independientemente del tratamiento aplicado.

En la Tabla 12 se muestran las medias y errores estándar de las concentraciones de LH calculadas a partir de los datos de los distintos animales dentro de cada grupo. En la tabla, se han hecho coincidir las concentraciones medias correspondientes a los picos preovulatorios, con las medias de tiempo que transcurren en cada grupo desde la introducción de los machos a dichos picos de LH. En el grupo A, la descarga preovulatoria de LH aparece a las 67 horas de la administración de la inyección intramuscular de progesterona. En el grupo B, donde se mantiene la esponja intravaginal de FGA durante 30 horas, la descarga preovulatoria de LH aparece 34 horas después de la retirada del dispositivo, mientras que el grupo C (cápsula intravaginal de progesterona), es donde el pico preovulatorio de LH se ve más adelantado, apareciendo 12 horas antes respecto del grupo de la esponja intravaginal.

Tabla 12. Medias de las concentraciones de LH (ng/ml) en los distintos grupos (A: inyección intramuscular de progesterona, B: esponja intravaginal de FGA durante 30 horas, y C: cápsula intravaginal de progesterona). En rojo se indica la concentración media del pico preovulatorio de cada grupo, coincidiendo con la media de tiempo que transcurre desde la introducción de los machos

Tiempo (h)	grupo A		grupo B		grupo C	
	Media	S.E.M	Media	S.E.M	Media	S.E.M
24	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0,09	0,27
32	0	0	0	0	0,14	0,39
36	0	0	0	0	0,21	0,30
40	0	0	0	0	0,46	0,48
44	0	0	0,17	0,47	0,55	0,34
48	0	0	0,57	0,60	1,83	1,47
52	0,69	0,82	0,92	0,59	13,95	4,58
56	1,10	0,65	0,94	0,72	2,84	4,20
60	1,39	0,74	2,03	1,36	0,38	0,27
64	1,75	0,32	18,41	4,95	0,38	0,55
68	20,51	3,75	6,98	5,76	0,07	0,16
72	2,68	0,37	1,02	0,75	0	0
76	0,79	0,65	0,29	0,57	0	0
80	0,16	0,40	0	0	0	0
84	0	0	0	0	0	0

Los intervalos entre la introducción de los machos y la descarga preovulatoria de LH se muestran en la Tabla 13, así como los perfiles de secreción medios de esta hormona para cada uno de los grupos en la Figura 17.

El pico de LH del grupo C (cápsula intravaginal de progesterona) es el primero en aparecer ($53,3 \pm 2,45$ horas). La descarga de LH aparece en segundo lugar en el grupo B (esponja intravaginal 30 horas) ($65,3 \pm 1,68$ horas), y por último en el grupo A (inyección intramuscular) a las $67,3 \pm 4,67$ horas. Según estos datos, la cápsula intravaginal tendría un periodo eficaz de mantenimiento de niveles plasmáticos de progesterona inferior a las 30 horas, que es el periodo que se han mantenido las esponjas intravaginales de FGA.

A pesar de esto, no existen diferencias significativas entre los tres grupos ($P > 0,05$), es decir que todos los tratamientos son eficaces a la hora de retrasar la descarga preovulatoria de LH a partir del momento de la introducción de los machos.

Tabla 13. Horas desde la introducción de los machos al pico preovulatorio de LH (media \pm SEM). La misma letra (a) indica que no existen diferencias significativas ($P > 0,05$)

Grupo	Macho/LH
A	67,3 \pm 4,67 ^a
B	65,3 \pm 1,68 ^a
C	53,3 \pm 2,45 ^a

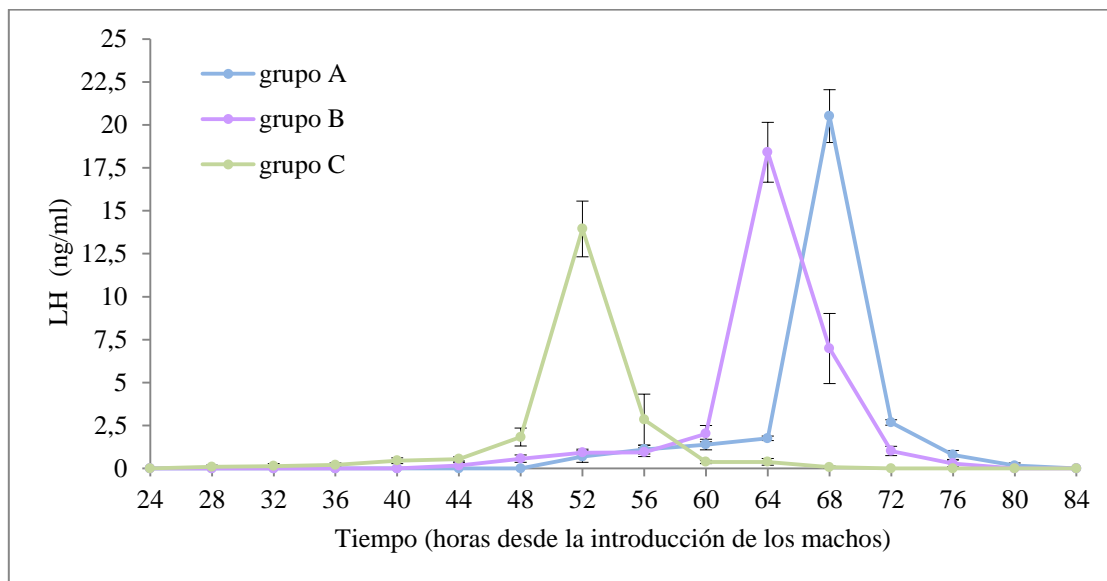


Fig.17. Descarga preovulatoria de LH (media \pm SEM) después de la introducción de los machos en cabras tratadas con: inyección intramuscular de 25 mg de progesterona en vehículo oleoso (grupo A), esponja intravaginal de 20 mg FGA mantenida durante 30 horas (grupo B) y cápsula de gelatina intravaginal de 120 mg de progesterona (grupo C)

- Concentraciones plasmáticas de progesterona

En la Tabla 14 se pueden observar las medias de las concentraciones de progesterona en un periodo de 9 días desde la introducción de los machos, en cada uno de los tres grupos (A: inyección intramuscular de progesterona, B: esponja intravaginal de FGA 30 horas y C: cápsula intravaginal de progesterona). Independientemente del tratamiento aplicado, se evitan los ciclos cortos y todos los animales desarrollan un ciclo inducido de duración normal.

El perfil de liberación de progesterona correspondiente a la actividad luteal del nuevo ciclo inducido está asociado al tipo de tratamiento que se aplica, así como a su duración.

Tabla 14. Medias por grupos de las concentraciones de progesterona durante los nueve días siguientes a la a la introducción del macho. Diferentes letras (a y b) indican diferencias significativas ($P < 0,05$)

Grupo	d0	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9
A	0 ^a	1,274 ^a	0,449 ^a	0,092 ^a	0,057 ^a	0,197 ^a	0,705 ^a	1,323 ^a	2,296 ^a	2,664 ^a
B	0 ^a	0 ^b	0 ^b	0 ^a	0,007 ^a	0,133 ^a	0,689 ^a	1,216 ^a	1,820 ^a	2,336 ^a
C	0 ^a	0,696 ^a	0,059 ^b	0,001 ^a	0,110 ^a	0,370 ^a	0,940 ^a	1,33 ^a	1,708 ^a	2,04 ^a

Al inicio del experimento todas las cabras estaban en anestro, según los resultados de niveles de progesterona en las dos muestras previas al inicio del tratamiento. En la Figura 18 se muestran estos perfiles con las concentraciones medias, durante los nueve días posteriores a la introducción del macho y aplicación de cada uno de los tratamientos en cada grupo.

Si observamos este patrón aparecen dos periodos bien definidos, uno comprende los primeros cuatro días (d0-d3), y el otro los cinco días restantes (d4-d9). Los incrementos de las concentraciones de progesterona en los primeros tres días post-tratamiento corresponden a la progesterona administrada por vía intramuscular o intravaginal en los grupos A y B, sin diferencias significativas entre cápsula o inyección ($P > 0,05$). En el caso del grupo C (esponja intravaginal), la FGA no es detectada por el anticuerpo específico de progesterona en el análisis de RIA, por esa razón las concentraciones tienen valor 0.

En el segundo periodo (d4-d9), no existen diferencias significativas entre tratamientos en ninguno de los días de este periodo ($P > 0,05$). En los tres grupos, independientemente del tratamiento aplicado, a partir del día 4 hasta el día 9 se incrementan las concentraciones de progesterona sin diferencias significativas en las medias de cada día entre grupos, correspondiendo estas concentraciones con los niveles normales de secreción de progesterona durante la fase luteal. Aunque sin diferencias significativas, se aprecia que el grupo al que se le administró la cápsula intravaginal

inicia la secreción luteal unas horas antes que los otros dos grupos, lo que estaría en conformidad con la descarga más precoz de LH reflejada en la Figura 17.

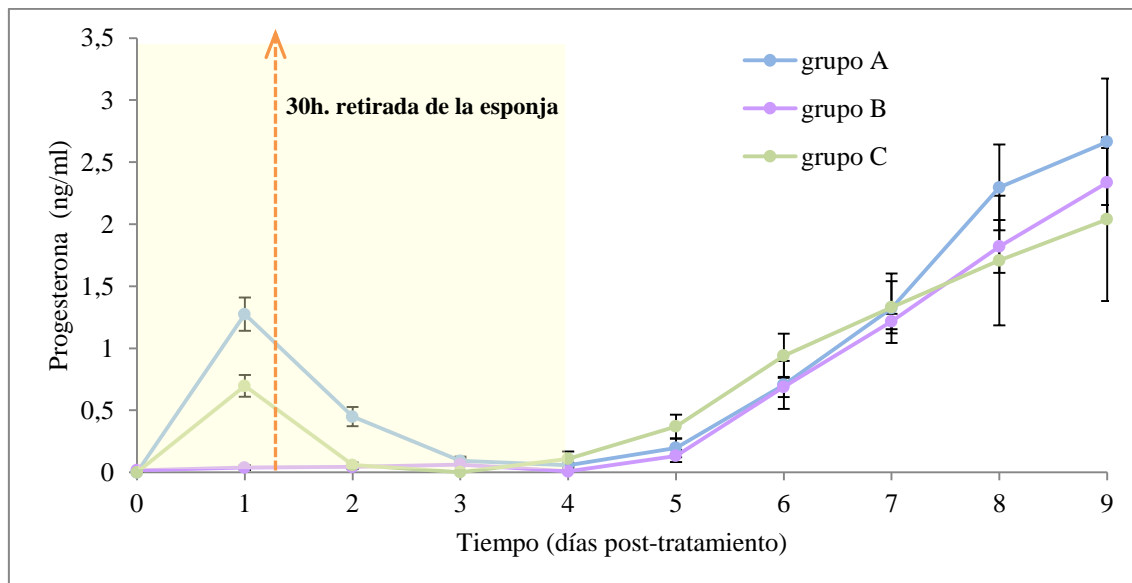


Fig.18. Evolución de concentraciones plasmáticas de progesterona (media±S.E.M.) durante los nueve días siguientes a la introducción del macho (grupo A: inyección intramuscular de progesterona; grupo B: esponja intravaginal de FGA; grupo C: cápsula intravaginal de progesterona)

8.4.- Experimento 4. Fertilidad en cabras con ovulación inducida mediante efecto macho, y tratadas con una cápsula intravaginal de progesterona, sustituyendo a la inyección intramuscular en el protocolo IMA-PRO2®

8.4.1.- Experimento 4.1: Fertilidad en cabras utilizando el método IMA-PRO2®, tratadas con inyección intramuscular de progesterona o cápsula intravaginal en el momento de introducción de los machos

En la Tabla 15 se muestran los resultados del experimento 4.1 en dos explotaciones. En las explotaciones 1 y 2 se muestran las hembras tratadas con inyección intramuscular de 25 mg de progesterona (grupos G1 y G3) frente a las tratadas con cápsula intravaginal de 120 mg de progesterona (G2 y G4), en el momento de la introducción de los machos y siguiendo posteriormente el protocolo IMA-PRO2® según el cual se aplican 75 µg de cloprostenol 9 días después de la introducción de los

machos. Todas las hembras fueron inseminadas 55 horas después de la inyección de cloprostenol. No existen diferencias significativas entre grupos ($P=0,5$ y $P=0,2$ para las explotaciones 1 y 2 respectivamente).

A pesar de que los datos no son estadísticamente significativos entre grupos, sí se observa una ligera diferencia, con resultados de fertilidad algo inferiores en el grupo de hembras que fueron inseminadas después de ser tratadas con cápsula intravaginal.

Tabla 15. Tasas de gestación en cabras inseminadas con el método IMA-PRO2 con tratamiento de progesterona en el momento de la introducción de los machos mediante inyección intramuscular (grupos G1 y G3) o mediante aplicación de una cápsula intravaginal de progesterona (G2 y G4). La misma letra (a) indica que no existen diferencias significativas entre grupos dentro de una misma explotación ($P > 0,05$)

EXPLOTACIÓN	GRUPO	TRATAMIENTO	ANIMALES (n)	MUERTAS/ PERDIDAS	TASA de GESTACIÓN	PORCENTAJE de GESTACIÓN
1	G1	IMA-PRO2®	68	4	36/64 ^a	56,2 %
	G2	CÁPSULA I.V.	60	1	30/59 ^a	50,8 %
2	G3	IMA-PRO2®	50	2	28/48 ^a	58,3 %
	G4	CÁPSULA I.V.	50	1	23/49 ^a	46,9 %

G1 y G3: IMA-PRO2® inyección intramuscular de 25 mg de progesterona en el momento de la introducción de los machos, 9 días después una inyección de 75 µg de cloprostenol
 G2 y G4: CÁPSULA I.V., aplicación de una cápsula intravaginal con 120 mg de progesterona en el momento de la introducción de los machos, 9 días después una inyección de 75 µg de cloprostenol

8.4.2.- Experimento 4.2: Fertilidad en cabras utilizando el método IMA-PRO2, con cápsula intravaginal de progesterona, y tratamiento hormonal de esponjas intravaginales de FGA durante 11 días y administración de eCG.

En la Tabla 16 se muestran los resultados del experimento 4.2. (Explotación 3). En la explotación 3 aparecen las cabras tratadas con el protocolo hormonal clásico para inducción y sincronización de ovulaciones (G5), y las tratadas con cápsula intravaginal de 120 mg de progesterona y efecto macho (G6) con inyección de cloprostenol 9 días después. En el primer grupo las hembras fueron inseminadas a las 46 horas después de la retirada de la esponja, y en el segundo grupo a las 55 horas después de la inyección de cloprostenol. En este experimento tampoco existieron diferencias significativas de fertilidad en las hembras cuando se aplica

Resultados

uno u otro tratamiento ($P=0,2$), aunque de igual manera que en el experimento anterior, los datos de fertilidad que se alcanzan en el grupo de hembras tratadas con cápsula intravaginal son ligeramente inferiores que con el protocolo clásico.

Tabla 16. Tasa de gestación en cabras inseminadas después de la aplicación del protocolo clásico de sincronización con esponjas intravaginales de FGA y eCG (G5) y el protocolo IMA-PRO2 con cápsulas intravaginales de progesterona (G6). La misma letra (a) indica que no existen diferencias significativas entre grupos dentro de una misma explotación ($P > 0,05$)

EXPLOTACIÓN	GRUPO	TRATAMIENTO	ANIMALES (n)	MUERTAS/ PERDIDAS	TASA de GESTACIÓN	PORCENTAJE de GESTACIÓN
3	G5	PROTOCOLO CLÁSICO	72	2	45/70 ^a	64,2 %
	G6	CÁPSULA I.V.	72	0	39/72 ^a	54,1 %

G5: PROTOCOLO CLÁSICO, esponja intravaginal de 20 mg de FGA durante 11 días, en el día 9 se administra 300UI de eCG y 75 µg de cloprostenol

G6: CÁPSULA I.V., aplicación de una cápsula intravaginal con 120 mg de progesterona en el momento de la introducción de los machos y 9 días después una inyección de 75 µg de cloprostenol

DISCUSIÓN

De los resultados expuestos en esta memoria se podría concluir que los tratamientos progestativos en el momento de la introducción de los machos son un método eficaz para evitar la aparición del primer ciclo corto en las hembras donde se aplica el efecto macho. De esta manera se puede conseguir una mejor calidad de la ovulación, retrasando la descarga preovulatoria de LH y consiguiendo mejoras de la fertilidad en la primera ovulación inducida.

En este sentido, con estos experimentos hemos demostrado, que el método original de la aplicación de cápsulas intravaginales de gelatina con un contenido de 120 mg de progesterona en vehículo oleoso con aceite de palma y lecitina de soja, es una buena alternativa a la administración intramuscular de progesterona, prohibida expresamente por las directivas europeas.

La respuesta al efecto de la presencia de los machos (efecto macho) como método de estímulo capaz de alterar en pocos minutos la pulsatilidad de la GnRH y la LH e inducir la ovulación, es un mecanismo que ha sido extensamente estudiado en la especie caprina, siendo una de las mayores limitaciones de la actividad ovulatoria inducida, la aparición de ciclos cortos, caracterizados por una secreción baja y transitoria de progesterona por parte del cuerpo lúteo generado (Ott et al., 1980).

Los estudios realizados sobre dinámica folicular mediante ultrasonografía, han puesto de manifiesto la evolución en el crecimiento folicular después del estímulo ovárico inducido por los machos (Bartlewsky et al., 2002).

González-Bulnes et al. (2006) en un estudio sobre dinámica folicular por medio de ultrasonografía transrectal en cabras de raza Murciano-Granadina en periodo de anestro estacional, inducidas a ovular mediante el efecto macho con o sin tratamiento de progesterona, demostraban que el retraso en la aparición de los síntomas de celo y la ovulación en respuesta al efecto macho, vienen determinados por la presencia de folículos en estadios de desarrollo incompatibles con el inicio del proceso ovulatorio.

Estos folículos entran en una fase de atresia o se mantienen estáticos poco después de la introducción de los machos, haciéndose necesaria la secuencia del inicio de una segunda onda de crecimiento folicular. El uso de una dosis única de progesterona evita este problema y permite la aparición de los síntomas de celo y la subsiguiente ovulación de forma sincronizada en todos los animales tratados, ya que los folículos más jóvenes disponen de un periodo mayor del estímulo generado por la mayor

frecuencia de pulsos de LH, y responden con sintomatología de celo y ovulación. (González-Bulnes et al., 2006).

La eliminación de la aparición de ciclos cortos después de la introducción de los machos, ha pasado básicamente por la utilización del tratamiento combinado con progesterona o progestágenos previos al efecto macho, los altos niveles de progesterona plasmática, incrementan el periodo durante el cual los folículos se mantienen estimulados por los incrementos en la secreción de gonadotropinas (Chemineau et al., 1985).

Han sido muchos los experimentos que han abordado la problemática de cuál es la duración idónea de estos tratamientos progestativos en combinación con el efecto macho. Chemineau et al. (1985) demostraron la eficacia tanto de los tratamientos de larga duración, manteniendo esponjas intravaginales impregnadas en FGA durante 17 días, como de la administración de una única dosis intramuscular de FGA en el momento de la introducción de los machos.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio están en concordancia con otros autores, respecto de la capacidad de los tratamientos progestativos para suprimir los ciclos cortos, habiéndose demostrado con este experimento que incluso el periodo más reducido, 24 horas, es capaz de inducir la ovulación seguida de un ciclo de duración normal en el 100% de las hembras tratadas.

Los tratamientos largos con progestágenos antes de la introducción de los machos, sincronizan la ovulación inducida, debido a los incrementos en el periodo de pulsatilidad de la LH, mientras se mantienen altas las concentraciones plasmáticas de progesterona (Evans et al., 2003), de esta forma se alcanza un alto grado de sincronización del celo que permite la utilización de la IA a tiempo fijo, con altos índices de fertilidad (Pellicer-Rubio et al., 2008).

Entre las ventajas de los tratamientos largos encontramos un aumento en la fertilidad en esa primera ovulación (Chemineau et al., 1985) y la supresión total de los cuerpos lúteos de corta duración lo que supone una mejor sincronización de los celos (Chemineau et al., 2006).

Sin embargo, los tratamientos progestativos de larga duración también presentan sus inconvenientes ya que se ha demostrado su efecto sobre alteraciones a nivel

sistémico en el patrón de secreción de LH (Rubianes et al., 2003), y a nivel ovárico sobre los patrones de crecimiento y dominancia folicular (Driancourt., 2000).

La inserción en hembras en anestro de un dispositivo intravaginal de progesterona o análogos, provoca un incremento brusco de las concentraciones plasmáticas de esta hormona, estos niveles de progesterona son equivalentes a los que aparecen de manera natural en la fase luteal media-tardía (>5ng/ml) del ciclo estral, y se mantienen así durante los 3-4 primeros días después de la inserción del dispositivo (Rubianes et al., 1998). Después de 6 días de tratamiento las concentraciones plasmáticas de progesterona decrecen hasta niveles subluteales (2ng/ml) y permanecerán así hasta el final del tratamiento.

Los niveles subluteales de progesterona plasmática tienen consecuencias negativas, ya que promueven un inadecuado desarrollo folicular y la persistencia de grandes folículos estrogénicos, ya que incrementa la frecuencia de los pulsos de LH pero sin que permitan la descarga fásica preovulatoria de dicha hormona. En consecuencia, los grandes folículos persisten y la dominancia folicular se prolonga en el tiempo, finalmente la ovulación de estos folículos viejos se traduciría en una disminución de la fertilidad (Menchaca et al., 2004).

Los tratamientos intravaginales de larga duración también tiene sus inconvenientes a nivel del tracto genital femenino, ya que provocan alteraciones en la fisiología vaginal y cervical, debido al efecto persistente de la progesterona, afectando negativamente a la fertilidad de las hembras (Abecia et al., 2011).

Actualmente está bien documentado que el patrón de ondas foliculares que presentan las cabras es generalmente de cuatro ondas por ciclo, emergiendo una nueva onda cada 5-7 días (Ginther y Kot, 1994). El conocimiento y comprensión de la dinámica folicular en la especie caprina, ha llevado a establecer nuevas estrategias para el control del desarrollo folicular utilizando exposiciones cada vez más cortas de imprimación progestativa, dentro del marco de tiempo de los intervalos entre ondas (4-7 días) (Inya y Sumretprasong, 2013).

Rubianes et al. (1998), demostraron que un protocolo corto de imprimación progestativa (5 días) asociado a una dosis de eCG, era eficaz a la hora de inducir la ovulación en cabras en periodo de anestro estacional, consiguiendo tasas de fertilidad del 60%.

Simões et al. (2008), aplicaron un tratamiento de 6 días con 20 mg de FGA en cabras de raza Serrana en periodo de anestro estacional. En este estudio las hembras fueron estimuladas por la presencia del macho (efecto macho), inseminadas una única vez y obtuvieron tasas de fertilidad del 62,5 %.

En un estudio similar, Maia et al. (2009) obtuvieron tasas de fertilidad del 61,1% en cabras Saanen cuando se administró un dispositivo CIDR[®] (progesterona) durante 5 días, en el momento de la introducción de los machos.

Los efectos negativos de los tratamientos progestativos de larga duración asociados al uso del efecto macho se pueden evitar por lo tanto, con la utilización de tratamientos más cortos. Cognié et al. (1982) en ganado ovino y Chemineau et al. (1985) en ganado caprino, demostraron la efectividad de la administración de bajas dosis de progesterona o progestágenos por vía intramuscular en el momento de la introducción de los machos.

Teniendo en cuenta que el objetivo principal de este trabajo era el desarrollo de un método alternativo a esta vía intramuscular, utilizando la vía intravaginal, el primer punto que se planteó en este estudio fue cuál sería la duración mínima necesaria de altas concentraciones plasmáticas de progesterona, capaces de mantener la alta frecuencia de secreción de LH, evitando la presencia de ciclos cortos post ovulatorios.

En el experimento 1 se aplicaron dispositivos intravaginales de FGA durante 24, 48 y 72 horas. Los resultados demuestran que 24 horas es un periodo suficiente de mantenimiento de niveles circulantes del progestágeno para evitar la presencia de un ciclo corto e inducir celo y ovulación después del efecto macho.

Sin embargo existen diferencias en la respuesta, cuando se compara con los grupos de 48 y 72 horas de permanencia del tratamiento, principalmente en el intervalo entre la retirada del tratamiento progestativo y la aparición de la descarga preovulatoria de LH.

Los intervalos entre la introducción de los machos y la descarga preovulatoria de LH fueron, $58 \pm 2,7$ horas, $83,3 \pm 2,2$ horas y $102 \pm 1,4$ horas para los grupos A2, A3 y A4 respectivamente. Estos resultados demuestran que mientras las hembras mantuvieron el dispositivo intravaginal, la FGA bloqueó la descarga preovulatoria de LH en todos los grupos con independencia de la duración del tratamiento.

Esto se encuentra en coincidencia con las observaciones realizadas en otras especies, Knights et al. (2000) apuntaron que el tiempo mínimo necesario de exposición a la progesterona para una optimización de la respuesta al efecto macho en ovejas debía ser de 3 a 5 días, sin aportar ninguna ventaja en término de respuesta al efecto macho el incremento de la duración del tratamiento.

En hembras cíclicas el crecimiento folicular terminal, la descarga preovulatoria de LH y la ovulación son procesos que se instauran a partir de la luteolisis en los últimos días del ciclo estral (Karsch et al., 1979). Estudios realizados con ovejas a las que se les inducía la luteolisis administrando análogos de la prostaglandina $F_{2\alpha}$, el intervalo entre el inicio de la luteolisis y la ovulación fue de $57,1 \pm 3,8$ horas (Wheeler et al., 1975).

Mori y Kano (1984) en un experimento realizado con cabras Shiba, obtuvieron un intervalo inicio de la luteolisis-pico de LH de cerca de 65 horas, similar al alcanzado en ovejas en los estudios anteriores.

En nuestro trabajo, el grupo con periodo de mantenimiento del tratamiento progestativo durante 72 horas, induce una respuesta más precoz y más sincronizada de la descarga preovulatoria de LH ($30 \pm 1,4$ horas) respecto de los grupos de 24 y 48 horas ($34 \pm 2,7$ y $35 \pm 2,2$ horas respectivamente) ($P > 0,05$).

Estas concentraciones plasmáticas de progestágeno durante 72 horas, se corresponderían en condiciones fisiológicas con el periodo de mantenimiento del cuerpo lúteo durante la luteolisis, permitiendo que el folículo preovulatorio se mantenga más tiempo madurando, respecto de los otros dos grupos.

Maia et al. (2009), al mantener un dispositivo CIDR[®] durante 5 días en cabras Saanen y estimularlas mediante el efecto macho, obtuvieron un intervalo entre la retirada del dispositivo intravaginal y el pico preovulatorio de LH de entre 55-60 horas. La diferencia de horas entre este estudio y el nuestro, pueden deberse por un lado a las características intrínsecas de la estacionalidad reproductiva de las cabras de raza Saanen, con un anestro estacional más profundo que en la raza Murciano-Granadina, y por otro lado al tipo de tratamiento utilizado, ya que pueden existir diferencias en los periodos de aclaramiento plasmático de ambos tratamientos después de su retirada.

En latitudes tropicales (20° N) en situación de anestro menos profundo en cabras lecheras, un tratamiento progestativo (0,3 g de progesterona) vía intravaginal

durante 5 días asociado con efecto macho, daba como resultado un intervalo de alrededor de 33 horas desde la retirada del dispositivo a la aparición del celo, y la tasa media de fertilidad alcanzada fue de 70,5% (Simões, 2015).

El objeto del tratamiento progestativo es retardar el pico de LH, facilitando y prolongando la exposición de los folículos en desarrollo al efecto de las gonadotropinas. El tiempo de imprimación de la progesterona es uno de los factores que puede modificar el desarrollo folicular, interviniendo de esta forma en los procesos de maduración previos al momento de la ovulación (Rosa y Bryant, 2002).

Cuando las ondas foliculares se desarrollan bajo un mantenimiento continuo de altas concentraciones plasmáticas de progesterona, los folículos de esa cohorte, permanecen en un diámetro más reducido respecto de aquellos que se desarrollan bajo concentraciones más bajas de esta hormona (Ginther y Kot, 1994).

La inducción de altas concentraciones plasmáticas de progesterona durante la fase luteal temprana, afecta a la vida media del folículo de mayor tamaño de la primera onda folicular, acelerando el intercambio o “turnover” debido a una rápida pérdida del feed back negativo sobre ese folículo de mayor tamaño, provocando de esta manera el resurgimiento de la segunda onda folicular, que generará nuevos folículos jóvenes y sanos (Menchaca y Rubianes, 2002). La concentración de progesterona juega un papel esencial en el control de la renovación folicular. Este efecto está mediado principalmente por el control que ejerce esta hormona sobre la pulsatilidad de la LH (Savio et al., 1993), hormona esencial para la supervivencia del folículo dominante en las últimas etapas de desarrollo folicular (Baird et al., 1991).

La mayor duración del tratamiento progestativo después de la introducción de los machos, no solo implica una reducción del intervalo entre la retirada del tratamiento y la descarga preovulatoria de LH, sino también una mayor sincronización de la ovulación y una mayor precocidad de la plena capacidad funcional del cuerpo lúteo.

Si consideramos el tiempo que tarda en alcanzar la progesterona del ciclo inducido, unos niveles plasmáticos por encima de los 0,5 ng/ml, nuestros resultados pusieron de manifiesto que, este intervalo era de 4 días para el grupo de 72 horas de tratamiento y más prolongado para los otros dos grupos, 4,2 y 5,3 días respectivamente para el de 48 y 24 horas. Aunque estas diferencias no eran significativas los resultados hacen pensar en una luteinización más rápida de las células foliculares (células mayores

luteales que provienen de la granulosa) (Farin et al., 1986) debido al periodo más prolongado de acción de la alta frecuencia de pulsos de LH sobre estas células en la fase folicular.

Otra observación respecto de la secreción de progesterona del ciclo inducido, comparando el grupo de las 24 horas con los otros dos, fue que en el grupo de animales sometidos a 24 horas de tratamiento progestativo, la progesterona no sólo tardó más en llegar a los 0,5 ng/ml, sino que las concentraciones máximas alcanzadas fueron mucho más bajas (1,8 ng/ml vs 4,28 y 4,07 ng/ml), menos de la mitad de las concentraciones de los otros dos grupos. Analizando el trazado de la evolución de las concentraciones de la hormona en el grupo A2 (24 horas), a falta de más días de muestreo, se aprecia un descenso de esos niveles a partir del día 8, lo que puede indicar una peor calidad del cuerpo lúteo generado en el ciclo inducido.

Según hemos señalado anteriormente, el proceso de crecimiento folicular terminal y la ovulación sólo tienen lugar una vez que se instaura la luteolisis. En el grupo de cabras tratadas con una inyección intramuscular de 25 mg de progesterona, el intervalo entre la entrada de los machos y la descarga de LH fue de $66,7 \pm 4,2$ horas, esto implica que el periodo efectivo de acción bloqueante de la progesterona debió situarse entre las 24 y 48 horas, si tenemos en cuenta que los intervalos entre retirada del tratamiento progestativo y la descarga de LH de estos dos grupos fue de $58 \pm 2,7$ y $83 \pm 2,2$ horas respectivamente.

Esta hipótesis coincide con las observaciones realizadas en cabra criolla de Guadalupe por Chemineau en 1985, cuando al aplicar una dosis única intramuscular de 5,2 mg FGA en vehículo oleoso observó un intervalo de $72,6 \pm 9,4$ horas, desde la introducción de los machos a la descarga de LH. De igual manera Martin et al. (1980) en estudios con ovejas, al aplicar una inyección oleosa de 10 mg de progesterona vía intramuscular utilizando el efecto macho, el intervalo desde la introducción de los mismos y el pico preovulatorio de LH fue de aproximadamente 60 horas.

Intervalos de tiempo similares, también en ganado ovino, fueron descritos por Cognié et al. (1982) cuando aplicaron vía intramuscular una inyección de 20 mg de progesterona en vehículo oleoso en el momento de la introducción de los machos.

Lassoued et al. (1995), realizaron un estudio en ambas especies, aplicando una dosis única de 20 mg de progesterona en el momento de la introducción de los machos, consiguieron retrasar el pico de la LH hasta las $58,8 \pm 10,1$ horas, frente a las $20,5 \pm 10,7$ horas del grupo control, sin tratamiento.

Si analizamos los intervalos para cada grupo entre el descenso a 0,5 ng/ml de la progesterona inyectada o los progestágenos retirados y el pico de LH, no aparecen diferencias significativas entre grupos (31 horas, 28 horas, 29 horas y 24 horas para los grupos A1, A2, A3 y A4 respectivamente). Se ve ligeramente adelantado el grupo A4 (72 horas) respecto a los demás, posiblemente debido a la duración del tratamiento. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Vilariño et al. (2011) cuando al aplicar en cabras un protocolo progestativo mediante CIDR durante 5 días, el intervalo entre el descenso a 0,5 ng/ml de la progesterona y el pico de LH fue de aproximadamente 30-35 horas.

Si atendemos, por otro lado, al intervalo entre el pico preovulatorio de LH y el momento en el que la progesterona alcanza los 0,5 ng/ml para cada grupo, podemos comparar y valorar el tiempo que tarda ese cuerpo lúteo en formarse y ser activo. Los tiempos fueron 71 horas, 93 horas, 66 horas y 66 horas para los grupos A1, A2, A3 y A4 respectivamente. La mayor diferencia se puede apreciar en el grupo que mantuvo el dispositivo progestativo durante menos tiempo (24 horas), este retraso en el incremento de la progesterona puede ser debido a la calidad del cuerpo lúteo generado. A pesar de que el tratamiento de 24 horas es eficaz a la hora de suprimir los ciclos cortos e inducir ovulaciones, la imprimación progestativa no es tan eficiente como en los otros grupos, generando un cuerpo lúteo de peor calidad que secreta progesterona a concentraciones más bajas y de manera más tardía, lo que podría tener un efecto negativo a la hora de mantener la viabilidad del embrión (Meites et al., 1951; Wildeus, 2000).

Los resultados del experimento 1 demostraban que cualquier tratamiento de progesterona o progestágenos capaz de mantener niveles plasmáticos durante más de 24 horas, sería capaz de suprimir los ciclos cortos e inducir ovulaciones de calidad precedidas de sintomatología de celo, después de realizar un efecto macho en cabras en anestro.

Partiendo de este punto se diseñó el experimento 2, con el fin de conseguir un tratamiento que por vía intravaginal consiguiera los niveles plasmáticos de progesterona, en concentraciones y duración, capaces de ser efectivos en un mismo tipo de protocolo.

En la Unión Europea, el Reglamento N° 37 /2010 de la Comisión de 22 de diciembre de 2009, establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal. En este Reglamento obligatorio y directamente aplicable a cada Estado miembro, la utilización de la progesterona y progestágenos como el acetato de fluorogestona y el acetato de medroxiprogesterona únicamente están permitidos para uso intravaginal con fines zootécnicos.

Según los resultados del experimento 1, un tratamiento que mantenga niveles plasmáticos altos de progesterona durante al menos 24 horas, puede ser efectivo para optimizar la respuesta al efecto macho, induciendo ovulaciones sincronizadas sin presencia de ciclos cortos.

Conforme a estas restricciones del uso de la progesterona y análogos, y atendiendo a los resultados alcanzados en el experimento 1, desarrollamos una alternativa al uso de la inyección intramuscular de esta hormona, utilizando la vía intravaginal. En el experimento 2, se diseñó y testó una cápsula de gelatina para la aplicación intravaginal de progesterona.

Para el diseño de la cápsula consideramos los experimentos desarrollados previamente en administración intravaginal de hormonas esteroideas en humanos. Buckler et al. (1988), realizaron un estudio en mujeres a las que se les aplicaba 50 mg de progesterona dos veces al día mediante un supositorio vaginal durante 14 días antes de inducirles la ovulación. Con esta técnica se alcanzaban y mantenían las concentraciones plasmáticas de progesterona en el rango normal de la fase luteal del ciclo, además conseguían suprimir la pulsatilidad de la LH durante los primeros 10 días.

Nahoul et al. en 1993, también en humanos, aplicaron vía intravaginal mediante una cápsula de gelatina, una dosis única de 100 mg de progesterona. Esta aplicación generaba un rápido incremento de los niveles séricos de progesterona hasta alcanzar su máximo nivel a las 6 horas con una concentración máxima de 5 ng/ml. Las concentraciones se mantenían en este rango cerca de las 24 horas y permanecían por

encima de la línea basal hasta las 48 horas. Si se duplicaba la dosis incluida en la cápsula de gelatina intravaginal, las concentraciones se mantenían por encima de los 2,5 ng/ml durante 72 horas (Kleinstein et al., 2002).

En un estudio realizado con geles de base oleosa que contenían 90 mg de progesterona micronizada, se comprobó como una única aplicación intravaginal resultaba en un incremento de los niveles de progesterona hasta un máximo de 10 ng/ml después de 8 horas (Levine et al., 2000).

Después de una aplicación intravaginal de progesterona, los niveles plasmáticos de la hormona alcanzan su concentración máxima entre las 3 y 8 horas, dependiendo de la formulación utilizada como vehículo (Artini et al., 1995). La progesterona es una hormona esteroidea que deriva del colesterol y presenta características lipofílicas. Su limitada solubilidad en agua requiere de una base oleosa para mejorar su absorción (Bernadett et al., 2013).

Las matrices hidrófobas están formadas por un lípido sólido, frecuentemente ácidos grasos, que constituye el soporte matricial en el que se encuentra disperso el principio activo (Vila y Delgado, 1992). Estas matrices constituyen una interesante alternativa para la obtención de niveles sostenidos en plasma de una sustancia hidrofóbica.

Los aceites vegetales son componentes adecuados para la formulación de formas farmacéuticas de liberación controlada (Reitz y Kleinebudde, 2007; Martini et al., 2000). En nuestro diseño incluimos el aceite de palma como vehículo para facilitar la absorción y alargar la biodisponibilidad de la hormona.

La lecitina de soja fue incluida como uno de los excipientes en la formulación del contenido en la cápsula. Las lecitinas tienen características tensoactivas que mejoran la absorción del fármaco al disminuir la tensión superficial de las sustancias liposolubles, facilitando su disolución (Van Hoogevest y Wendel, 2014).

Otro de los excipientes añadidos con objeto de aumentar la solubilidad y estabilidad de la progesterona, fue la ciclodextrina. Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos con una alta solubilidad en agua (Stella y G.He, 2008). La principal base de su uso farmacéutico se debe a su estructura, la conformación espacial de las ciclodextrinas es de tipo tronco-cónica (Loftsson et al., 2005), con un marcado carácter hidrofílico hacia el exterior del cono, e hidrofóbico en su cavidad interior. Esta

conformación es la responsable de la solubilidad en agua de las ciclodextrinas, al mismo tiempo que presentan una gran capacidad de encapsular moléculas hidrofóbicas en el interior (Barreto y Cunha-Fihlo, 2008).

Para el diseño de nuestro formato de administración intravaginal optamos por las capsulas de gelatina, en las cuales se podía dispensar fácilmente el contenido oleoso con la progesterona y los diferentes componentes antes señalados.

Se realizaron varios replicados de este experimento (datos no incluidos en esta memoria) hasta determinar la dosis de progesterona más adecuada, así como el tipo de vehículo y el resto de componentes, que se correspondiera con una cinética y mantenimiento de la amplitud de los niveles plasmáticos de progesterona acorde con los periodos mínimos identificados en el experimento 1.

El metabolismo de la progesterona se lleva a cabo de manera muy rápida por lo que para mejorar las propiedades farmacocinéticas de la hormona se decidió la utilización de progesterona micronizada, que reduce el tamaño de las partículas e incrementa la absorción y la biodisponibilidad de la hormona (Kimzey et al., 1991). La aplicación vaginal evita el primer paso de metabolización por parte del hígado lo que resulta en una mejora en el mantenimiento de las concentraciones plasmáticas (Archer et al., 1995).

Los resultados del experimento 2 demostraron que la nueva cápsula intravaginal diseñada mantenía unas concentraciones plasmáticas de progesterona muy similares a las que aparecen cuando se aplica una dosis más reducida por vía intramuscular.

La progesterona administrada vía intramuscular se absorbe rápidamente, alcanza su concentración plasmática máxima sobre las 2 horas y mantiene niveles altos durante aproximadamente 8 horas (Nillius y Johansson, 1971; Simon et al., 1993). Estas características farmacocinéticas de la progesterona, permiten administrar dosis bajas de esta hormona.

Con una inyección de 25 mg de progesterona se consiguen unas concentraciones plasmáticas como las que se observan en la fase luteal del ciclo (Nillius y Johansson, 1971; Johansson, 1972). Estos datos coinciden con nuestros resultados al aplicar una dosis de 25 mg de progesterona vía intramuscular en vehículo oleoso en cabras, donde la concentración plasmática máxima se alcanzó a las $2,86 \pm 0,59$ horas de la inyección,

y las concentraciones séricas eran las características de la fase luteal en esta especie ($2,4 \pm 0,17$ ng/ml).

Una de las razones por las que una dosis baja de progesterona administrada por vía intramuscular consigue mantener durante más tiempo altas concentraciones plasmáticas en comparación con la vía intravaginal, es que la zona donde ha sido inyectada actúa como un depósito al almacenarse en el tejido graso, lo que no ocurre cuando la progesterona se administra vía vaginal (Johansson, 1972).

La mucosa vaginal absorbe rápidamente lípidos y proteínas (Hafez, 1977; Forsberg, 1995). Existen estudios que indican que la vagina puede presentar un efecto reservorio y la mucosa funcionar como una membrana limitante que determine la cantidad de progesterona que la atraviesa (Archer et al., 1995). Además, una administración vaginal de progesterona desaparece más rápido de la circulación sistémica que una aplicación intramuscular, por lo que se necesitan mayores dosis para alcanzar el mismo efecto que con una inyección de 25 mg de progesterona (Nillius y Johansson, 1971).

Los primeros estudios realizados en humanos a este respecto utilizaron 25 mg de progesterona si la administración es intramuscular, y 100 mg si es intravaginal (Nillius y Johansson, 1971). En nuestro caso la dosis intramuscular fue la misma, sin embargo la intravaginal se aumentó hasta los 120 mg de progesterona. El aumento de la dosis en la administración intravaginal no supuso cambios en la semivida de eliminación, siendo ésta mayor cuando se aplica la progesterona mediante la cápsula intravaginal en comparación con la vía intramuscular ($6,45 \pm 6,51$ vs $8,87 \pm 0,09$ horas). El aclaramiento de la progesterona administrada por cápsula intravaginal es también mayor que cuando se aplica una inyección intramuscular ($2,98 \pm 102,73$ vs $0,54 \pm 0,01$ ml/kg×h).

El perfil de liberación de progesterona se determinó durante un intervalo de tiempo de 42 horas, extrayendo sangre cada dos horas en ambos grupos. Esta frecuencia del muestreo fue suficiente para determinar que las medias de las concentraciones en ambos grupos fueron significativamente diferentes durante todo el periodo de estudio ($P < 0,05$), aunque las mayores diferencias se detectaron en las primeras y en las últimas horas.

En concordancia con los estudios realizados anteriormente por otros autores, las concentraciones máximas de progesterona plasmática se alcanzaron antes en el grupo que recibió la inyección intramuscular que en el grupo al que se le aplicó la cápsula intravaginal ($2,86 \pm 0,59$ horas vs $4,29 \pm 0,43$ horas, respectivamente). Levy et al. (2000) en un estudio farmacocinético de cápsulas de 100 mg de progesterona micronizada aplicadas en mujeres vía intravaginal, obtuvo concentraciones máximas a las $6,23 \pm 6,57$ horas, un intervalo de tiempo significativamente mayor que las dos horas que señalaban Simon et al. (1993) cuando se aplicaba una inyección intramuscular en vehículo oleoso.

Contreras-Solis et al. (2008) aplicando una dosis de 25 mg de progesterona intramuscular en vehículo oleoso en ovejas ovariectomizadas obtuvieron una concentración plasmática máxima similar a nuestros resultados ($3,02 \pm 0,55$ vs $2,4 \pm 0,17$ ng/ml) pero se alcanzaba cerca de una hora antes ($1,80 \pm 0,58$ vs $2,86 \pm 0,59$ horas), esto puede ser debido a la frecuencia horaria de muestreo en este estudio, en el primer periodo después de la administración.

En la información bibliográfica de los tratamientos con progesterona se señala que su eficacia depende más del tiempo durante el cual se mantienen unas concentraciones plasmáticas mínimas (hasta los 0,5 ng/ml), que de las concentraciones máximas que se alcanzan. En estudios previos donde se combinaron el efecto macho con un tratamiento progestativo, se vio una correlación positiva entre la duración de la imprimación por la progesterona (mínimo de 30 horas) y la aparición de ciclos estrales con cuerpos lúteos de duración normal (Pearce et al., 1987). Existe una relación directa entre el periodo durante el cual la progesterona está presente en unas concentraciones mínimas y el retraso en la aparición del pico preovulatorio de LH. Mientras la progesterona esté ejerciendo su efecto, permitirá que el folículo preovulatorio permanezca más tiempo expuesto al estímulo de las gonadotropinas, mejorando de esta manera la maduración del mismo, así como la calidad de la ovulación y del cuerpo lúteo (Shangha et al., 2002).

El tiempo durante el cual se mantuvo la progesterona plasmática por encima de los 0,5 ng/ml cuando se aplicó una inyección intramuscular de 25 mg fue de 36 ± 2 horas, mientras que el de la cápsula intravaginal fue de 28 ± 2 horas. Este era uno de los puntos más críticos de la validez práctica del uso de la cápsula, porque de este intervalo iba a depender la eficacia del nuevo tratamiento alternativo, ya que para conseguir un

efecto en la respuesta al efecto macho se requería al menos de 24 horas de imprimación de progesterona según los resultados del experimento 1.

El posible efecto fisiológico de este descenso de la progesterona en la vía intravaginal unas horas antes respecto de la intramuscular, podría influir en las características del ciclo inducido por la presencia de los machos, al no ser capaz de suprimir durante suficiente tiempo la aparición del pico preovulatorio de LH, y generar una ovulación de mala calidad con el consiguiente descenso de la fertilidad.

Con el fin de valorar las características de la respuesta al efecto macho en cabras tratadas con esta cápsula intravaginal, se diseñó el experimento 3, donde se incluía un tratamiento similar al del experimento 1 con una esponja intravaginal de FGA mantenida durante un periodo de 30 horas.

Los resultados demuestran que el intervalo entre el descenso de la progesterona a 0,5 ng/ml y el pico preovulatorio de LH en el grupo que recibió la inyección intramuscular y la administración de la cápsula intravaginal fueron de 31 horas y 30 horas respectivamente. Estas diferencias no son significativas y coinciden con el grupo al que se le aplicó la esponja intravaginal durante 30 horas, en el que este intervalo fue de 29 horas.

Vilariño et al. (2011) administraron un dispositivo CIDR durante 5 días a cabras en anestro estacional, la progesterona plasmática descendió a los 0,5 ng/ml sobre las 8 horas desde la retirada del dispositivo vaginal. En ese mismo estudio, el intervalo entre la bajada de la progesterona a 0,5 ng/ml y el pico preovulatorio de LH fue de aproximadamente 30-35 horas, coincidiendo con nuestros intervalos para cada uno de los tres grupos.

Estos intervalos se mantienen constantes y coinciden con los del experimento 1, donde el intervalo desde el descenso de la progesterona a 0,5 ng/ml al pico preovulatorio de LH en el grupo que mantuvo la esponja durante 24 horas, fue de 28 horas. En cabras cíclicas el intervalo entre el inicio de la luteolisis y el pico preovulatorio de LH es de aproximadamente 65 horas (Mori y Kano, 1984). La diferencia de horas entre estos dos datos se debe a que la luteolisis comienza de 24 a 36 horas antes de que la progesterona plasmática alcance niveles inferiores a 1 ng/ml (Bazer et al., 1998), por lo que nuestros resultados están en concordancia con las aportaciones de estos autores.

La aparición de la descarga de LH desde la introducción de los machos en el grupo al que se le aplicó la cápsula intravaginal fue 14 horas antes que en el grupo de la inyección intramuscular (53 horas vs. 67 horas). Este número de horas es superior a las 8-10 horas de diferencia en lo relativo al periodo en el que las concentraciones plasmáticas de progesterona descienden a 0,5 ng/ml, esta circunstancia explica la mayor precocidad en el inicio de la descarga preovulatoria de LH en las cabras tratadas con la cápsula intravaginal. Esto podría indicar que el efecto fisiológico de supresión de la descarga de LH en el caso de la cápsula se pierde horas antes que cuando se aplica una inyección intramuscular. Nillius y Johansson (1971) ya pusieron de manifiesto estas diferencias farmacocinéticas de la progesterona en función de la vía de administración de la misma, destacando que la vía intravaginal requiere de dosis más altas para obtener el mismo efecto que una dosis baja administrada intramuscularmente, y aun así no consigue mantener durante el mismo tiempo altas concentraciones plasmáticas de la hormona.

La cápsula intravaginal mantiene altos niveles de progesterona plasmática hasta aproximadamente 30 horas desde su aplicación, este periodo es suficiente para alterar la duración de la secreción pulsátil de LH generada por el estímulo de los machos y la ovulación inducida no va seguida de un ciclo corto, ni baja secreción luteal. Esta circunstancia coincide con los resultados del experimento 1 donde los tratamientos de esponjas intravaginales de FGA durante 24 horas, ya eran capaces de evitar la aparición del ciclo corto característica del primer ciclo inducido por el efecto macho.

En los tres tratamientos, las concentraciones de progesterona plasmática del cuerpo lúteo inducido alcanzan los 0,5 ng/ml 5-6 días después desde la introducción de los machos, aunque aparece más adelantada en el grupo que recibió la cápsula intravaginal. Los tiempos fueron aproximadamente de 126 horas para el grupo de cápsula y alrededor de 138 horas para los otros dos grupos, inyección intramuscular y esponja intravaginal durante 30 horas. Esta diferencia de 12 horas se corresponde con las 12-14 horas de adelanto en la aparición del pico preovulatorio de LH en el grupo de la cápsula intravaginal, respecto de los grupos con esponja intravaginal e inyección intramuscular respectivamente (53 horas vs. 65 y 67 horas).

Si realizamos el cálculo entre el pico preovulatorio de LH y las concentraciones de progesterona plasmática por encima de los 0,5 ng/ml, los intervalos son 73 horas, 71 horas y 73 horas para el grupo cápsula, inyección intramuscular y esponja,

respectivamente. Lo cual nos indica que el periodo de formación del cuerpo lúteo e inicio de la secreción luteal, es el mismo después de la descarga de LH para los tres tratamientos, lo cual apoyaría los criterios de valoración de la efectividad del método, en cuanto a los períodos necesarios en la formación de un cuerpo lúteo de funcionalidad normal (McCracken et al., 1999; Simões et al., 2007).

El perfil de secreción de progesterona después de la ovulación inducida es similar para los tres grupos de este experimento. Hasta el día 5 del ciclo inducido (9 días después de la introducción de los machos) no hay diferencias en el nivel plasmático de progesterona, a diferencia de los que sucedía en el grupo A2 del experimento 1 (24 horas de tratamiento con esponja intravaginal de FGA) donde había diferencias significativas, con menores concentraciones de progesterona a partir del día 8 desde la introducción de los machos. Una adecuada función luteal con suficiente secreción de progesterona en los primeros días del ciclo es la condición fundamental para asegurar la viabilidad embrionaria y los resultados de fertilidad de cualquier método de control del ciclo reproductivo (Bazer et al., 1998).

Basándonos en la efectividad de la cápsula en cuanto a su respuesta endocrina, con el experimento 4 se hizo una valoración del nuevo protocolo IMA-PRO2[®] con cápsula intravaginal, a nivel de su aplicación práctica en condiciones de campo, y de los resultados de fertilidad que se podían alcanzar, comparados con el mismo protocolo de inyección intramuscular y con el protocolo clásico de esponjas intravaginales de FGA y eCG.

En las dos explotaciones donde se llevó a cabo el primer experimento, se comparaban los resultados de fertilidad después de la aplicación de los dos protocolos IMA-PRO2[®], con inyección intramuscular y cápsula intravaginal. Los resultados de fertilidad, con inseminación artificial a tiempo fijo 55 horas después del tratamiento con cloprostenol, no fueron diferentes pero si inferiores para los grupos de tratamiento con cápsulas (50,8 % vs. 56,2 % y 46,9 % vs. 58,3 % en la explotación 1 y 2 respectivamente).

Esta diferencia se podría explicar por varias causas, en primer lugar el número de inseminaciones realizadas en estos experimentos ha sido inferior a las necesarias para asegurar las diferencias con este tipo de tratamientos y prácticas zootécnicas, donde coinciden muchas variables, incluyendo el manejo del ganado en cada explotación. En los experimentos para determinar la validez del método IMA-PRO2[®] (inyección

intramuscular) comparado con el hormonal de progestágenos y eCG, López Sebastián et al., (2007) llevaron a cabo cerca de 2000 inseminaciones, cifra muy superior a las realizadas en estos experimentos preliminares.

Por otro lado también este descenso de la fertilidad puede ser debido a que el momento de la inseminación a artificial a tiempo fijo, 55 horas después de la administración del cloprostenol, no era el idóneo para el grupo de tratamiento con cápsula intravaginal.

Los resultados del experimento 3, en cuanto al intervalo desde la introducción de los machos a la descarga preovulatoria de LH, pusieron de manifiesto que en el grupo al que se le aplicó la cápsula intravaginal, esta descarga tenía lugar 14 horas antes comparado con el grupo de inyección intramuscular (53 horas vs. 67 horas). Esta diferencia de horas implica a su vez, que la formación del cuerpo lúteo también fue más temprana y por tanto, la administración de cloprostenol tuvo lugar en un cuerpo lúteo más joven en el grupo de tratamiento con cápsula.

Baril et al. (1993b) describieron la importancia de mantener intervalos idóneos entre el pico preovulatorio de LH y la inseminación artificial a tiempo fijo, para obtener buenas tasas de fertilidad. A medida que el cuerpo lúteo es más joven, el intervalo entre la administración de la prostaglandina, y la aparición del celo y la ovulación, es menor (Fonseca et al., 2012). Si esto ocurrió así en nuestro experimento, realizar las inseminaciones artificiales a la misma hora con los dos protocolos ha podido perjudicar a la fertilidad del grupo de cápsula, que tendría que haber sido inseminado algunas horas antes. Baril et al. (1993a) ya expusieron la importancia de realizar las inseminaciones artificiales dentro de las 15 horas después de la descarga preovulatoria de LH.

Las tasas de fertilidad que se obtuvieron con el tratamiento control (progestágenos y eCG) en la explotación 3, e inseminación sistemática a las 46 horas de retirada del tratamiento progestativo fueron del 64 %, lo cual corresponde con lo descrito en la literatura en trabajos donde se desarrolla esta metodología en un elevado número de animales (Baril et al., 1996; Leboeuf et al., 2008).

Estos resultados de fertilidad aunque con diferencias no significativas, también fueron superiores a los obtenidos con el protocolo IMA-PRO2[®] y cápsulas intravaginales (64,2 % vs. 54,1 % grupo control e IMA-PRO2[®] respectivamente), si

bien de nuevo el número de inseminaciones fue inferior a las idóneas para este tipo de pruebas de campo.

Estos resultados preliminares comparativos entre el método hormonal clásico y la nueva propuesta metodológica, aunque con un número limitado de inseminaciones, son un buen punto de partida para la valoración de este nuevo protocolo y su puesta en práctica en las explotaciones de caprino lechero.

CONCLUSIONES

Los resultados del trabajo experimental permiten llegar a las siguientes conclusiones:

1. 24 horas de tratamiento progestativo son suficientes para retrasar la descarga preovulatoria de LH después de la introducción de los machos (efecto macho), induciendo la primera ovulación acompañada de signos de celo y formación de un cuerpo lúteo sin presencia de ciclo corto.
2. Los tratamientos progestativos de mayor duración 48 y 72 horas, en el momento de la introducción de los machos, retrasan la descarga de LH, la ovulación y el periodo de formación del cuerpo lúteo, consiguiendo una mayor secreción de progesterona con diferencia significativa desde el día 4 del ciclo inducido, respecto del tratamiento progestativo de 24 horas.
3. La administración en cabras ovariectomizadas de una cápsula intravaginal de gelatina que contiene 120 mg de progesterona en un vehículo oleoso, genera durante las primeras 24 horas después de la administración, un perfil y patrón similar de las concentraciones plasmáticas de progesterona que la administración de 25 mg por vía intramuscular en vehículo oleoso.
4. Las concentraciones plasmáticas de progesterona con la cápsula intravaginal descienden al nivel de eficacia fisiológica de 0,5 ng/ml a las 28 horas de la aplicación, aproximadamente 8 horas antes que con la administración intramuscular.
5. Con la cápsula intravaginal de progesterona administrada en el momento de la introducción de los machos, la descarga preovulatoria de LH tiene lugar 12 horas antes que con el tratamiento de una esponja intravaginal durante 30 horas, lo que coincide con la conclusión anterior en que el efecto de bloqueo hipotalámico de la progesterona es inferior a las 30 horas en el protocolo con cápsula intravaginal.
6. De la misma forma que la inyección intramuscular de 25 mg de progesterona, la cápsula intravaginal de 120 mg evita la presencia de ciclos cortos después del efecto macho, y la secreción posterior del cuerpo lúteo en el ciclo inducido tiene niveles de secreción normal de progesterona.

7. El método IMA.PRO2[®] utilizado con cápsula intravaginal, consigue resultados similares de fertilidad después de la IA sistemática a las 55 horas después del tratamiento con cloprostenol, respecto del método original con administración intramuscular de progesterona.

8. El método IMA.PRO2[®] con cápsula intravaginal consigue resultados similares de fertilidad después de la IA sistemática, respecto del método hormonal utilizando progestágenos y eCG, si bien estos resultados con diferencias no significativas, como en la conclusión anterior, están basados en los datos de un reducido número de animales inseminados.

**REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

Abecia JA, Forcada F, González-Bulnes A. Pharmaceutical control of reproduction in sheep and goats. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 2011; 27: 67-79.

Acosta J. Duración del anestro postparto de cabras mestizas en amamantamiento restringido. *Rev Cub Reprod Anim*. 1996; 22:31– 37.

Acritopoulou S, Haresign W. Response of ewes to a single injection of an analogue of PGF_{2α} given at different stages of the oestrous cycle. *J Reprod Fert*. 1980; 58: 219-223.

Andrioli A, Simplicio AA, Machado R. Influência da época da parição no comportamento reprodutivo pós-parto de cabras Sem Raça Definida. *Pesq Agrop Bras, Brasilia* 1992; 27:65–72.

Archer D, Fahy G, Viniegra-sibal A, Anderson F, Snipes W, Foldesy R. Initial and steady-state pharmacokinetics of a vaginally administered formulation of progesterone. *Am J Obst Gynecol*. 1995; 173:471–478.

Aréchiga CF, Aguilera JI, Rincón RM, Méndez De Lara S, Bañuelos VR, Meza-Herrera CA. Role and perspectives of goat production in a global world. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 2008; 9:1–14.

Arendt J, Symons AM, Laud CA, Pryde SJ. Melatonin can induce early onset of the breeding season in ewes. *Journal of Endocrinology*. 1983; 97: 395-400.

Arendt J. The Pineal Gland and Pineal Tumours. *Endotext* [Internet]. De Groot LJ, Beck-Peccoz P, Chrousos G, et al., editors. South Dartmouth (MA); 2000. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279108/>

Artini PG, Volpe A, Angioni S, Galassi MC, Battaglia C, Genazzani AR. A comparative, randomized study of three different progesterone support of the luteal phase following IVF/ET program. *J Endocrinol Invest*. 1995;18:51-56.

Álvarez Ramírez L, Zarco Quintero LA. Los fenómenos de bioestimulación sexual en ovejas y cabras. *Veterinaria México*.2001; 32:117-129.

Baird DT, Campbell BK, Mann GE, Mcneilly AS. Inhibin and oestradiol in the control of FSH secretion in the sheep. *J Reprod Fert Suppl*. 1991; 43: 125-138.

Baril G, Chemineau P, Cognie Y, Guerin Y, Leboeuf B, Orgeur P, Vallet JC. Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins. Etude FAO, Production et santé animals 1993a; 83:219-231.

Baril G, Leboeuf B, Saumande J. Synchronization of estrus in goats: the relationship between time of occurrence of estrus and fertility following artificial insemination. *Theriogenology*. 1993b; 40:621-8.

Baril G, Remy B, Leboeuf B, Beckers JF, Saumande J. Synchronization of estrus in goats: The relationship between eCG binding in plasma, time of occurrence of estrus and fertility following artificial insemination. *Theriogenology*. 1996; 45 : 1553–1559.

Barker CA. Synchronization of oestrus in dairy goats by progestin impregnated vaginal pessaries. *Can Vet J* .1966; 7:215-218.

Barreto L, Cuhna-Fihlo M. Ciclodextrina: Importante Excipiente Farmacêutico Funcional. *Lat Am Pharm*. 2008; 27: 629-36.

Barrett DMW, Bartlewski PM, Cook SJ, Rawlings SC. Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to PGF_{2α} given at different stages of the luteal phase in ewes. *Theriogenology*. 2002; 58: 1409–1424.

Bartlewski PM, Beard AP, Cook SJ, Rawlings NC. Ovarian activity during sexual maturation and following introduction of the ram to ewe lambs. *Small Ruminant Research*. 2002; 43: 37–44.

Bazer FW, Ott TL, Spencer TE. Endocrinology of the transition from recurring estrous cycles to establishment of pregnancy in subprimate mammals. En: Fuller W. Bazer,

editores. Contemporary Endocrinology: Endocrinology of pregnancy. Springer Science+Business Media New York; 1998;p.1-35.

Beach FA. Sexual attractivity, proceptivity, and receptivity in female mammals. Hormones and Behavior. 1976; 7: 105-138.

Beard AP, Lamming GE. Oestradiol concentration and the development of the uterine oxytocin receptor and oxytocin-induced PGF₂alfa. release in ewes. J Reprod Fertil. 1994; 100: 469-475.

Bedos M, Flores JA, Fitz-Rodriguez G, Keller M, Malpaux B, Poindron P y Delgadillo JA.. Four hours of daily contact with sexually active males is sufficient to induce fertile ovulation in anestrous goats. Horm Behav. 2010; 58:473-477.

Betteridge KJ. Techniques and results in cattle: superovulation. En: K.J. Betteridge Ed. Embryo Transfer in Farm Animals. Monograph No. 16. Canada Department of Agriculture, Ottawa; 1977.p. 1-9.

Birken S, Kovalevskaya G, O'Connor J. Metabolism of hCG and hLH to multiple urinary forms. Molecular and Cellular Endocrinology .1996; 125:121-131.

Bittman EL, Dempsey RJ, Karsch FJ. Pineal melatonin secretion drives the reproductive response to daylength in the ewe. Endocrinology. 1983; 113: 2276-2283.

Boehm U, Zou Z, Buck LB. Feedback loops link odor and pheromone signaling with reproduction. Cel .2005;123: 683-695.

Bondurant RH. Reproductive physiology in the goat. Mod Vet Pract .1981;62:525-529.

Bono G, Cairoli F, Tamanini C, Abrate L. Progesterone, estrogen, LH, FSH and PRL concentrations in plasma during the estrous cycle in goat. Reprod Nutr Dev.1983;23: 217-222.

Bosu WTK, Serna J, Barker CAV. Peripheral plasma levels of progesterone in goats treated with fluorogestone acetate and prostaglandin F2 α during the estrous cycle. *Theriogenology* .1978; 9: 371-390.

Boyazoglu J, Hatziminaoglou I, Morand-Fehr P. The role of the goat in society: Past, present and perspectives for the future. *Small Ruminant Research*.2005; 60: 13-23.

Brebion P, Baril G, Chesné P. Manual de formación práctica para el trasplante de embriones en ovejas y cabras. Autor corporativo ONU-FAO. Ed. FAO. Roma, Italia.1995; 1-68.

Bretzlaff KN, Ott RS, Weston PG, Hixon JE.1981: Doses of prostaglandin F2a effective for induction of estrus in goats. *Theriogenology* .1981; 16: 587–591.

Bretzlaff KN, Madrid N. Clinical use of Norgestomet ear implants or intravaginal pessaries for synchronization of estrus in anestrus dairy goats.*Theriogenology*. 1989; 31:419-423.

Bronson, FH. Mammalian reproduction: An ecological perspective. *Biol Reprod* .1985; 32: 1-26.

Buckler HM, Phillips SE, Cameron IT, Healy DL, Burger HG. Vaginal progesterone administration before ovulation induction with exogenous gonadotropins in polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*.1988; 67: 300-306.

Caldani M, Antoine M, Batailler M. Ontogeny of GnRH systems. *J.Reprod. Fertil*.1995; 49: 147-162.

Campbell BK, Scaramuzzi RJ, Webb R. Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. *J Reprod Fertil Suppl* .1995; 49:335-350.

Cárdenas VR. Estudio sobre la sincronización de estros y subsecuente fertilidad usando PGF2 alfa en cabras. *Vet Méx*. 1985; 16: 67-68.

Castel JM, Ruiz FA, Mena Y, Sánchez-Rodríguez M. Present situation and future perspectives for goat production systems in Spain. *Small Ruminant Research*. 2010; 89: 207-210.

Chemineau P. Effect on oestrus and ovulation of exposing Creole goats to the male at three times of the year. *J Reprod Fertil*. 1983; 67: 65-72.

Chemineau P. Effects of a progestogen on buck-induced short ovarian cycles in the creole meat goat. *Anim Reprod Sci*. 1985; 9:87-94.

Chemineau P. Sexual behaviour and gonadal activity during year in the tropical Creole meat goat. I. Female oestrus behaviour and ovarian activity. *Reprod Nutr Dev*.1986; 26: 441-452.

Chemineau P. Possibilities for using bucks to stimulate ovarian and oestrus cycles in anovulatory goats-a review. *Livestock Production Science* 1987; 17:135-147.

Chemineau, P, Gauthier D, Poirier JC, Saumande J. Plasma levels of LH, FSH, Prolactin, oestradiol 17-beta and Progesterone during natural and induced estrus in the dairy goat. *Theriogenology* .1982;17:313-323.

Chemineau P, Poulin N, Cognie Y. Sécrétion de progestérone au cours du cycle induit par l'introduction du mâle chez la chèvre créole en anoestrus : effets de la saison. *Reprod Nutr Dev*. 1984; 24:557-561.

Chemineau P, Normant E, Ravault JP, Thimonier J. Induction and persistence of pituitary and ovarian activity in the out-of-season lactating dairy goat after a treatment combining a skeleton photoperiod, melatonin and the male effect. *J Reprod Fertil* .1986b; 78: 497-504.

Chemineau P, Levy F, Thimonier J. Effects of anosmia on LH secretion, ovulation and oestrus behaviour induced by males in the anovular Creole goat. *Anim Reprod Sci*. 1986c;10:125-132.

Chemineau P, Pelletier J, Guerin Y, Colas G, Ravault JP, Toure G, Almeida G, Thimonier J, Ortavant, R. Photoperiodic and melatonin treatments for the control of seasonal reproduction in sheep and goats. *Reprod Nut Dev*. 1988; 28:409–422.

Chemineau P, Cognie Y, Guerin Y, Orgeur P, Vallet, JC. Training manual on artificial insemination in sheep and goats. *Animal Production and Health paper No.83*, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy; 1991. p. 222.

Chemineau P, Daveau A, Maurice F, Delgadillo JA. Seasonality of oestrus and ovulation is not modified by subjecting female Alpine goats to tropical photoperiod. *Small Ruminant Research*. 1992a; 8:299-312.

Chemineau, P, Malpoux B, Delgadillo JA, Guerin Y, Ravault JP, Thimonier J, Pelletier J. Control of sheep and goat reproduction: use of light and melatonin. *Anim Reprod Sci*. 1992b; 30:157-184.

Chemineau P, Delgadillo JA. Neuroendocrinología de la reproducción en el caprino. *Revista Científica FCV-LUZ*. 1993; 3:113-121.

Chemineau P, Delgadillo JA. Neuroendocrinología de la reproducción en el caprino. *Revista Latinoamericana de Pequeños Rumiantes*. 1994; 1:85-101.

Chemineau P, BEltrán De Heredia I, Daveau A, Bodin L. High repeatability of the amplitude and duration of the nycthemeral rhythm of the plasma melatonin concentrations in Ile-de-France ewe. *J Pineal Res*. 1996; 21:1-6.

Chemineau P, Baril G, Leboeuf B, Maurel MC, Roy F, Pellicer-Rubio MT, Malpoux B, Cognié Y. Implications of recent advances in reproductive physiology for reproductive management of goats. *Journal Reproduction and Fertility in Domestic Ruminants IV*. En: *5th International Symposium on Reproduction in Domestic Ruminants*, August 1998, USA) 1999; 54:129-142.

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

Chemineau P, Bodin L, Migaud M, Thiéry JC, Malpoux B. Neuroendocrine and genetic control of seasonal reproduction in sheep and goats. *Reprod Domest Anim.* 2010; 45:42-49.

Clarke IJ. Two decades of measuring GnRH secretion. *Reprod Suppl.* 2002; 59:1-13. Review.

Claus R, Over R, Dehnhard M. Effect of male odour on LH secretion and the induction of ovulation in seasonally anoestrous goats. *Anim Reprod Sci.* 1990; 22:27-38.

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

Cohen-Tannoudji J, Lavenet C, Locatelli A, Tillet Y, Signoret JP. Non-involvement of the accessory olfactory system in the LH response of anoestrous ewes to male odour. *Journal of Reproduction and Fertility.* 1989; 86:135–144.

Cole HH, Hart GH. The potency of blood serum of mares in progressive stages of pregnancy in effectin the sexual maturity of the immature rat. *Am J Physiol.* 1930; 93:57- 68.

Cole LA. Degradation products of hCG, hyperglycosylated hCG, and free β -subunit. Cole LA, Butler SA eds. In *Human Chorionic Gonadotropin (hCG)*. Elsevier; 2010. p. 109-119.

Contreras I, Gomez A, Encinas T, Gonzalez De Bulnes A, SANTIAGO-Moreno J, Lopez-Sebastian A. Influence of vehicle on kinetics of exogenous progesterone administered either by subcutaneous and intramuscular routes to sheep. *Res Vet Sci.* 2008; 85:162–165.

Córdova-Izquierdo A, Córdova-Jiménez MS, Córdova-Jiménez CA, Guerra-Liera JE. Procedures to increase the reproductive potential in sheep and goat. Rev vet. 2008; 19:67–79.

Corteel JM. L'insémination artificielle caprine. Bull Tech Inf. 1971; 257: 1-4.

Corteel JM. Maitrise de la reproduction des caprins à vocation laitière à des fins économiques. En : 1er Colloque Int. Sur Reprod Des Caprins. Drummondville, Quebec (Canadá) ; 1985.p. 45-68.

Corteel JM, Mauleon P, Thimonier J, Ortavant R, Bussiere J, Lajous A, De Montigny G. Essais d'obtention de gestations synchrones avant le début de la saison sexuelle de la chèvre a l'aide de 17 a acétoxy, 9 a fluoro, 11 β hydroxy-pregn 4 ène 3,20 dione administré par la voie vaginale. Ann Zootech. 1967 ; 16:343-350.

Corteel JM, Gonzales C, Nunes JF. Research and development in the control of reproduction. En: Third International Conference on Goat Production and Disease, Tucson, Arizona ,USA;1982.p. 584-601.

Corteel JM, Baril G, Bariteau F, Bussière, J, Leboeuf B, De Montigny, G. The use of progestagens to control the oestrus cycle of dairy goat. Ann Biol Anim Bioch Biophys. 1975 ; 15:353-363.

Corteel JM, Leboeuf B, Baril, G. Artificial breeding of adult goats and kids induced with hormones to ovulate outside the breeding season Small Ruminant Research. 1988;1: 19–35.

Cueto M, Gibbons A, Alberio R, Taddeo H, Gonzalez-Bulnes A. Timing of emergence of ovulatory follicles in polyovulatory goats. Anim Reprod Sci. 2006; 91: 275-284.

Pietroski, ACCA, Brandão FZ, Souza JMG, Fonseca JF. Short, medium or long-term hormonal treatments for induction of synchronized estrus and ovulation in Saanen goats during the nonbreeding season. R. Bras. Zootec. 2013; 42:168-173.

Dauzier L, Ortavant R, Thibault C, Wintenberger S. Résultats nouveaux sur la gestation a contre saison chez la brebis et chez la chèvre possibilité d'utilisation pratique Annales de zoothechnie .1954; 3:89-94.

Dauzier L, Ortavant R, THibault C, Wintenberger S. Recherches expérimentales sur le rôle de la progestérone dans le cycle sexuel de la brebis et de la chèvre. Animal Endocrinology .1953; 4:553-559.

De Castro T, Rubianes E, Menchaca A, Rivero A. Ovarian dynamics, serum estradiol and progesterone concentrations during the interovulatory interval in goats. Theriogenology.1999; 52:399-411.

De Rensis F, Lopez-Gatius F, García-Ispuerto I, Techakumpu M. Clinical use of human chorionic gonadotropin in dairy cows: an update. Theriogenology. 2010; 73:1001–1008.

Deaver DR, Stilley NJ, Dailey RA, Inskeep EK, Lewis PE. Concentrations of ovarian and pituitary hormones following prostaglandin F_{2α}-induced luteal regression in ewes varies with day of the estrous cycle at treatment. J. Anim. Sci. 1986; 62: 422–427.

Delgadillo JA, Leboeuf B, Chemineau P. Decrease in the seasonality of sexual behaviour and sperm production in bucks by exposure to short photoperiodic cycles. Theriogenology. 1991; 36: 755-770.

Delgadillo JA, Chemineau P. Abolition of the seasonal release of luteinizing hormone and testosterone in Alpine male goats (*Capra hircus*) by short photoperiodic cycles. Journal of Reproduction and Fertility. 1992; 94: 45-55.

Delgadillo JA, Malpoux B. Reproduction of goats in the tropics and subtropics. En: Sixth International Conference on Goats. Beijing, China; 1996.p. 785–793.

Delgadillo JA, Flores JA, Villareal O, Flores MJ, Hoyos G, Chemineau P, Malpoux B. Length of postpartum anestrus in goats in subtropical Mexico: Effect of season of Parturition and duration of nursing. Theriogenology. 1998; 49:1209-1218.

Delgadillo JA, Canedo GA, Chemineau P, Guillaume D, Malpaux B. Evidence for an annual reproductive rhythm independent of food availability in male Creole goats in subtropical northern Mexico. *Theriogenology*. 1999; 52: 727-737.

Delgadillo JA, Carrillo E, Morán J, Duarte G, Chemineau, P, Malpaux B. Induction of sexual activity of male creole goats in subtropical northern Mexico using long days and melatonin. *Journal of Animal Science*. 2001; 79:2245-2252.

Delgadillo JA, Flores JA, Véliz FG, Duarte G, Vielma J, Hernandez H, Fernandez IG. Importance of the signals provided by the buck for the success of the male effect in goats. *Reprod Nutr Dev*. 2006; 46:391-400.

Delgadillo JA, Vielma J, Flores JA, Véliz FG, Duarte G, Hernández H. La calidad del estímulo emitido por el macho determina la respuesta de las cabras sometidas al efecto macho. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 2008; 9:39-45.

Delgadillo JA, Gelez H, Ungerfeld R, Hawken PA, Martin GB. The “male effect” in sheep and goats- revisiting the dogmas. *Behavior Brain Research* 2009; 200: 304-314.

Devendra C, McLeroy GB. *Goat and Sheep Production in the Tropics, Intermediate Tropical Agriculture Series*. Burnt Mill, Harlow, Essex, UK: Longman Group Ltd; 1982.

Deveson SL, Arendt J, Forsyth LA. The influence of the pineal gland and melatonin on the reproductive performance of domesticated female ungulates. *Animal Reproduction Sci* .1992; 30:113–134.

Díaz Delfa C, González Bulnes A, Haba Nuévalos E, Guirao Moya J, Lobera Lösel JB, Urrutia López B, Carrizosa Durán JA, López-Sebastián A. Inducción y sincronización de ovulaciones en cabras de raza Murciano-Granadina mediante la utilización del efecto macho y progesterona. En: *Actas de las XXVII Jornadas Científicas y VI Jornadas Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia*. Valencia; 2002.p. 1017–1021.

Driancourt MA. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*. 2001; 55:1211-1239.

Duque-Bonisoli C, Salvador A, Diaz T, Contreras-Solís I. Ovarian response to oestrous synchronization protocol based on use of reduced doses of cloprostenol in cyclic goats. *Reprod Domest Anim*. 2012; 47:79-82.

Elsden RP, Nelson LD, Seidel GE. Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin. *Theriogenology*. 1978; 9: 17-26.

Evans AC. Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. *Reprod. Domest. Anim*. 2003; 38:240-246.

Evans G, Maxwell WM. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Sydney, Australia: Butterworths ; 1987.

Evans G, Maxwell WM. Inseminación artificial de ovejas y cabras, Josefina Illera del Portal (trad). Zaragoza: Acribia; 1990.

Everett JW. Pituitary and hypothalamus: perspectives and overview. En: Knobil E & Neill JD (Ed). *The Physiology of Reproduction*. 2nd ed. New York: Raven Press Ltd. 1994. p. 1509–1526.

Fabre-Nys C. Le comportement sexuel des caprins : contrôle hormonal et facteurs sociaux. *INRA Prod. Anim* 2000 ; 13: 11-23.

Farin CE, Moeller CL, Sawyer HR, Gamboni F, Niswender GD. Morphometric analysis of cell types in the ovine corpus luteum throughout the estrous cycle. *Biol Reprod*. 1986 ; 35 : 1299.

Fasanya Ooa, Molokwu Eci, Adeboye, DS, Dim NI. Gross and histological changes of the post-partum genitalia of Savana Brown goats. *Anim Reprod Sci*. 1987; 14: 65– 74.

Fatet A, Pellicer-Rubio M.T, Leboeuf B. Reproductive cycle of goats. *Anim. Reprod. Sci.* 2010; 124:211-219.

Flores JA, Véliz FG, Pérez-Villanueva JA, Martínez De La Escalera G, CHemineau P, Poindron, P, Malpaux B, Delgadillo JA. Male reproductive condition is the limiting factor of efficiency in the male effect during seasonal anestrus in female goats. *Biol Reprod.* 2000; 62: 1409- 1414.

Fonseca JF, Bruschi JH, Santos IC, Viana JH, Magalhães AC. Induction of estrus in non-lactating dairy goats with different estrous synchrony protocols. *Anim Reprod Sci.*2005; 85:117-124.

Fonseca JF, Torres CAA. Administration of hCG 5 days after breeding and reproductive performance in nulliparous dairy goats. *Reproduction in Domestic Animals.* 2005 ;40:495-499.

Fonseca JG, Maffili VV, Santos R, Fürst R, Prosperi CP, Rovay H, Souza JMG, Torres CAA. Effects of prostaglandin administration 10 days apart on reproductive parameters of cyclic dairy nulliparous goats. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2012 ; 64:349-358.

Forcada F, Abecia JA, Zúñiga O, Lozano JM. Variation in the ability of melatonin implants inserted at two different times after the winter solstice to restore reproductive activity in reduced seasonality ewes. *Australian Journal of Agricultural Research.* 2002; 53: 167-173.

Forsberg JG. A morphologist's approach to the vagina-age-related changes and estrogen sensitivity. *Maturitas.* 1995; 22 (suppl.): 7-15.

Freitas VJ, Baril G, Saumande J. Estrus synchronization in dairy goats: use of fluorogestone acetate vaginal sponges or norgestomet ear implants. *Anim Reprod Sci.* 1997; 46:237-244.

Freitas VJF, Rondina D, Nogueira DM, Simplicio A. Post-partum anoestrus in anglo-Nubian and Saanen goats raised in semi-arid of North-eastern Brazil. *Livestock Production Science*. 2004; 90:219-226.

Gatica Jorquera MC. Utilización de fotoperiodo artificial, melatonina exógena y/o efecto macho para la mejora de los parámetros reproductivos de caprinos mediterráneos [Tesis doctoral]. Huelva: Universidad de Huelva, Departamento de Ciencias Agroforestales, 2012.

Gelez H, Lindsay DR, Blach, D, Martin, GB, Fabre-Nys C. Temperament and sexual experience affect female sexual behaviour in sheep. *Appl Anim Behav Sci* .2003; 84: 81-87.

Gelez H, Fabre-Nys C. The “male effect” in sheep and goats: a review of the respective roles of the two olfactory systems. *Horm Behav*. 2004; 46: 257-271.

Gelez H, Fabre-Nys C. Neural pathways involved in the endocrine response of anestrus ewes to the male or its odor. *Neuroscience*. 2006; 140: 791-800.

Ginther, OJ. Response of corpora lutea to cauterization of follicles in sheep. *Am J Vet Res*.1971; 32: 59-62.

Ginther OJ, Kot K. Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. *Theriogenology* .1994; 42:987-1001.

Ginther OJ, Kot K, Wiltbank MC. Association between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. *Theriogenology*. 1995; 43: 689–703.

Godfrey RW, Collins JR, Hensley EL, Wheaton JE. Estrus synchronization and artificial insemination of hair sheep in the tropics. *Theriogenology*. 1999; 51: 985–997.

Godfrey RW, Gray ML, Collins JR. A comparison of two methods of oestrous synchronisation of hair sheep in the tropics. *Anim. Reprod.Sci*. 1997; 47: 99–106.

Goodman RL, Bittman EL, Foster DL, Karsch FJ. The endocrine basis of the synergistic suppression of luteinizing hormone by estradiol and progesterone. *Endocrinology*. 1981; 109:1414-1417.

Gómez-Brunet A, Santiago-Moreno J, Toledano-Díaz A, López-Sebastián A. Evidence that refractoriness to long and short daylengths regulates seasonal reproductive transitions in Mediterranean goats. *Reprod Domest Anim*. 2010; 45:338-343.

Gómez-Brunet A, Santiago-Moreno J, Toledano-Díaz A, López-Sebastián A. Reproductive seasonality and its control in spanish sheep and goats. *Tropical and Subtropical Agrosystems*. 2012; 15: 47-70.

González-Bulnes A, Santiago-Moreno J, García-García RM, Cocero MJ, López-Sebastián A. Patrones y mecanismos de control del desarrollo folicular durante la administración de protocolos superovulatorios en pequeños rumiantes (Revisión). *Prod. Sanid. Anim*. 2002; 17: 37-48.

Gonzalez-Bulnes A, Souza CJ, Campbell BK, Baird DT. Systemic and intraovarian effects of dominant follicles on ovine follicular growth. *Anim. Reprod. Sci*. 2004; 84: 107–119.

González-Bulnes A, Carrizosa JA, Urrutia B, López-Sebastián A. Oestrous behavior and development of preovulatory follicles in goats induced to ovulate using the male effect with and without progesterone priming. *Reprod Fertil Dev*. 2006;18: 745–750.

Gonzalez-Stagnaro C. Control y manejo de los factores que afectan al comportamiento reproductivo de los pequeños rumiantes en el medio tropical. En: *International Symposium on Nuclear and Related Techniques in Animal Production and Health*. Vienna (Austria): FAO; 15-19 Apr1991.p. 405– 421.

Gonzalez-Stagnaro, C., Pelletier, J., Cognié, Y., Locatelli, A., Baril, G., Corteel, J.M. Descarga pre-ovulatoria de LH y momento de ovulación en cabras lecheras durante el celo natural o inducido por vía hormonal. En: *10th Intern. Congr. Anim. Reprod.* &

A.I., Urbana, Illinois (USA): Neuroendocrinologie de la reproduction chez les caprins. INRA Productions Animales 7. Chemineau P, Delgadillo JA. (Eds.);1984.p. 315–326.

Greyling JPC, Van Niekerk CH. Synchronization of oestrus in the Boer goat doe: Dose effect of prostaglandin in the double injection regime. S.Afr.J.Anim.Sci. 1986; 16:146-150.

Greyling JPC, Van Niekerk CH. Different synchronization techniques in Boer goat does outside the normal breeding season. Small Rumin Res. 1991; 5:233-243.

Greyling JP. Reproduction traits in the Boer goat doe. Small Rumin Res. 2000; 36:171-177.

Gupta CS, Dighe RR. Biological activity of single chain chorionic gonadotropin, hCG $\alpha\beta$, is decreased upon deletion of five carboxyl terminal amino acids of the α -subunit without affecting its receptor binding. Journal of Molecular Endocrinology. 2000; 24:157-164.

Hafez ESE. The vagina and human reproduction. Am J Obstet Gynecol. 1977; 129: 573-584.

Hafez ESE, Hafez B. Reproducción e inseminación artificial en animales.7^a Ed. McGraw Hill Interamericana editors; 2002.

Hamilton WJ, Harrison RJ. Cyclical changes in the uterine mucosa and vagina of the goat. Journal of Anatomy. 1951; 85:316-324.

Hart BL, Jones TO. Effects of castration on sexual behavior of tropical male goats. Hormones and Behavior. 1975; 6:247-258.

Heydon RA, Adams NR. Comparative morphology and mucus histochemistry of the ruminant cervix: differences between crypt and surface epithelium. Biol Reprod. 1979; 21:557–562.

Hervé V, Roy F, Bertin J, Guillou F, Maurel MC. Antiequine chorionic gonadotropin (eCG) antibodies generated in goats treated with eCG for the induction of ovulation modulate the luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone bioactivities of eCG differently. *Endocrinology*. 2004; 145:294-303.

Horton EW, Polysier NL. Uterine luteolytic hormone: a physiological role for Prostaglandin F_{2a}. *Physiol Rev*. 1976; 56:595-651.

Hulet CV, Shelton M. Sheep and goats. En: E.S.E. Hafez (Ed.) *Reproduction in Farm Animals*. Philadelphia: Lea and Febiger (Ed.); 1980. p.346–357.

Hunter MG, Southee JA, McLeod BJ, Haresign W. Progesterone pretreatment has a direct effect on GnRH-induced preovulatory follicles to determine their ability to develop into normal corpora lutea in anoestrus ewes. *J Reprod Fertil*. 1986; 76:349-363.

Hunzicker-Dunn M, Mayo K. Gonadotropin signaling in the ovary. En: Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction*. Neill JD (Ed.) Third Edition. Elsevier; 2006. p. 547-592.

Inya T, Sumretprasong J. Serum progesterone profiles in Saanen crossbred goats during a 5-day progestin-based estrous synchronization protocol. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*. 2013; 47: 94-100.

Iwata E, Wakabayashi Y, Kakuma Y, Kikusui T, Takeuchi Y, Mori Y. Testosterone-dependent primer pheromone production in the sebaceous gland of male goat. *Biol Reprod*. 2000; 62:806-810.

Iwata E, Kikusui T, Takeuchi Y, Mori Y. Substances derived from 4-ethyl octanoic acid account for primer pheromone activity for the "male effect" in goats. *J Vet Med Sci*. 2003; 65:1019-1021.

Jansen HT, Iwamoto GA, Jackson GL. Central connections of the ovine olfactory bulb formation identified using wheat germ agglutinin-conjugated horseradish peroxidase. *Brain Res Bull*. 1998; 45:27-39.

Johansson E D B. Plasma levels of progesterone achieved by different routes of administration. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1972; 19 (suppl.): 17-20.

Kanai Y, Ishikawa N. Pulsatile secretion of luteinizing hormone and plasma levels of ovarian steroids during the estrous cycle in the Shiba goat. *Japan J. Anim. Reprod.* 1988; 34:105-110.

Karaca T, Arikan S, Kalende H, Yoruk M. Distribution and heterogeneity of mast cells in female reproductive tract and ovary on different days of the oestrous cycle in Angora goats. *Reproduction in Domestic Animals.* 2008;43:451–456.

Karsch FJ, Foster DL, Legan SJ, Ryan KD, Peter GK. Control of the preovulatory endocrine events in the ewe: interrelationship of estradiol, progesterone, and luteinizing hormone. *Endocrinology.* 1979;105: 421-426.

Karsch FJ, Bittman EL, Foster DL, Goodman RL, Legan SJ, Robinson JE. Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. *Recent Progress in Hormone Research.* 1984; 40:185-232.

Keller M, Bedos M, Jouhannau M, Martini M, Retana-Márquez S, Delgadillo JA. Pheromonal modulation of reproductive function in mammals. *Tropical and Subtropical Agroecosystems.* 2012; 15:103-111.

Kinabo LDB, McKellar Q. Pharmacokinetics of halofuginone in cattle. *The British Veterinary Journal.* 1989; 145: 546-551.

Kimzey LM, Gumowski J, Merriam GR, Grimes GJ JR, Nelson LM. Absorption of micronized progesterone from a nonliquefying vaginal cream. *Fertil Steril.* 1991;56: 995-996.

Kleinstejn J, Schlegelmilch R, Mazur D, Vens-Cappell B. Pharmacokinetic comparison of progesterone capsules with a progesterone gel after vaginal administration. *Arzneimittelforschung.* 2002; 52:615–621.

Knight CH, Wilde CJ, McLeod BJ, Haresign W. Exogenous GnRH induces ovulation in seasonally anoestrous lactating goats (*Capra hircus*). J Reprod Fert. .1988; 83: 679-686.

Knights M, Maze TD, Bridges PJ, Lewis PE, Inskoop EK. Short-term treatment with a controlled internal drug releasing (CIDR) device and FSH to induce fertile estrus and increase prolificacy in anestrus ewes. Theriogenology. 2001; 55:1181–1191.

Kumar S, Purohit GN. Effect of a single subcutaneous injection of melatonin on estrous response and conception rate in goats. Small Ruminant Research. 2009; 82:152-155.

Kusina NT, Tarwirei F, Hamudikuwanda H, Agumba G, Mukwena J. A comparison of the effects of progesterone sponges and ear implants, PGF_{2α}, and their combination of efficiency of estrus synchronization and fertility of Mashona goat does. Theriogenology. 2000; 53:1567–1580.

Lassoued N, Khaldi G, Cognié Y, Chemineau P, Thimonier J. 1995. Effect of progesterone on ovulation length and duration of the ovarian cycle induced by the male effect in the Barbarine ewe and the local Tunisian goat. Reprod Nutr Dev. 1995; 35:415-26.

Leboeuf B, Delgadillo JA, Manfredi E, Piacère A, Clément V, Martin P, Pellicer M, Boué P, De Cremoux R. Management of goat reproduction and insemination for genetic improvement in France. Reprod Domest Anim. 2008; 43:379-385.

Lei ZM, Rao CV. Novel presence of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin (hCG) receptors and the down-regulation action of hCG on gonadotropin releasing hormone gene expression in immortalized hypothalamic GT1-7 neurons. Mol Endocrinol Anim. 1994; 8:1111–1121.

Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. J Am Ch Soc. 1958; 80: 2587-2587.

Levine H, Watson N. Comparison of the pharmacokinetics of Crinone 8% administered vaginally versus Prometrium administered orally in postmenopausal women. *Fertil Steril*. 2000; 73:516–521.

Levy T, Yairi Y, Bar–Hava I, Shalev J, Orvieto R, Ben–Rafael Z. Pharmacokinetics of the progesterone-containing vaginal tablet and its use in assisted reproduction. *Steroids*. 2000; 65: 645-649.

Light JE, Silvia WJ, Reid RC. Luteolytic effect of prostaglandin F2 α and two metabolites in ewes. *Journal of animal science*. 1994; 72:2718-2721.

Lincoln GA, Short RV. Seasonal breeding: nature’s contraceptive. *Recent Prog Horm Res* .1980; 36:1-52

Lincoln GA, Ebling FJP. Effect of constant- release implants of melatonin on seasonal cycles in reproduction, prolactin secretion and moulting in rams. *J Reprod Fertil*. 1985; 73: 241-253.

Loftsson T, Jarho P, Másson M, Järvinen T. Cyclodextrins in drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. 2005; 2: 335-51.

López Sebastián A, Gómez A, Inskoop K. Eficacia en el uso de la presencia de los machos como método de control del ciclo sexual en la oveja. En: 10th International Congress of Animal Reproduction & AI. Urbana, Illinois (USA); ICAR; 1984.

López Sebastián A, González De Bulnes J, Santiago Moreno J. Dinámica folicular en relación a los sistemas tradicionales de control de ciclo sexual. *Pequeños Rumiantes*. 2002; 3:18-23.

López Sebastián A, Santiago-Moreno J, Gómez-Brunet A. Tecnologías alternativas al uso de tratamientos hormonales en los métodos de control de la reproducción en pequeños rumiantes. En: VI Curso Internacional Innovaciones en Reproducción Animal. Montecillo, Texcoco (México); 2009.

Lopez-Sebastián A, Coloma MA, Toledano A, Santiago-Moreno J. Hormone-free protocols for the control of reproduction and artificial insemination in goats. *Reprod Domest Anim.* 2014; 49:22-29.

Luna-Orozco JR, Fernández IG, Gelez H, Delgadillo JA. Parity of female goats does not influence their estrous and ovulatory responses to the male effect. *Anim Reprod Sci.* 2008; 106:352-60.

Maia M.S. Efeito da condição corporal e anestro pós-parto sobre o restabelecimento da atividade ovariana de cabras Canindé. *Cienc. Vet. Trop.* 1998; 1: 94–98.

Maia A JR, Alencar De Araújo A, Flores MG. Indução e sincronização do estro e da ovulação em cabras leiteiras Saanen com uso de dispositivos vaginais associados ou não à eCG ou efeito macho (Estrous and ovulation induction in Saanen dairy goats using different intravaginais devices with or without eCG or male effect). *Acta Veterinaria Brasilica.* 2009; 3:157-162.

Maillet F, Audinot V, Malpaux B, Bonnad A, Delegrange P, Migaud M, Barrett P, Viaud-Massuard M, Leisieur D. Molecular pharmacology of the ovine melatonin receptor: comparison with recombinant human MT1 and MT2 receptors. *Biochemical Pharmacology.* 2004; 67:667-677.

Malpaux B. Seasonal regulation of reproduction in mammals. Neill JD (Ed), Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction*. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier; 2006.p. 2231-2282.

Malpaux B, Wayne N, Karsch FJ. Termination of the breeding season in the Suffolk ewe: involvement of an endogenous rhythm of reproduction. *Biology of Reproduction.* 1988; 39: 254-263.

Malpaux B, Daveau A, Maurice F, Gayrard V, Thiéry JC. Short-day effects of melatonin on luteinizing hormone secretion in the ewe: Evidence for central sites of action in the mediobasal hypothalamus. *Biology of Reproduction.* 1993; 48:752-760.

Malpaux B, Viguié C, Skinner DC, Thiéry JC, Chemineau P. Control of the circannual rhythm of reproduction by melatonin in the ewe. *Brain Research Bulletin*. 1997; 44:431-438.

Malpaux B., Thiery JC, Chemineau P. From the eye to the pituitary: pathways controlling seasonal reproduction. En: Third Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction. Angers (France). *Reproduction in Domestic Animals Supplement*, 1999; 6:8-14.

Malpaux B, Migaud M, Tricoire H, Chemineau P. Biology of Mammalian Photoperiodism and the Critical Role of the Pineal Gland and Melatonin. *J Biol Rhythms*. 2001; 16:336-347.

Mani AU, McKelvey WAC, Watson ED. The effects of low level of feeding on response to synchronization of estrus, ovulation rate and embryo loss in goats. *Theriogenology*. 1992; 38:1013-1022.

Mani AU, McKelvey WAC, Watson ED. Effect of undernutrition on gonadotropin profiles in nonpregnant, cycling goats. *Anim Reprod Sci* .1996; 43:25-33.

Martini LG, Coles M, Gravell K, Stephenson S, Thompson CM. The use of a hydrophobic matrix for the sustained release of a highly water soluble drug. *Drug Dev Ind Pharm*. 2000; 26:79-83.

Maurel MC, Roy F, Hervé V, Bertin J, Vaiman D, Crihiu E, Manfredi E, Lantier I, Poué P, Guillou F. Immune response to equine Chorionic Gonadotropin used for the induction of ovulation in goats and ewes. *Gynecol Obstet Fert*. 2003; 31: 766-769.

McCracken JA, Schramm W, Okulicz WC. Hormone receptor control of pulsatile secretion of PGF₂alpha from the ovine uterus during luteolysis and its abrogation in early pregnancy. *Anim Reprod Sci*. 1984; 7:31-55.

McCracken JA, Custer EE, Lamsa JC. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiological Reviews*. 1999; 79: 263-304.

Medan MS, Watanabe G, Sasaki K, Sharawy S, Groome NP, Taya K. Ovarian Dynamics and Their Associations with Peripheral Concentrations of Gonadotropins, Ovarian Steroids, and Inhibin During the Estrous Cycle in Goats. *Biol Reprod* .2003; 69: 57–63.

Medan MS, Watanabe G, Sasaki K, Groome NP, Sharawy S, Taya K. Follicular and hormonal dynamics during the estrous cycle in goats. *J Reprod Dev*. 2005; 51: 455-463.

Mellado M, Olivas R, Ruiz F. Effect of buck stimulus on mature and pre-pubertal norgestomet-treated goats. *Small Rumin Res* . 2000; 36:269-274.

Menchaca A, De Castro T, Rubianes E. Tratamientos cortos con progesterona para inducir y sincronizar celos durante el anestro estacional en cabras inseminadas artificialmente (Short priming progesterone treatment to oestrus induction associated to artificial insemination during anoestrus season in goats). En: *Proceedings of the III International Symposium on Animal Reproduction*. Córdoba, Argentina. 1999; p.236 (abstract).

Menchaca A, Rubianes E. Effect of high progesterone concentrations during the early luteal phase on the length of the ovulatory cycle of goats. *Anim Reprod Sci*.2001; 68:69–76.

Menchaca A, Rubianes E. Relation between progesterone concentrations during the early luteal phase and follicular dynamics in goats. *Theriogenology*. 2002; 57: 1411–1419.

Menchaca A, Rubianes E. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*. 2004; 16: 403 – 413.

Menchaca A, Miller V, Salveraglio V, Rubianes E. Endocrine, luteal and follicular responses after the use of the Short-Term Protocol to synchronize ovulation in goats. *Anim Reprod Sci*. 2007; 102:76-87.

Miles RA, Paulson RJ, Lobo RA, Press MF, Dahmouh L, Sauer MV. Pharmacokinetics and endometrial tissue levels of progesterone after administration by intramuscular and vaginal routes: a comparative study. *Fertility and Sterility*.1994; 62:485-490.

MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y MEDIO AMBIENTE [Internet]. Madrid: 2013[citado Jun 2015]. Disponible en: <http://www.magrama.gob.es/es/>

Moaeen-Ud-Din M, Yand LG, Chen SL, Zhang ZR, Xiao JZ, Wen QY, Dai M. Reproductive performance of Matou goat under sub-tropical monsoonal climate of Central China. *Trop Anim Health Prod* .2008; 40:17-23.

Mori Y, Kano Y. Changes in plasma concentrations of LH, progesterone and oestradiol in relation to the occurrence of luteolysis, oestrus and time of ovulation in the Shiba goat (*Capra hircus*). *J Reprod Fertil*. 1984; 72:223-230.

Murata K, Wakabayashi Y, Sakamoto K, Tanaka T, Takeuchi Y, Mori Y, Okamura H. Effects of brief exposure of male pheromone on multiple-unit activity at close proximity to kisspeptin neurons in the goat arcuate nucleus. *J Reprod Dev*. 201; 57: 197–202.

Murphy BD. Equine chorionic gonadotropin: an enigmatic but essential tool. *Anim. Reprod*. 2012; 9: 223-230.

Nahoul K, Dehennin L, Jondet M, Roger M. 1993. Profiles of plasma estrogens, progesterone and their metabolites after oral or vaginal administration of estradiol or progesterone. *Maturitas*.1993; 16: 185-202.

Nillius SJ, Johanson EDB. Plasma levels of progesterone after vaginal, rectal, or i.m. injection of progesterone. *Am J Obstet Gynecol* 1971; 110:470 –7.

Norman AW, Litwack G. *Hormones*. 2nd edn.. London, UK : Academic Press;1997.

Nowak R, Rodway RG. Effect of intravaginal implants of melatonin on the onset of ovarian activity in adult and prepubertal ewes. *J Reprod Fertil*. 1985; 74: 287-293.

Nowak R, Young IR, McMillen IC. Emergence of the diurnal rhythm in plasma melatonin concentrations in newborn lambs delivered to intact or pinealectomized ewes. *J Endocrinol* .1990; 125: 97-102.

Nuti LC, Bretzlaff KN, Elmore RG, Meyers SA, Rugila JN, Brinsko SP, Blanchard TL, Weston PG. Synchronization of estrus in dairy goats treated with prostaglandin F at various stages of the estrous cycle. *Am. J. Vet. Res.*1992; 53:935-937.

O'Callaghan D, Karsch FJ, Boland MP, Roche JF. Role of short days in timing the onset and duration of reproductive activity in ewes under artificial photoperiods. *Biol Reprod.*1991; 44:23-28.

ORGANIZACION DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACION Y AGRICULTURA. Dirección de Estadística [Internet]. Roma: FAO; 2013[citado Jun 2015]. Disponible en: <http://faostat3.fao.org/>

Orizaba-Chávez B, Alba-Jasso GA, Ocharán-Hernández ME. Farmacocinética de la progesterona. *Rev Hosp Jua Mex.* 2013; 80: 59-66.

O'Shea JD, Rodgers RJ, Wright PJ. Morphometric analysis and function in vivo and in vitro of corpora lutea from ewes treated with LHRH during seasonal anoestrus. *J Reprod Fertil.* 1984; 72: 75-85.

Ott RS, Nelson DR, Hixon JE .Effect of presence of the male on initiation of estrous cycle activity of goats. *Theriogenology* .1980; 13: 183-190.

Papkoff H. Chemical and biological properties of the subunits of pregnant mare serum gonadotropin. *Biochem Biophys Res Commun* .1974; 58:397-404.

Pautler EL, Hall FL. Movement of melatonin across the retinal pigment epithelium. *Expl Eye Res* .1987; 45: 351-355.

Pearce DT, Oldham CM, Haresign W, Gray SJ. Effects of duration and timing of progesterone priming on the incidence of corpora lutea with a normal life-span in Merino ewes induced to ovulate by the introduction of rams. *Anim Reprod Sci.* 1987;13: 81–89.

Pelletier J, Thimonier J. Interaction between ovarian steroids or progestagens and LH release. *Ann Biol anim Bioch Biophys.* 1975;15: 131–146.

Pelletier J, Gonzalez-Stagnaro C, Baril G, Corteel JM. Induced preovulatory discharge of LH during the seasonal anoestrus of the goat (author's transl). *C R Seances Acad Sci III* .1982; 294:867-870.

Pellicer-Rubio MT, Leboeuf B, Bernelas D, Forgerit Y, Pougard JL, Bonné JL, Senty E, Chemineau P. Highly synchronous and fertile reproductive activity induced by the male effect during deep anoestrus in lactating goats subjected to treatment with artificially long days followed by a natural photoperiod. *Anim Reprod Sci.* 2007;98:241-258.

Pellicer-Rubio MT, Leboeuf B, Bernelas D, Forgerit Y, Pougard JL, Bonné JL, Senty E, Breton S, Brun F, Chemineau P. High fertility using artificial insemination during deep anoestrus after induction and synchronisation of ovulatory activity by the "male effect" in lactating goats subjected to treatment with artificial long days and progestagens. *Anim Reprod Sci.* 2008; 109:172-188.

Pérez-Martínez M, Mendoza ME, Romano MC. Exfoliative vaginal cytology and plasma levels of estrone and estradiol-17 β in young and adult goats. *Small Ruminant Research* .1999; 33:153–158.

Perez Ripoll M. La fauna de vertebrados. En: B. Marti Oliver y col. *Cova de L'Or* (Beniarrés- Alicante) Vol.2. Serv. Invest. Prehist. Valencia: Ed.Valencia;1980.p. 193-255.

Peter AT, Bosu WK, Liptrap RM, Cummings E. Temporal changes in serum prostaglandin F₂alpha and oxytocin in dairy cows with short luteal phases after the first postpartum ovulation. *Theriogenology*. 1989; 32: 277-284.

Peters AR, Lamming GE. Lactational anoestrus in farm animals. *Oxf Rev Reprod Biol*.1990; 12:245-288.

Poon A, Chow PH, Mak AS, Pang SF. Autoradiographic localization of 2-[125I] iodomelatonin binding sites in the gastrointestinal tract of mammals including humans and birds. *J Pineal Res* .1997; 23:5-14.

Poulton AL, Symons AM, Kelly MI, Arendt J. Intraruminal soluble glass boluses containing melatonin can induce early onset of ovarian activity in ewes. *J Reprod Fertil*. 1987;80: 235-239.

Prandi A, Motta M, Chiesa F, Tamanini C. Circannual rhythm of plasma prolactin in the goat. *Anim Reprod Sci*. 1988; 17:85-94.

Rajamahendran R, Sianangama PC .Effect of human chorionic gonadotropin on dominant follicles in cows: formation of accessory corpora lutea, progesterone production and pregnancy rates. *J Reprod Fertil* .1992; 95 :577–584.

Reiter RJ. The mammalian pineal gland: structure and function. *Am. J. Anat*. 1981; 162: 281-313.

Reitz C, Kleinebudde P. Solid lipid extrusion of sustained release dosage forms. *Eur J Pharm Biopharm*. 2007; 67:440-448.

Rekwot PI, Ogwu D, Oyedipe EO, Sekoni VO. The role of pheromones and biostimulation in animal reproduction. *Anim Reprod Sci*. 2001; 65:157-170.

Restall BJ. Seasonal variation in reproductive activity in Australian goats. *Anim Reprod Sci*. 1992; 27:305-318.

Restall BJ, Restall H, Walkden-Brown SW. The induction of ovulation in anovulatory goats by oestrous females. *Anim Reprod Sci.* 1995; 40:299-303.

Rivas-Muñoz R, Fitz-Rodríguez G, Poindron P, Malpoux B, Delgadillo JA. Stimulation of estrous behavior in grazing female goats by continuous or discontinuous exposure to males. *J Anim Sci.* 2007;85: 1257-1263.

Riviere JE. Pharmacokinetics of nanomaterials: an overview of carbon nanotubes, fullerenes and quantum dots. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2009; 1: 26-34.

Robin N, Laforest JP, Lussier JG, Guilbault LA. Induction of estrus with intramuscular injections of GnRH or PMSG in lactating goats (*capra hircus*) primed with a progestagen during seasonal anestrus. *Theriogenology.* 1994; 42: 107-116.

Robinson TJ, Smith JF. The evaluation of SC-9880 impregnated intravaginal sponges used with or without PMS for the advancement of the breeding season of British breed ewes. En: T. J. Robinson (Ed.).*The Control of the Ovarian Cycle in Sheep.* Sidney, N. S. W. Australia: Sidney University Press; 1967.p. 158.

Romano JE Effect of two doses of cloprostenol in two schemes for estrous synchronization in Nubian goats. *Small Ruminant Research.* 1998a; 28:171-176.

Romano JE, Fernández Abella D. Effect of service on duration of oestrus and ovulation in dairy goats. *Anim Reprod Sci.* 1997; 47:107-112.

Ronayne F, Jordan B, Quirke JF, Roche JF. The effect of frequency of administration of melatonin on the time of onset of the breeding season in anoestrous ewes. *Anim Reprod Sci.* 1989; 18 : 13-24.

Rosa HJD ,Bryant MJ. The 'ram effect' as a way of modifying the reproductive activity in the ewe. *Small Ruminant Research.*2002; 45: 1–16.

Roy F, Maurel FC, Combes B, Vaiman D, Cribiu EP, Lantier I, Pobel T, Delétang F, Combarous Y, Guillou F. The Negative Effect of Repeated Equine Chorionic Gonadotropin Treatment on Subsequent Fertility in Alpine Goats Is Due to a Humoral Immune Response Involving the Major Histocompatibility Complex. *Biol Reprod.* 1999; 60:805-813.

Rubianes E, De Castro T, Kmaid S. Estrous response after short progesterone priming in seasonally anestrus goats. *Theriogenology* .1998; 49: 356.

Rubianes E, Menchaca A. The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats. *Anim Reprod Sci.* 2003; 78:271-287.

Rubianes E, Menchaca A, Carbajal B. Response of the 1–5 day aged ovine corpus luteum to prostaglandin F_{2α}. *Anim. Reprod. Sci.* 2003; 78: 47–55.

Saharrea A, Valencia J, Balcázar A, Mejía O, Cerbón JL, Caballero V, Zarco L. Premature luteal regression in goats superovulated with PMSG: effect of hCG or GnRH administration during the early luteal phase. *Theriogenology.* 1998; 50:1039–1052.

Saleh M, Shahin M, Wuttke W, Gauly M, Holtz W. Pharmacokinetics of human chorionic gonadotropin after i.m. administration in goats (*Capra hircus*). *Reproduction.* 2012; 144:77-81.

Sánchez Rodríguez M, Gil Rubio MJ, Aparicio Oliver D. Análisis y estudios sectoriales. Situación económica actual del sector caprino en Andalucía. En: Informe Anual del Sector Agrario en Andalucía. Andalucía. Analistas Económicos de Andalucía.Unicaja; 2007.p. 381-396.

Sánchez-Rodríguez M. Producción e Higiene Veterinaria [Apuntes] 5º Curso Licenciatura en Veterinaria 2007-2008. Universidad de Córdoba, Facultad de Veterinaria. Córdoba: UCO; 2007 [Inédito].

Sangha GK, Sharma RK, Guraya SS. Biology of corpus luteum in small ruminants. *Small Ruminant Research* 2002; 43:53–64.

Santiago-Moreno J, González De Bulnes J, Gómez Brunet A, López Sebastián, A. Effect of season on the resumption of postpartum cyclic ovarian activity in Mouflon (*Ovis gmelini musimon*) and Manchega sheep (*Ovis aries*). *Small ruminant Research*. 2000; 36:69-74.

Santiago-Moreno J, Gómez-Brunet A, González-Bulnes A, Malpoux B, Chemineau P, Pulido-Pastor A, López-Sebastián A. Seasonal ovulatory activity and plasma prolactin concentrations in the Spanish ibex (*Capra pyrenaica hispanica*) maintained in captivity. *Reprod Nutr Dev* .2003; 43:217-224.

Santiago-Moreno J., Gómez-Brunet A, Toledano-Díaz A., Gónzalez-Bulnes A, López-Sebastián A. Seasonal endocrine changes and breeding activity in Mediterranean wild ruminants. *Reprod Domest Anim* .2006; 41:72-81.

Savio JD, Thatcher WW, Badinga L, De La Sota RL, Wolfenson D. Regulation of dominant follicle turnover during the oestrous cycle in cows. *J Reprod Fert*.1993; 97: 197-203.

Schinckel PG. The effect of the presence of the ram on the ovarian activity of the ewe. *Aust. J. Agric. Res.* 1954;5: 465-469.

Schirar A, Cognié Y, Louault F, Poulin N, Levasseur MC, Martinet J. Resumption of oestrus behaviour and cyclic ovarian activity in suckling and no suckling ewes.*J Reprod Fertil* 1989; 87:789-794.

Senger PL. Pathways to pregnancy and parturition. 2nd revised edn.USA: Pullman, WA: Current Conceptions; 2005.

Shelton M. The influence of the presence of the male on initiation of oestrus cycling and ovulation in Angora does. *J Anim Sci*.1960; 19: 368-375.

Shelton M. Reproduction and breeding of goats. *J Dairy Sci* .1978; 61:994-1010.

Shelton M. Goats: influence of various exteroceptive factors on initiation of estrus and ovulation. *Int. Goat Sheep Res.*1980; 1: 156–162.

Simões J. Recent advances on synchronization of ovulation in goats, out of season, for a more sustainable production. *Asian Pacific Journal of Reproduction.* 2015; 4: 157-165.

Simões J, Almeida JC, Valentim R, Baril G, Azevedo J, Fontes P, Mascarenhas R. Follicular dynamics in Serrana goats. *Anim Reprod Sci.* 2006; 95:16-26.

Simões J, Almeida JC, Baril G, Azevedo J, Fontes P, Mascarenhas R. Assessment of luteal function by ultrasonographic appearance and measurement of corpora lutea in goats. *Anim Reprod Sci.* 2007; 97: 36-46.

Simões J, Baril G, Cunha T, Azevedo J, Teixeira V, Ribeiro CF, Mascarenhas R. Oestrus and ovulatory response of goats with different parity to male effect and short-term progestagen treatment. *Reprod Domes Anim.* 2008; 43: 71 (Abstract p74).

Simon JA, Robinson DE, Andrews MC, Hildebrand JR 3RD, Rocci ML JR, Blake RE, Hodgen GD. The absorption of oral micronized progesterone: the effect of food, dose proportionality and comparison with intramuscular progesterone. *Fert Steril.*1993.60: 26-33.

Stella VJ, HE Q. Cyclodextrins. *Toxicol Pathol.* 2008; 36: 30-42.

Stoufferb RL, Nixon WE, Gulyas BJ, Johnson DK, Hodgenb GD. In vitro evaluation of corpus luteum function of cycling and pregnant rhesus monkeys: Progesterone production by dispersed luteal cells. *Steroids.* 1976;27:543-551.

Sutherland SRD. Progesterone concentration and pulsatile LH secretion during normal oestrus cycles in Angora-cross does. En: 4th AAAP Animal Science Congress. Hamilton, New Zealand; 1987a. p.246.

Sutherland SRD. Progesterone and estrogen requirements for oestrous behaviour in goats and sheep. En: 4th AAAP Animal Science Congress. Hamilton, New Zealand; 1987b.p. 227.

Sugiyama T, Masaki J, Sasada H, Yamashita K. Unusual Fatty Acids with Specific Odor from Mature Male Goat, *Agricultural and Biological Chemistry*.1981; 45: 2655-2658.

Takada T, Kikkawa Y, Yonekawa H, Kawakami S, Amano T. Bezoar (*Capra aegagrus*) is a matriarchal candidate for ancestor of domestic goat (*Capra hircus*): evidence from the mitochondrial DNA diversity. *Biochem Genet*. 1997; 35:315-26.

Tamarkin L, Baird CJ, Almeida OF. Melatonin: a coordinating signal for mammalian reproduction? *Science*. 1985; 227:714-720.

Tamboura H, Sawadogo L, Wereme A. Caractéristiques temporelles et endocriniennes de la puberté et du cycle oestral chez la chèvre locale "Mossi" du Burkina Faso. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*. 1998 ; 2:85-91.

Thimonier J. Control of seasonal reproduction in sheep and goats by light and hormones. *J Reprod Fertil Suppl*. 1981;30:33-45.

Thimonier J. Périodes anovulatoires chez les mammifères domestiques. Colloque de la Société Française pour la Fertilité.Paris, France; 1986.

Thimonier J. Practical uses of prostaglandins in sheep and goat. *Acta vet scand Suppl* .1981; 77: 193-208.

Tielgy AH, Fathali M, Omar MA, Al-Dahash S. The clinical and morphological characteristics of the uterus of the goat during the period of involution. *Can. Vet. J* 1982; 23:138– 140.

Tricoire H, Locatelli A, Chemineau P, Malpoux B. Melatonin enters the cerebrospinal fluid through the pineal recess. *Endocrinology*. 2002; 143:84-90.

Underwood EJ, Shier FL, Davenport N. Studies in sheep husbandry in Western Australia. V. The breeding season of Merino crossbred and British breed ewes in the agricultural districts. *J Dep Agric West Aus.* 1944; 11:135–143.

Ungerfeld R. Socio-sexual signalling and gonadal function: Opportunities for reproductive management in domestic ruminants. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 2007; 64: 207-221.

Ungerfeld R, Ramos MA, González-Pensado SP. Ram effect: Adult rams induce a greater reproductive response in anestrus ewes than yearling rams. *Anim Reprod Sci.* 2008; 103: 271-277.

Van Hoogevest P, Wendel A. The use of natural and synthetic phospholipids as pharmaceutical excipients. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2014; 116: 1088–1107.

Vielma J, Hernandez H, Véliz FG, Flores JA, Duarte G, Malpoux B., Delgadillo JA. Buck vocalizations stimulate estrous behavior in seasonal anovulatory female goats. *Reproduction in Domestic Animals.* 2005; 40:360-368.

Vila JL, Delgado MB. Matrices lipídicas como formas orales de liberación prolongada. *Ind Farm.*1992; 5: 85-97.

Vilariño M, Rubianes E, Menchaca A. Re-use of intravaginal progesterone devices associated with the short-term Protocol for timed artificial insemination in goats. *Theriogenology.* 2011; 75:1195-1200.

Viñoles C, Rubianes E. Origin of the preovulatory follicle after induced luteolysis during the early luteal phase in ewes. *Can. J. Anim.Sci.* 1998; 78: 429–431.

Walkden-Brown SW, Restall BJ, Henniawati. The male effect in the Australian cashmere goat. 1. Ovarian and behavioural response of seasonally anovulatory does following the introduction of bucks. *Anim Reprod Sci.*1993; 32:41-53.

Walkden-Brown SW, Restall BJ, Henniawati. The male effect in the Australian cashmere goat. 2. Role of olfactory cues from the male. *Anim Reprod Sci.* 1993; 32:55-67.

Walkden-Brown SW, Restall BJ, Henniawati. The male effect in the Australian cashmere goat. 3. Enhancement with buck nutrition and use of oestrous females. *Anim Reprod Sci.* 1993; 32:69-84.

Walkden-Brown SW, Restall BJ, Norton BW, Scaramuzzi RJ. The "female effect" in Australian cashmere goats: effect of season and quality of diet on the LH and testosterone response of bucks to oestrous does. *J Reprod Fertil.* 1994; 100:521-31.

Walkden-Brown SW, Restall BJ, Norton BW, Scaramuzzi RJ, Martin GB. Effect of nutrition on seasonal patterns of LH, FSH and testosterone concentration, testicular mass, sebaceous gland volume and odour in Australian Cashmere goats. *J Reprod Fertil.* 1994; 102:351-360.

Walkden-Brown SW, Restall BJ. Environmental and social factors affecting reproduction. En: VI International Conference on Goats. Beijing: Eds: Host, PJ. International Academic Publishers; 1996. p. 762-775.

Walkden-Brown SW, Martin GB, Restall BJ. Role of male-female interaction in regulating reproduction in sheep and goats. *J Reprod Fertil Suppl.* 1999; 54: 243-257.

Welch RAS, Andrews WD, Barnes DR, Bremmer K, Harvey TG. CIDR dispensers for oestrus and ovulation control in sheep. En: 10th International Congress on Animal Production and Artificial Insemination. Illinois (USA); University of Urbana-Champaign; 1984.p. 254-355.

Wentzel D, Celliers JJE, Botha LJJ. Time-course of decreasing progesterone levels in prostaglandin-treated Angora goat does. *Agroanimalia.* 1978; 10: 55-56.

Wheaton JE, Carlson KM, Windels HF, Johnston Lee J. CIDR: A new progesterone-releasing intravaginal device for induction of estrus and cycle control in sheep and goats. *Anim Reprod Sci.*1993; 33: 127–141.

Wheeler AG, Baird DT, Land RB, Scaramuzzi RJ. Increased secretion of progesterone from the ovary of the ewe during the preovulatory period. *J. Reprod. Fert.*1975; 45:519-522.

Wildeus S. Current concepts in synchronization of estrus: Sheep and goats. *J Anim Sci.* 2000; 77:1-14.

Yoon H, Enquist LW, Dulac C. Olfactory inputs to hypothalamic neurons controlling reproduction and fertility. *Cell.* 2005; 123: 669-682.

Zarazaga LA, Guzmán JL, Domínguez MC, Pérez MC, Prieto R. Effect of plane of nutrition on seasonality of reproduction in Spanish Payoya goats. *Anim Reprod Sci.* 2005; 87:253-267.

Zarazaga LA, Guzmán JL, Domínguez MC, Pérez MC, Prieto R. Effects of season and feeding level on reproductive activity and semen quality in Payoya buck goats. *Theriogenology.* 2009a; 71: 1316-1325.

Zarazaga LA, Celi I, Guzmán JL, Malpoux B. Nutritional and neuroendocrinological involvement in the control of leuteinizing hormone secretion of Mediterranean goats females during the onset of the seasonal anoestrous season. En: Congress of the European Association of the Animal Production. Barcelona; 2009.

Zarazaga LA. Master en zootecnia y gestión sostenible: ganadería ecológica e integrada. Utilización de implantes de melatonina y progesterona para reducir el anestro postparto de cabras paridas en periodo de anestro estacionario. Línea de Investigación: AGR 233.Tecnología de la Producción Animal (Reproducción en caprino) Curso 2009/2010. Universidad de Córdoba. Facultad de Veterinaria. Córdoba: UCO; 2009.

Zarazaga LA, Celi I, Guzmán JL, Malpoux B. The role of nutrition in the regulation of luteinizing hormone secretion by the opioidergic, dopaminergic, and serotonergic systems in female Mediterranean goats. *Biol Reprod.* 2011; 84:447-454.

Zarazaga LA, Celi I, Guzmán JL, Malpoux B. The response of luteinizing hormone secretion to photoperiod is modified by the level of nutrition in female Mediterranean goats. *Anim Reprod Sci.* 2011; 126:83-90.

Zarazaga LA, Celi I, Guzmán JL, Malpoux B. Enhancement of the male effect on reproductive performance in female Mediterranean goats with long day and/or melatonin treatment. *Vet J.* 2012;192:441-444.

Zarco L, Stabenfeldt GH, Quirke JF, Kindahl H, Bradford GE. Release of prostaglandin F_{2α} and the timing of events associated with luteolysis in ewes with oestrous cycles of different lengths. *J Reprod Fertil.* 1988;83: 517-526.

Zeder MA, Hesse B. The initial domestication of goats (*Capra hircus*) in the Zagros mountains 10,000 years ago. *Science.*2000; 287:2254-2257.

Zeder MA. Domestication and early agriculture in the Mediterranean Basin: Origins, diffusion, and impact. *PNAS.*2008; 105:11597-11604.

Zeder MA. Archaeological approaches to documenting animal domestication. En:
Zeder MA, Emshwiller E, Smith BD, Bradley DG, eds. *Documenting Domestication: New Genetic and Archaeological paradigms.* Berkeley: Univ of California Press; 2006.p. 171-180.

Zufall F, Leinders-Zufall T. The cellular and molecular basis of odor adaptation. *Chem Senses.* 2000; 25:473-481.

