

Protocolo para Proyecto de Investigación 2014

Titulo del proyecto

Inducción de la actividad sexual de machos cabríos tratados con testosterona y/o mas hembras estrogenizadas inducen la actividad estral en hembras criollas anovulatorias en diferentes épocas del año

Introducción

Algunos caprinos de las zonas subtropicales (25°-35° N y S) presentan un periodo de reposo sexual durante la primera mitad del año en la cual las hembras no presentan ciclos estrales, esto provoca una marcada estacionalidad de la producción de leche y cabrito. Mientras que en los machos existe una mala calidad espermática, con una baja libido, y un bajo comportamiento sexual (Carrillo et al., 2010; Delgadillo et al., 2004). Por eso la necesidad de la creación de nuevas biotecnologías que satisfagan las necesidades de los caprinocultores que enfrentan este problema. Por ejemplo, en los machos de las razas Alpinos del norte de México (26° N) estabulados y bien alimentados de enero a julio, tienen una calidad seminal mala, además tienen un peso testicular bajo, la latencia al eyaculado, y el número de rechazos al eyacular se incrementa al doble (Carrillo et al., 2010). En los machos cabríos el comportamiento sexual es dependiente de la secreción de testosterona, la cual disminuye durante el periodo de reposo sexual (Delgadillo, 2005; Carrillo et al., 2010). La actividad reproductiva en mamíferos es dependiente de las hormonas, en varios casos el entorno social puede ejercer alguna acción moduladora (Véliz et al., 2002). Durante el periodo de anestro la actividad sexual puede ser estimulada y sincronizada al ponerlas en contacto con machos cabríos activos, lo que se conoce como efecto macho (Delgadillo et al., 2003), también de hembra-hembra que se conoce como "efecto hembra" en el caso de la utilización de hembras estrogenizadas que estas a su vez también inducen a los machos en reposo sexual. En cabras que se encuentren en anestro estacional, la introducción repentina del macho cabrío y/o hembra estrogenizada provoca el reinicio de la actividad reproductiva cíclica, esto resulta en un rápido incremento en la frecuencia de liberación de pulsos de la hormona luteinizante (LH), seguida por un pico preovulatorio de la misma gonadotropina y la ovulación (Chemineau, 1987). Con el uso de nuevas biotecnologías como son el uso de tratamientos hormonales, los cuales se han venido utilizando en machos cabríos del norte de México dando muy buenos resultados, como son: la aplicación de Testosterona (T4) descrita por Luna-Orozco et al., 2012, Ángel-García et al., 2011 y el uso de la bioestimulación sexual de machos cabríos con hembras estrogenizadas, descrita por Rodríguez-Martínez et al., 2013, Carrillo et al., 2011, han dado como resultados estimular el comportamiento sexual de machos cabríos en época de reposo sexual y estos a su vez estimulan a las hembras anovulatorias. Por ejemplo se encontró que la latencia al eyaculado es menor en machos cabríos tratados con T4, y machos estimulados con hembras estrogenizadas, mejorando el volumen del eyaculado y la calidad espermática, en comparación con los machos no tratados (Ángel-García et al., 2011). Aplicando estas nuevas biotecnologías a nivel de campo, tenemos como resultado inducir la actividad sexual de las hembras anovulatorias, y logrando a su vez la producción de leche y cabrito fuera de la época natural reproductiva con lo cual se puede producir leche todo el año, logrando de esta manera mejores ingresos en los sistemas de producción caprina en el norte de México. La actividad reproductiva de los animales domésticos puede ser influenciada por varios factores como son: la raza, la localización, el fotoperiodo y la alimentación entre otras (Ibrahim, 1997; Zamri and Haidari, 2006). La actividad sexual anual de las cabras ha sido estudiada en varias razas y en varias regiones (Al-Ghaban et al., 2008; Chemineau et al., 1992). Sin embargo, la información que se tiene en muchos aspectos de la actividad reproductiva es escasa y en muchos casos solamente se tienen las características de las locales y de las razas puras en sus regiones de origen. En efecto, donde existen más reportes es en los caprinos de las latitudes templadas (>35° Latitudes Norte o Sur), mientras que en las latitudes subtropicales (25 a 35° Latitudes Norte o Sur) es poca la información que se conoce. Los machos de las razas Alpinos y Saanen de las zonas templadas (45° N, la duración del día en el solsticio de invierno es aproximadamente de 8 h de luz y en el solsticio de verano es de 16 h de luz) muestran una marcada estacionalidad reproductiva. En estos machos mantenidos en condiciones naturales, el comportamiento sexual dependiente de la secreción de testosterona disminuye durante la primavera y el verano. En este periodo, el volumen del eyaculado y el número total de espermatozoides/ml disminuyen.

Objetivos

Evaluar la respuesta estral de hembras anovulatorias estimuladas con machos cabríos estimulados con testosterona y/o hembras estrogenizadas durante diferentes épocas del año.

Hipótesis

Los machos cabríos criollos estimulados con Testosterona (T4) y/o hembras estrogenizadas, en el efecto macho inducen la actividad sexual de las cabras anovulatorias.

Revisión de Literatura

Estacionalidad reproductiva en cabras

Algunas razas de caprinos originarios o adaptados a latitudes subtropicales presentan estacionalidad en su actividad reproductiva (Carillo et al., 2010, Delgadillo et al., 2003). Debido a las débiles variaciones fotoperiódicas que se registran en las regiones subtropicales, y a las importantes variaciones estacionales de la disponibilidad de alimento para los animales mantenidos en condiciones extensivas, algunos autores han sugerido que la alimentación es el principal factor que determina la actividad sexual en estas zonas (Delgadillo et al., 2003).

Actividad reproductiva del macho cabrío

En el macho las características reproductivas también se ven influenciadas por la época del año al igual que las hembras, de tal manera que su actividad sexual es durante los meses de mayo a diciembre (verano – otoño) seguida de un periodo de reposo sexual que ocurre de enero a abril (invierno - primavera) (Delgadillo et al., 1999). Durante el reposo sexual la secreción de LH, de testosterona, el peso testicular y de producción espermática cualitativa y cuantitativa se encuentran reducidos (Delgadillo et al., 1999).

Efecto macho-hembra: El efecto macho constituye un estímulo social que permite iniciar la actividad reproductiva tanto en ovejas y en cabras (Flores et al., 2000; Álvarez y Zarco, 2001; Delgadillo et al., 2003). En la actualidad, es una técnica de bioestimulación que se utiliza en diferentes latitudes del mundo para inducir la actividad sexual de las hembras anéstricas (Walkden-Brown et al., 1999; Delgadillo et al., 2003). La secreción de la LH permanece elevada mientras exista el contacto macho-hembra (Vielma et al., 2009).

Efecto hembra-macho: Al igual que las hembras son estimuladas en el efecto macho, los machos cabríos también pueden ser estimulados por la presencia de hembras en estro para que a su vez estimulen a otras hembras en anestro. Este proceso se le denomina "efecto hembra indirecto" (Álvarez y Zarco, 2001). Schanbacher et al. (1987) demostraron que en ovinos la estimulación de los machos por hembras inducidas artificialmente al estro es más eficiente durante el periodo de reposo sexual de los machos.

Efecto hembra-hembra: Existe un papel inductor a la actividad sexual por parte de las hembras caprinas de forma independiente del macho llamado "efecto hembra directo". Las hembras en estro son capaces de inducir una respuesta ovulatoria en sus compañeras en anestro estacional sin la necesidad de contar con la presencia del macho (Álvarez y Zarco, 2001).

Procedimiento Experimental

Localización del estudio. El estudio se llevara a cabo del 15 de febrero al 27 de abril y del 17 de abril al 29 de junio del 2014, en el semidesierto del norte de México (Latitud 26° 23' N y Longitud 104° 47' O). Se utilizaran caprinos de genotipo indefinido (mezcla de diversas razas lecheras multirraciales), los cuales son explotados en condiciones extensivas, además serán expuestos a las variaciones naturales del fotoperiodo de la región antes y durante el estudio.

Animales experimentales

Machos: Se utilizaran 12 machos cabríos adultos locales de la región, En febrero los machos serán estabulados y alimentados con una dieta que cubría sus necesidades fisiológicas. La alimentación será a base de heno de alfalfa (17 % PC, 1.95 Mcal de EM) a libre acceso y 200 g de concentrado comercial (14 % de proteína cruda, 1.7 Mcal de EM) por día y por animal durante todo el período experimenta y se adicionaron (block) sales minerales. Además estos machos serán divididos en cuatro grupos homogéneos (n=3 c/u) en cuanto a condición corporal, peso corporal, circunferencia escrotal y olor. Los grupos estarán separados a una distancia de más de 100 m entre grupos.

Inducción de la actividad sexual de los machos en el primer empadre. El día 23 de febrero un grupo de machos (GT; n=3) serán tratados con testosterona (50 mg/día/animal), vía IM, (Laboratorios Brovel, Mex) para estimular su actividad sexual en contra estación (Luna-Orozco et al., 2012), la cual será aplicada cada tercer día, durante 3

semanas. Otro grupo de machos (GTH; n=3) serán tratados con testosterona (50 mg/día/animal), vía IM, (Laboratorios Brovel, Mex) y serán expuestos a 2 hembras estrogenizadas al momento del empadre (inducción de los machos). Otro grupo de machos (GH; n=4) serán expuestos a 2 hembras estrogenizadas (previamente con cipionato de estradiol) durante 21 días. Y final mente otro grupo de machos (GC; n=4) serán tratados con una solución salina cada tercer día, por tres semanas.

Inducción de la actividad sexual de los machos en el segundo empadre. El día 25 de abril un grupo de machos (GT; n=3) ~~serán tratados con testosterona (50 mg/día/animal), vía IM, (Laboratorios Brovel, Mex) para estimular su~~ actividad sexual en contra estación (Luna-Orozco et al., 2012), la cual será aplicada cada tercer día, durante 3 semanas. Otro grupo de machos (GTH; n=3) serán tratados con testosterona (50 mg/día/animal), vía IM, (Laboratorios Brovel, Mex) y serán expuestos a 2 hembras estrogenizadas al momento del empadre (inducción de los machos). Otro grupo de machos (GH; n=4) serán expuestos a 2 hembras estrogenizadas (previamente con cipionato de estradiol) durante 21 días. Y final mente otro grupo de machos (GC; n=4) serán tratados con una solución salina cada tercer día, por tres semanas.

Hembras: Se utilizarán 80 hembras adultas locales, las cuales serán divididas en grupos homogéneos de 20 hembras y tratadas con 25 mg de progesterona vía intramuscular (Progestelas E, Qro., Mex.), como dosis única a las -24 h a la introducción de los machos, esto se realizara con la finalidad de que las hembras sean más receptivas y manifiesten el comportamiento estral a corto plazo (Véliz et al., 2009).

Formación de grupos experimentales (empadre). El día 15 de marzo (día 0), un grupo de 20 hembras anovulatorias (GS) será expuesto a 2 machos testigo, un segundo grupo de 20 hembras (GTH) será expuesto a otros 2 machos tratados con testosterona mas 2 hembras estrogenizadas, el tercer grupo de 20 hembras (GT) será expuesto a 2 machos tratados con testosterona, y el cuarto grupo 20 hembras (GH) será expuesto a otros 2 machos tratados con hembras estrogenizadas. Los machos y las hembras esteran en contacto durante 15 días. Los grupos esteran a más de 100 m entre ellos. Durante todo el periodo de estudio todos los animales se alojaran en corrales provistos de sombra, y divididos con maya y lonas que no permitían la visión entre grupos.

Variables evaluar

Prueba de comportamiento. El 15 y 16 de marzo cada grupo de machos será puesto en contacto con las hembras anovulatorias, el comportamiento sexual de los machos será evaluado durante los dos primeros días por una hora (0800- 0900) en la mañana. El comportamiento sexual será registrado por personas entrenadas. Las conductas sexuales registradas serán flehmen (labio superior levantado y cabeza erguida), el número de olfateos (investigación nasal de región anal-genital) aproximaciones, vocalizaciones, intento de montas, montas completas (montas acompañadas por oscilaciones pélvicas y eyaculación) (Véliz et al., 2006).

Actividad sexual de los machos y hembras. Se registrara la actividad sexual (intentos de monta, montas completas y montas con eyaculados) en las hembras durante las 24 h durante el periodo de estudio, donde se tomaran los registros del número de intentos de monta, montas completas, montas con eyaculación, que cada macho realizaba por hora por hembra. Para lo cual se utilizaran personal capacitado. Se registrara la actividad estral durante el periodo de estudio, donde se tomaran los registros de las hembras que muestren estro. Las hembras que permanecieran inmóviles a la monta del macho se consideraron en estro (Chemineau *et al.*, 1992).

Evaluación de la condición corporal: Se palpara las vertebras a la altura lumbar para evaluar la condición del animal mediante una escala del 1 al 4 siendo 0=delgadas, 4=obesas (Rivera-Lozano et al., 2006).

Evaluación del olor. El olor de cada macho se mediara mediante una escala 0-4, donde 0 es igual al olor de una hembra y 4 un olor muy intenso del macho.

Evaluación de la circunferencia escrotal. Se medirá mediante una cinta métrica tomando la base mas ancha de los testículos.

Toma de muestras de sangre. Se tomara una muestra de sangre de la vena yugular con un tubo con heparina. Este tubo será centrifugado durante 15 minutos a 2500 rpm y se extraerá el suero, este será congelado para su posterior análisis de testosterona. Tanto para la evaluación de la condición corporal, olor, circunferencia escrotal y toma de muestra de sangre, estas se realizaran al momento de la llegada de los animales, posteriormente al momento al inicio del tratamiento y cada 7 días de hasta finalizar el tratamiento.

Registro de la actividad motora de los machos. Se utilizaran podómetros digitales modelo JS-206B para registrar la actividad motora (número de pasos) de los machos cada 24 h durante el periodo de estudio.

Pruebas de calidad seminal. Se extraerá una muestra de semen mediante una vagina artificial y se evaluara: el color, volumen, motilidad, viabilidad y pH del semen.

Tasa ovulatoria. Se registrara la tasa ovulatoria, cuando se de el pico de estros a los 7 días y se hará un ultrasonido para ver las hembras que ovularon mediante ultrasonido.

Diagnóstico de gestación. La determinación de hembras gestantes se determinara a los 45 días después de la introducción de los machos. Lo cual se realizara mediante un ultrasonido (HS-2000, Honda Electronics CO, LTD.) por vía transrectal 7.0 MHz.

Análisis estadísticos

Las proporciones de hembras gestantes de los grupos se compararían mediante una prueba de Fisher Exacta. Los datos de prueba de comportamiento sexual se compararían mediante una prueba de chi-cuadrada. La proporción de gestación, celo y la proporción de partos se comparo mediante una prueba de Chi-cuadrada. La latencia al estro y el inicio de movimiento de cola de las hembras se comparó mediante una prueba de t-student. Para comparar la actividad sexual de los machos cabríos durante el día y la noche se ajuntara a 12 h cada uno. Todos los análisis estadísticos se efectuaran mediante el paquete estadístico SYSTAT 10 (Evenston, ILL, USA, 2000).

Cronograma de actividades.

Actividad a realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Estabulaciones de los animales	X	X	X	X	X	X	X					
Tratamiento de los animales		X	X	X	X							
Prueba de semen		X	X	X	X							
Prueba de comportamiento			X		X							
Empadre			X		X							
Diagnostico de preñez					X		X					
Numero de parto y prolificidad								X				X

5.-Productos esperados

1 Tesis de nivel doctorado
1 Articulo científico

6.-Literatura citada

- Carrillo, E., Meza-Herrera, C.A., Véliz, F.G. 2010. Reproductive seasonality of young French-Alpine goat bucks adapted to subtropical conditions in Mexico. *Tec. Pec. Méx.* 2, 169-178.
- Chemineau P.1983. Effect on oestrus and ovulation of exposing creole goats to the male at three times of the year. *J Reprod Fertil*, 65-72.
- De Santiago-Miramontes, M.A., Marcelino-León, S., Luna-Orozco, J.R., Rivas-Muñoz, R., Rodríguez-Martínez, R., Mellado-Bosque, M., Véliz-Deras, F.G. 2011. The presence of estrogenized females at the moment of male effect induce oestrous activity of goats in the Mexican semi-desert. *Rev. Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 17, 77-85.
- Delgadillo, J.A., Flores, J.A., Véliz, F.G., Hernández, H.F., Duarte, G., Vielma, J., Poindron, P., P., Malpoux, B., 2003.Control de la reproducción de los caprinos del subtropico mexicano utilizando tratamientos fotoperiódico y efecto macho. *Vet Mex*, 69-79
- Delgadillo JA. Inseminación artificial en caprinos. México. Editorial Trillas. 2005;91 p
- Flores, J. A., Véliz, F. G., Pérez-Villanueva, J.A., Martínez De La Escalera, G., Chemineau, P., Poindron, P., Malpoux, B., Delgadillo, J.A., 2000. Male reproductive condition is the limiting factor of efficiency in the male effect during seasonal anestrus in female goats. *Biol Reprod*, 1409-1414.
- Luna-Orozco, J.R., Guillen-Muñoz, J.M., De Santiago-Miramontes, M.A., García, J.E., Rodríguez-Martínez, R., Meza-Herrera, C.A., Mellado, M., Véliz, F.G., 2012. Influence of sexually inactive bucks subjected to long photoperiod or testosterone on the induction of estrus in anovulatory goats. *Trop. Anim. Health Prod.* 44, 71–75
- Mellado, M., Cardenas, C., Ruiz, F. Mating behavior of bucks and does in goat operations under range conditions. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 67, 89-96.
- Véliz, FG, Poindron, P., Malpoux, P., Delgadillo, J.A. 2006. Maintaining contact with bucks does not induce refractoriness to the male effect in seasonally anestrous female goats. *Anim. Reprod. Sci.* 92, 300–3009
- Véliz FG, Moreno S, Duarte G, Vielma J, Chemineau P, Poindron P, et al. 2002. Male effect in seasonally anovulatory lactating goats depends on the presence of sexually active bucks, but not estrous females. *Anim Reprod Sci*, 197-207.
- Walkden-Brown, S.W., Martin, G.B., Restall, B.J., 1999. Role of male-female interaction in regulating reproduction in sheep and goats. *J Reprod Fertil Supl*, 43-57.