

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE CIENCIAS AGRICOLAS



**SUPLEMENTACIÓN DE ÁCIDO FERÚLICO Y CLORHIDRATO DE
ZILPATEROL EN OVEJAS SINCRONIZADAS CON
PROGESTÁGENOS: METABOLISMO, ACTIVIDAD OVÁRICA Y
COMPORTAMIENTO REPRODUCTIVO**

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN SISTEMAS DE PRODUCCIÓN
ANIMAL**

PRESENTA:

Jennifer Montiel González

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Ulises Macías Cruz

EJIDO NUEVO LEÓN, MEXICALI, B.C.

DICIEMBRE, 2020.

La presente tesis titulada “**Suplementación de ácido ferúlico y clorhidrato de zilpaterol en ovejas sincronizadas con progestágenos: Metabolismo, actividad ovárica y comportamiento reproductivo**”, realizada por la **C. Jennifer Montiel González** y dirigida por el **Dr. Ulises Macías Cruz**, ha sido evaluada y aprobada por el Consejo particular abajo indicado, como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN SISTEMAS
DE PRODUCCIÓN ANIMAL**

Consejo Particular

Presidente/Director de Tesis



Dr. Ulises Macías Cruz

Sinodal



Dr. Leonel Avendaño Reyes

Sinodal



Dr. Abelardo Correa Calderón

“POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL HOMBRE”

Ejido Nuevo León, Mexicali Baja California México, diciembre de 2020.

AGRADECIMIENTOS

A Conacyt...

Al Instituto de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma de Baja California.

A mí Comité Particular.

DEDICATORIAS

A la vida...

A Dios...

A mi familia...

INDICE TEMÁTICO

ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Estacionalidad y actividad reproductiva de ovinos de pelo.....	3
2.2. Ciclo estral.....	6
2.3. Sincronización de estro en ovejas.....	8
2.4. Sincronización del estro con progestágenos y eCG.....	10
2.5. Ácido ferúlico.....	12
2.5.1. Composición química.....	13
2.5.2. Ácido ferúlico en la reproducción de la hembra.....	13
2.6. Clorhidrato de zilpaterol.....	15
2.6.1. Composición química.....	16
2.6.2. Mecanismo de acción reproductivo.....	17
2.7. Ácido ferúlico y clorhidrato de zilpaterol en protocolos de sincronización.....	18
III. MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1. Lugar de estudio.....	20
3.2. Animales, manejo e instalaciones.....	20
3.3. Diseño experimental, empadre y diagnóstico de gestación.....	21
3.4. Peso vivo y condición corporal.....	22
3.5. Análisis de metabolitos, hormonas metabólicas y progesterona.....	22
3.6. Evaluación de la actividad ovárica.....	22
3.7. Actividad estral y comportamiento reproductivo.....	23
3.8. Análisis estadístico.....	24
IV. RESULTADOS	25
4.1. Estado corporal.....	25
4.2. Metabolismo y progesterona.....	25

4.3. Actividad ovárica.....	28
4.4. Comportamiento reproductivo.....	30
V. DISCUSIÓN	32
5.1. Estado corporal.....	32
5.2. Metabolismo y progesterona.....	32
5.3. Actividad ovárica.....	35
5.4. Comportamiento reproductivo.....	37
VI. CONCLUSIONES	39
LITERATURA CITADA	40

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Efecto del ácido ferúlico y el clorhidrato de zilaterol en el estado corporal de ovejas Dorper sincronizadas para estro con progestágenos.....	25
Cuadro 2. Efecto del ácido ferúlico y el clorhidrato de zilaterol en las concentraciones séricas de metabolitos, hormonas metabólicas y progesterona de ovejas Dorper sincronizadas para estro con progestágenos..	26
Cuadro 3. Efecto del ácido ferúlico y el clorhidrato de zilaterol en la actividad ovárica de ovejas Dorper sincronizadas para estro con progestágenos.....	29
Cuadro 4. Efecto del ácido ferúlico y el clorhidrato de zilaterol en la conducta estral y comportamiento reproductivo de ovejas Dorper sincronizadas para estro con progestágenos.	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del ácido ferúlico.....	13
Figura 2. Estructura general de AA- β y de clorhidrato de zilpaterol.....	16
Figura 3. Efecto de la interacción tratamiento x día en las concentraciones séricas de triglicéridos, colesterol y urea en ovejas Dorper sincronizadas para estro con progestágenos..	27
Figura 4. Efecto de la interacción tratamiento x día en las concentraciones séricas de tiroxina en ovejas Dorper sincronizadas para estro con progestágenos.....	28
Figura 5. Distribución de estros post-retiro de la esponja en ovejas Dorper sincronizadas para estro con progestágenos y clorhidrato de zilpaterol o ácido ferúlico.....	31

RESUMEN

El objetivo fue evaluar los efectos de la suplementación dietaria de ácido ferúclico (FA) y clorhidrato de zilpaterol (CZ) sobre actividad ovárica, metabolismo y comportamiento reproductivo de ovejas de pelo sincronizadas con progesterona sintética. Un total de 39 ovejas Dorper fueron distribuidas bajo un diseño de bloques completamente al azar a tres tratamientos (n= 13), los cuales consistieron en aplicar un estimulante ovárico durante un protocolo de sincronización de estro de 10 d con progestágenos (n=13): 1) testigo, no recibió; 2) suplementación con 0.15 mg de CZ/kg de peso vivo/d; y 3) suplementación con 10 mg de AF/kg de peso vivo/d. Comparado con testigo, el AF aumentó ($P < 0.05$) concentraciones séricas de triglicéridos, colesterol, tiroxina y cortisol, mientras que CZ aumentó ($P < 0.05$) concentraciones séricas de triglicéridos, tiroxina y cortisol pero disminuyó ($P < 0.05$) urea e insulina. A nivel ovárico, el número de folículos emergentes fue menor ($P < 0.05$) con cualquier estimulante ovárico que en testigo, mientras que el número de folículos en crecimiento solamente disminuyó ($P < 0.05$) con la administración de CZ comparado al grupo testigo o de AF. El número de folículos pre-ovulatorios aumentó ($P < 0.05$) con suplementación de CZ y no varió ($P > 0.05$) debido a CZ en relación a grupo testigo. El tamaño de folículos emergentes fue mayor ($P < 0.05$) tanto con AF y CZ comparado con testigo, pero no hubo cambios ($P > 0.05$) en el tamaño de folículos en crecimiento y pre-ovulatorios. El número de cuerpo lúteos y su tamaño, así como las concentraciones séricas de progesterona fueron similares ($P > 0.05$) entre tratamientos. Comparado con testigo, el AF redujo ($P < 0.05$) el tiempo a estro y mejoró ($P < 0.05$) su agrupación, pero no CZ, quien redujo ($P < 0.05$) la tasa de preñez en relación a lo observado en testigo y tratados con AF. El resto de las variables de comportamiento reproductivo no fueron similares ($P > 0.05$) entre tratamientos. En conclusión, la inclusión de AF y CZ modificó el metabolismo de energía de las ovejas durante el protocolo de sincronización, pero esto poco se reflejó en mejor actividad ovárica y eficiencia reproductiva. El AF podría ser empleado para mejorar la sincronía de la actividad estral en ovejas sincronizadas con progestágenos.

Palabras claves: Ovinos de pelo, progesterona, metabolismo, compuestos fenólicos

ABSTRACT

The objective was to evaluate the effects of dietary supplementation of ferulic acid (FA) and zilpaterol hydrochloride (ZH) on ovarian activity, metabolism, and reproductive performance of hair breed ewes synchronized with synthetic progesterone. Thirty-nine Dorper ewes were assigned under randomized complete block design to three treatments, which consisted of applying an ovarian stimulate during an 10-d estrus synchronization protocol with progestagens (n= 13): 1) control, without stimulate; 2) supplementation with 0.15 mg of ZH/kg of live weight/d; and 3) supplementation with 10 mg of FA/kg of live weight/d. Compared to control, FA increased ($P < 0.05$) serum concentrations of triglycerides, cholesterol, thyroxin and cortisol, while ZH increased ($P < 0.05$) serum concentrations of triglycerides, thyroxin and cortisol but decreased ($P < 0.05$) urea and insulin. At the ovarian level, the number of emerging follicles was lower with any stimulate respect to control, however, the number of growing follicles decreased ($P < 0.05$) only with ZH feeding compared to control and FA group. The FA, but not ZH ($P > 0.05$), increased ($P < 0.05$) the number of pre-ovulatory follicles in relation to control. The size of emerging follicles was higher ($P < 0.05$) using FA and ZH than in control, but there were not changes ($P > 0.05$) for size of growing and pre-ovulatory follicles. Number and area of corpus luteum, as well as the serum progesterone concentration were similar ($P > 0.05$) among treatments. Compared to control, FA decreased ($P < 0.05$) interval to estrus and caused a more compact appearance of estrus ($P < 0.05$), but not ZH who decreased ($P < 0.05$) pregnancy rate compared to that observed in control and FA-fed. The rest of reproductive performance variables were similar ($P > 0.05$) among treatments. In conclusion, the dietary inclusion of FA and ZH modified energy metabolism of ewes during the synchronization protocol, but this was little reflected in better ovarian activity and reproductive efficiency. The FA could be used to improve the synchrony of estrous activity in progestogen-synchronized sheep.

Keywords: Hairbreed sheep, progesterone, metabolism, phenolic compounds

I. INTRODUCCIÓN

La industria cárnica ovina demanda una mayor producción de corderos de engorda para poder abastecer el mercado nacional de carne de borrego, por lo cual el uso de protocolos de sincronización de estro basado en hormonas sintéticas es una estrategia reproductiva ampliamente utilizada en las explotaciones (Lozano-González et al., 2012). El protocolo que mejores resultados ha dado en cuanto a porcentaje de sincronización de estro, tasa de ovulación, fertilidad y prolificidad, es donde las ovejas se tratan con progesterona sintética (10 o 12 d) y 400 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG) 24 h antes o al momento de finalizar dicho protocolo (Quintero-Elisea et al., 2011; Abecia et al., 2012; Aké-López et al., 2014a). Sin embargo, se ha demostrado que la aplicación continua de eCG en ovejas sincronizadas con progestágenos promueve el desarrollo de anticuerpos para dicha hormona (Roy et al., 1999), repercutiendo negativamente en la respuesta reproductiva esperada (Bodin et al., 1995; Bodin et al., 1997). En este sentido, actualmente se está buscando otras alternativas como co-tratamiento al protocolo de sincronización con progestágenos que ayuden, al igual que la eCG, a mejorar la actividad folicular, respuesta ovulatoria, concentración de estros, fertilidad y presencia de parto múltiples (Quintero-Elisea et al., 2011; Abecia et al., 2012).

Algunos estudios recientes señalan que el clorhidrato de zilpaterol (CZ; Gutiérrez et al., 2011; López-Carlos et al., 2018) y el ácido ferúlico (AF; Macías-Cruz et al., 2018) ayudan a estimular la actividad ovárica en ovejas vía activación del sistema insulina-glucosa y el aumento en la esteroidogénesis. El CZ es un agonista adrenérgico β_2 (AA- β_2) similar a las catecolaminas que se une a receptores adrenérgico β_2 (RA- β_2) localizado en la corteza ovárica para promover el ciclo ovárico, incluyendo el crecimiento folicular y la esteroidogénesis (Bersmann, 1998; Greiner et al., 2008). Por su parte, el AF es compuesto fenólico natural extraído de granos de cereales principalmente, el cual funciona como antioxidantes, modulador del metabolismo (De Paiva 2013; Macías-Cruz et al., 2018), y estimulador de la producción de estrógenos (Naowaboot et al., 2016) y de la hormona de crecimiento (Gorewit, 1983); así que un estudio reciente señaló que la suplementación de AF en ovejas prepuberes

estimulaba la actividad ovárica debido a sus efectos antioxidantes y a la activación del sistema insulina-glucosa (Macías-Cruz et al., 2018). Por lo tanto, el AF y el CZ al igual que la eCG podrían ayudar a estimular la foliculogénesis y la ovulación, al mismo tiempo que mejoran el comportamiento reproductivo de ovejas sincronizadas con progestágenos sintético.

Cabe mencionar que al momento no hay trabajos que hayan evaluado el AF como bio-estimulador de la actividad ovárica en ovejas sincronizadas con progestágenos, mientras que el CZ ya se ha evaluado en un estudio previo con cierto éxito (López-Carlos et al., 2018); aunque en ese estudio no dilucidaron el posible mecanismo que llevó a ese efecto benéfico. Por lo anterior, se plateó la hipótesis que tanto AF y CZ funcionaban como bioestimuladores de la actividad ovárica a través de modificar el metabolismo de energía, causando una mejor eficiencia reproductiva en ovejas sincronizadas con progestágenos sintéticos. El objetivo fue evaluar los efectos de la suplementación dietaria de AF y CZ sobre actividad ovárica, metabolismo y comportamiento reproductivo de ovejas de pelo sincronizadas con progesterona sintética.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Estacionalidad y actividad reproductiva de ovinos de pelo

La estacionalidad reproductiva es un mecanismo adaptativo que presentan los pequeños rumiantes que les ha permitido sobrevivir a través del tiempo, ya que permite que los partos ocurran en la época más favorable del año, donde la disponibilidad de pastos es abundante y la temperatura confortable para sus crías (Arroyo, 2011). Aunque cabe mencionar que en la actualidad la intensidad de la estacionalidad reproductiva varía entre razas y especies. En pequeños rumiantes persiste y su patrón circanual reproductivo se caracteriza por ser poliestrica estacional, con un periodo de receptividad sexual en los meses de menor fotoperiodo y la presencia de anestro en los meses de días largos (Arbues et al., 2018). Bajo las latitudes de México ($14^{\circ}31'55.56''$ – $32^{\circ}43'7.32''$ latitud norte), los ovinos presentan anestro entre los meses de febrero a junio, seguido por un reinicio paulatino en la actividad estral siendo más acentuado en los meses de otoño y primera mitad de invierno (Cerna et al., 2010).

Más que los aspectos nutricionales o ambientales, el fotoperiodo es el principal factor ambiental que regula la variación circanual reproductiva en pequeños rumiantes (Arbues et al., 2018). Esto se debe a que el ritmo circanual del fotoperiodo es constante a través de los años, mientras que otras variables climáticas presentan una elevada fluctuación (p.e. temperatura, humedad, radiación solar, otros; Wyse et al., 2018). Adicionalmente, los ovinos presentan un ritmo circanual endógeno que les permite identificar el inicio y fin del periodo reproductivo independientemente del fotoperiodo (Porrás et al., 2003; Arroyo, 2011). Así, evolutivamente, los ovinos cuentan con un mecanismo neuro-endócrino controlado por el fotoperiodo para definir su ritmo circadiano reproductivo a través de transformar una señal luminosa en una señal hormonal dando como resultado la síntesis y secreción de melatonina en la glándula pineal (Arroyo, 2011).

El mecanismo que controla la estacionalidad reproductiva inicia cuando la luz solar es captada por la retina ocular y esta información lumínica es transmitida al núcleo

supraquiasmático a través del tracto retinohipotalámico. Posteriormente, esta señal luminosa se convierte en una señal química (noradrenalina) en el núcleo paraventricular, la cual sincroniza la actividad de los pinealocitos en la glándula pineal por aumentar la acción de la enzima arilalquilamina-N-acetiltransferasa (AANAT; Arroyo et al., 2011; Tsutsui y Ubuka, 2018). Así, los pinealocitos sintetizan melatonina a través de un proceso de hidroxilación y descarboxilación de triptófano, aminoácido obtenido del torrente sanguíneo y transformado intermediariamente a serotonina (Coomans et al., 2015; Guadarrama-Ortiz et al., 2014; Porras et al., 2003; Tsutsui y Ubuka, 2018). Con la secreción de melatonina en la glándula pineal, se activa la secreción de algunos neuropéptidos en el eje hipotalámico como la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la hormona inhibidora de gonadotropinas (GnIH) y la kisspeptina; estos a su vez regulan la secreción hipofisiaria anterior de la hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH). Estas hormonas pituitarias intervienen a nivel gonadal con el desarrollo de los gametos (Tsutsui y Ubuka, 2018). Así, el fotoperíodo controla la estacionalidad reproductiva en ovinos por regular la actividad del eje hipotalámico-pituitario-gonadal (Tsutsui y Ubuka, 2018). De esta manera, los ovinos tienen la capacidad de detectar la disponibilidad de horas luz por día y a través de un mecanismo complejo neuroendocrino controlar su actividad reproductiva.

Cabe mencionar que algunas razas ovinas, principalmente las de pelo, son menos sensibles a la estacionalidad reproductiva, por lo que se consideran ovinos no anestricos que presentan solamente una disminución en la actividad reproductiva durante la época natural de anestro (Arroyo et al., 2007; De la Isla et al., 2010; Macías-Cruz et al., 2015). Esta baja sensibilidad a la estacionalidad reproductiva en ovinos de pelo se debe a su origen (Arbues et al., 2018; Arroyo et al., 2011). Los ovinos de pelo se originaron en las regiones tropicales del Ecuador, donde el fotoperíodo se mantiene relativamente constante a través del año; sin embargo, la mayoría de razas de lana tienen sus orígenes en regiones localizadas a latitudes $\geq 35^\circ$ (Hafez, 2004), donde la duración de horas luz fluctúa fuertemente a través de la época (Arroyo, 2011; Arbues et al., 2018). De hecho, en ovinos de pelo, específicamente en raza Pelibuey, Arroyo et al. (2007) sugieren la presencia de tres

patrones diferentes de actividad reproductiva circanual: 1) ovejas que muestran anestro estacional a pesar de cambios ligeros en el fotoperiodo característico de regiones ecuatoriales (~40 %); 2) ovejas que ovulan todo el año bajo el fotoperiodo ecuatorial al ser insensibles a las variaciones foto-periódicas de esa región (~60%); y 3) ovejas que ovulan continuamente en forma independiente al fotoperiodo al que sean expuestas (~20%).

En México desde hace algún tiempo se ha estudiado la actividad reproductiva en ovinos de pelo, principalmente de las ovejas Pelibuey (Cerna et al., 2000; Valencia et al., 2006; Arroyo et al., 2007; De la Isla et al., 2010; Macías-Cruz et al., 2015). Se ha comprobado que este tipo de ovejas de origen ecuatorial no presentan estacionalidad reproductiva como en razas de lana, por lo que algunos autores las consideran como ovejas cíclicas continuas que presentan periodos cortos de anestro poco profundo (Cerna et al., 2000; Valencia et al., 2006; Arroyo et al., 2007; De la Isla et al., 2010; Gastelum et al., 2015; Macías-Cruz et al., 2015). Así, en varios estudios hechos en la región templada del centro del país (~19 ° LN), se ha reportado una reducción en la presencia de estros y actividad ovulatoria durante los meses de primavera en ovejas Pelibuey (Cerna et al., 2000; Valencia et al., 2006; Arroyo et al., 2007).

Sin embargo, mientras que por un lado se ha observado que solo una tercera parte de las ovejas no presentan una estacionalidad reproductiva que marque la época de anestro, otras con una diferencia entre el día más largo y más corto de 2 h, puede ser suficiente para causar cambios en el ciclo reproductivo, en regiones ecuatoriales a una latitud ~19 ° N en ovejas Pelibuey. Desde otro punto de vista se menciona que durante la época de primavera (abril-junio) donde es más marcado la reducción de la actividad reproductiva, se podría sugerir un estímulo ejercido por el macho para minimizar o evitar el anestro, además de que esta reducción se le ha atribuido también a otros factores controladores del fotoperiodo como las condiciones ambientales a las que está sometida esta región (Cerna et al., 2000; Valencia et al., 2006; Arroyo et al., 2007). Esto coincide con estudios llevados a cabo en la región del trópico con latitudes de 21 a 22° N, donde se refleja casi el 50 % de disminución en la actividad ovárica de las ovejas, durante el periodo de febrero-mayo (Valencia et

al., 1981; González-Reyna et al., 1992; De La Isla et al., 2010). En esta región descartaron que la nutrición administrada sea un factor causante de esa disminución, sin embargo, sí se lo adjudicaron a condiciones ambientales como la temperatura y la humedad, e incluso al fotoperiodo.

Estudios más recientes hecho al noroeste de México a una latitud de 32° N donde predomina un clima árido seco, también ha reportado una disminución tanto en la actividad estral como ovulatoria durante el primer semestre de año (45 a 82 %), contrario a lo observado en la época de verano-otoño (julio-diciembre) donde 100 % de las ovejas mostraron actividad estral y ovulatoria (Gastelum et al., 2015; Macías-Cruz et al., 2015). Dadas las condiciones ambientales extremas que predominan, en esa región se esperaba que el estrés calórico de verano se convirtiera un factor predisponente junto con el fotoperiodo para controlar la reproducción. No obstante, se demostró en esos estudios que el mismo fotoperiodo es un factor más importante que las mismas temperaturas altas para regular el ritmo circadiano de la actividad reproductiva, principalmente a nivel ovárico (Gastelum-Delgado et al., 2015; Macías-Cruz et al., 2016). Si bien estrés calórico de verano no tuvo mucho efecto en la presencia de estro a través del año, se encontró que estas condiciones climáticas disminuían la funcionalidad del cuerpo lúteo, lo cual puede comprometer el mantenimiento de la gestación por una disminución en los niveles de progesterona circulante (Macías-Cruz et al., 2016; Tabarez-Rojas et al., 2009).

2.2 Ciclo estral

El ciclo estral se define como el intervalo entre dos estros y se caracteriza por la presencia de cambios conductuales, hormonales y fisiológicos, los cuales están asociados con la maduración de uno o más folículos y su posible ovulación a nivel de ovario (Rangel-Porta et al., 2010). Así, a través del ciclo estral se sincronizan diferentes eventos reproductivos para garantizar la coincidencia entre la ovulación y la receptiva sexualmente de la hembra al macho (Hafez y Hafez, 2004). En ovejas, el ciclo estral usualmente tiene una duración promedio de 17 días, con un estro que dura aproximadamente 30 a 36 h en ovejas multíparas (Rawling y Bartlewski, 2007) y resulta hasta 10 h más corto en ovejas nulíparas (Robison y Nuakes, 2019).

En general, el ciclo estral se divide en dos fases, folicular y luteal, la primera dura entre 3 y 4 días mientras que la segunda se alarga hasta 14 días en ovinos (Hafez y Hafez, 2004). Igualmente, el ciclo estral puede dividirse en cuatro etapas: proestro, estro, metaestro y diestro (Bartlewski et al., 2011). Tanto proestro y estro dan lugar a la fase folicular, mientras que el metaestro y diestro integran lo que es la fase lútea (Cunningham et al., 2014). En la fase folicular se observa un aumento de la actividad ovárica, ya que se presenta desarrollo folicular (reclutamiento, selección, dominancia y maduración) y ovulación, así como la parte final de la regresión del cuerpo lúteo. Hormonalmente, se encuentran niveles altos de FSH para estimular el crecimiento folicular, asimismo cuando hay presencia del folículo dominante que posteriormente se convierte en pre-ovulatorio, éste comienza a sintetizar y secretar gran cantidad de estradiol 17- β (estrógenos, E2); hormona que promueve una retroalimentación negativa a nivel de hipófisis anterior para detener la liberación de FSH. La liberación folicular de E2 causa también una retroalimentación positiva a nivel de hipotalámico para desencadenar la liberación de GnRH-LH, quien estimula a nivel de hipófisis la producción y síntesis de LH, hormona encargada de estimular la ovulación folicular en el ovario. Durante la fase folicular se encuentran niveles basales en las concentraciones de progesterona (P4) debido a la lisis del cuerpo lúteo. Otras hormonas ováricas que juegan un rol clave en la regulación de la síntesis y secreción de FSH pituitaria, es la inhibina y activina, las cuales ejercen acción solo a nivel de hipófisis acorde a lo que sugiere su nombre (Bartlewski et al., 2011; Cunningham et al., 2014; Hafez y Hafez, 2004). Conductualmente, se puede observar que las hembras al final de esta fase folicular (estro) presentan receptividad sexual con el macho, así como la secreción de moco liberado por las glándulas uterinas, cervicales y vaginales (Hafez y Hafez, 2004).

En la fase luteal, ya con la liberación del óvulo, las células de la teca y de la granulosa del folículo ovulatorio se exponen hacia la superficie del ovario para transformarse en células grandes y chicas, respectivamente; ambas dan lugar a la formación del tejido luteal, comúnmente conocido como cuerpo lúteo (Cunningham et al., 2014; Robison y Nuakes, 2019). El cuerpo lúteo es una glándula endócrina temporal como sus células secretan grandes cantidades de P4 con el objeto de

promover las condiciones uterinas para una posible gestación (Goodman y Inskeep, 2015). Adicionalmente, la P4 promueve una retroacción negativa a nivel hipotalámico para inhibir la secreción pulsátil de GnRH (Arroyo, 2011). Si la concepción del ovulo no se da, la funcionalidad del cuerpo lúteo comienza a disminuir y con ello su lisis por acción de la hormona prostaglandina F2 α (PGF2 α ; Robison y Nuakes, 2019). Esta hormona es secretada en el endometrio uterino por una retroalimentación positiva de estrógenos y oxitocina (Goodman y Inskeep, 2015). A medida que el cuerpo lúteo va sufriendo luteólisis, la retroalimentación negativa ejercida por la P4 a nivel hipotalámico va desapareciendo, y con ello, el ovario comienza a experimentar actividad folicular para el desarrollo de otro posible folículo pre-ovulatio (Robison y Nuakes, 2019). De esta manera, el ciclo estral se vuelve cíclico al iniciarse aproximadamente cada 17 d en el caso de ovejas.

Se considera que una oveja entra en una fase de anestro cuando dejan de exhibir actividad estral y, consecuentemente, receptibilidad al macho. El anestro se define como un periodo prolongado de descanso sexual, el cual puede presentarse de manera natural (gestación, estacionalidad reproductiva y periodo postparto) o inducido (problemas de salud o manejo alimenticio inadecuado; Robison y Nuakes, 2019). Cabe mencionar que el anestro estacional puede ser finalizado a través de protocolos de inducción del estro, ya sea hormonal o natural. Estos protocolos además de permitir inducir la actividad estral y ovulatoria en periodos de anestro, también permiten incrementar la fertilidad y hacer más eficiente la producción de corderos en las explotaciones (Abecia et al., 2012). Cabe mencionar, que también existen protocolo de sincronización de estro, los cuales han mostrado incrementar la eficiencia reproductiva en los rebaños, y por consiguiente es una de las herramientas biotecnológicas reproductiva con más uso en la industria ovina a nivel mundial.

2.3 Sincronización de estro en ovejas

La sincronización de estro en ovejas es un método estratégico de manejo reproductivo que ha permitido a los productores concentrar la presencia de estro en ovejas para empadre. Esto ha permitido a los productores programar destetes y partos en una época favorable, tanto económica para el productor y ambiental para el

animal (Aké-López et al., 2014a). Dependiendo del método de sincronización de estro, éste puede ser enfocado para manipular la fase lútea o folicular del ciclo estral; en ambas situaciones la manipulación va dirigida para mantener las ovejas en alguna de las fases hasta que todas alcanza la misma (Wildeus, 2000).

La $PGF_{2\alpha}$, los progestágenos y las gonadotropinas son las hormonas que más se usan dentro de los protocolos de sincronización de estro de ovejas (Abecia et al., 2012; Aké-López et al., 2014a). Estas hormonas dependiendo de su función natural permiten lograr varios enfoques, incluida la prolongación artificial o acortamiento de la fase lútea para retrasar o avanzar la llegada del estro. Mientras que la progesterona extiende la fase lútea, la $PGF_{2\alpha}$ la acorta (Hristova et al., 2011). No obstante, desde hace varias décadas los protocolos basados en progestágenos son los más usados y con éxito para mejorar el comportamiento reproductivo en ovejas. Así, los protocolos de sincronización de estro en ovejas se basan principalmente en imitar la fase lútea de la oveja mediante administración exógena de P4, cuya principal actividad es la de suprimir el estro y la ovulación a través de un mecanismo de retroalimentación negativa que ejercen sobre la liberación de GnRH, tal como naturalmente sucede (Aké-López et al., 2014b). Después de un período de tiempo (5 a 12 d), el dispositivo con progestágenos sintéticos se retira, eliminando el efecto de retroalimentación negativo sobre GnRH y, consecuentemente, las ovejas tratadas comenzarán a mostrar desarrollo folicular sincronizado y estro en forma sincrónica (Wang y Bai, 2019).

Los progestágenos pueden ser aplicados mediante inyecciones, dispositivos intravaginales (esponja o CIDR), e implantes subcutáneos (Lozano-González et al., 2012). También existen diferentes progestágenos sintéticos, tales como acetato de medioxiprogesterona (MAP), acetato de melangastrol (MGA) y acetato de flurogestona (FGA; Abecia et al., 2012; Ávila-Castillo et al., 2019; Quintero-Elisea et al., 2011). No obstante, el protocolo más utilizado es aquel donde esponjas de poliuretano impregnadas con 40 mg de FGA se colocan intravaginalmente entre 10 y 14 d (Wildeus, 2000). Los resultados de este protocolo muestran que entre 60 y 95% de las ovejas presentan estro dentro de las 24 y 48 h después del retiro (Cordero-

Mata et al., 2011). En actualidad, este protocolo presenta diversas variantes, desde menor tiempo de inserción de las esponjas en la vagina de las ovejas, hasta su aplicación en co-tratamiento con otras hormonas como gonadotropinas y PGF2 α (Yu et al., 2019).

En relación a los protocolos de sincronización de estro basado en la administración de PGF2 α , su uso se recomienda solamente durante la época reproductiva de la oveja, ya que es cuando hay garantía de la presencia de un cuerpo lúteo (Wildeus, 2000). La PGF2 α sincroniza el ciclo estral de las ovejas porque inhibe la producción de P4 al actuar directamente en la degeneración del cuerpo lúteo, logrando que los ovarios reinicien su actividad folicular (Wang y Bai, 2019). Inicialmente, este protocolo consistía en hacer una aplicación única de PGF2 α , pero los resultados eran poco alentadores (alrededor de 50% de respuesta a estro), por lo que posteriormente se modificó a dos inyecciones de 10 mg de PGF2 α en un intervalo de 7 d (Uribe-Velásquez et al., 2007). De esta manera, se favoreció la maduración de los folículos y la sincronización del pico preovulatorio de LH y la ovulación, ya que la restauración de la pulsatilidad de LH hasta alcanzar el pico preovulatorio es más temprana en presencia de cuerpos lúteos más jóvenes como secretan menos progesterona (Abecia et al., 2012). Comercialmente, la PGF2 α más usada es Lutalyse y su análogo Cloprostenol (Wildeus, 2000).

Cabe mencionar que en la última década se ha estado trabajando en disminuir el uso de hormonas en la producción animal, ya que se asocian con problemas de salud en los consumidores. Algunos métodos naturales que han mostrado el potencial para sincronizar y/o inducir la actividad estral se encuentran: control del fotoperiodo (Abecia et al., 2012), administración de sustancias naturales (Hasein y Haddad, 2006) y suplementaciones alimenticias (López et al., 2018).

2.4 Sincronización del estro con progestágenos y eCG

La gonadotropina coriónica equina (eCG) se aplica como un co-tratamiento al protocolo de sincronización de estro con progestágeno, generalmente 24 h antes o al retiro del progestágeno (Quintero-Elisea et al., 2011). La eCG tiene una actividad

similar a la FSH principalmente, y en menor grado a la LH (Arbues et al., 2018b), por consiguiente ayuda a estimular la actividad ovárica después de retirar el estímulo de la P4 sintética (Abecia et al., 2012). Así, esta hormona gonadotrópica aumenta el desarrollo y crecimiento folicular, y como consecuencia, acorta el tiempo de inducción del pico preovulatorio de LH y la ovulación (Cunningham et al., 2014). Cabe mencionar que la eCG tiene una vida media larga comparado con otras hormonas debido a la presencia de ácido siálico en su estructura; esto podría ser un problema si se considera que puede ayudar a reclutar folículos viejo o de mala calidad (Lamrani et al., 2018). De esta manera, la administración de eCG en protocolo con progestágenos se asocia con mayor presencia de ovejas en estro en un tiempo más corto (<36 h), así como una mayor tasa de ovulación, tasa de preñez, partos múltiples y prolificidad (Aké-López et al., 2014; Quintero-Elisea et al., 2011; Wildeus, 2000).

La dosis recomendada de eCG es entre 400 y 500 UI en ovejas (Barret et al., 2004), sin embargo, actualmente se conoce que la dosis aplicar depende de la raza, condición corporal, marca comercial del producto, edad, época del año, otros (Arbues et al., 2018b; Lozano-González et al., 2012; Macías-Cruz et al., 2013; Quintero-Elisea et al., 2011; Yu et al., 2019). Las ovejas de lana con marcada estacionalidad reproductiva, baja prolificidad y muy pesadas presentan menos sensibilidad ovárica por lo que requieren de una mayor cantidad de eCG para estimular actividad folicular (Ben Säid et al., 2007). Contrariamente, ovejas como las de pelo que son más prolíficas, y menos pesadas y estacionales, necesitan dosis más bajas (Macías-Cruz et al., 2013). De hecho, para ovinos Pelibuey y Blackbelly, Quintero-Elisea et al. (2011) encontraron que una dosis óptima de 400 UI de eCG 24 h antes del retiro mejora significativamente la eficiencia reproductiva, mientras que Macías-Cruz et al. (2013) señalaron una dosis de tan solo 280 UI en ovejas cruzadas de Pelibuey x Romanov. También Quintero-Elisea et al. (2010) reportaron en ovejas Pelibuey una dosis superior a 200 UI de eCG para tener consistentemente mejor eficiencia reproductiva cuando realizaban inseminación artificial por laparoscopia o monta natural. Por lo tanto, considerando que la raza Romanov es muy prolífica, es de

esperarse que requieran menos estimulante ovárico para mejorar el comportamiento reproductivo, tal como lo demostraron Macías-Cruz et al. (2013).

Un punto en contra que tiene el uso de eCG, a parte de su vida media larga, es el hecho que su aplicación repetida en diferentes protocolos de sincronización a una oveja activa su sistema inmunológico creando anticuerpo anti-eCG (Roy et al., 1999). Así que el uso repetido de esta hormona en protocolos de sincronización de estro con progestágenos produce a largo plazo nullos beneficios (Bodin et al., 1995; Bodin et al., 1997). Adicionalmente, dada su alta acción como FSH y baja acción como LH, algunos estudios señalan que eCG puede causar la formación de folículos persistentes anovulatorios, y por ende baja fertilidad (Luna et al., 2019; Menchaca et al., 2009; Simonetti et al., 2008). Otros estudios también señalan que la alta variabilidad de eCG en la función de la LH puede causar la reanudación precoz de las meiosis en el ovocito, lo que resulta en aneuploidía y por ende problemas de desarrollo embrionario temprano (Monniaur et al., 1984; Luna et al., 2019). En este sentido, Bodin et al. (1997) han sugerido buscar alternativas para estimular la actividad ovárica en protocolo de sincronización de estro con progestágenos.

2.5 Ácido ferúlico

El AF es un compuesto natural derivado de plantas y cereales principalmente que pertenece a la familia de los ácidos hidroxicinámicos y se considera como un compuesto fenólico (Chandrosekra, 2018; Kumar y Pruthi, 2014). En plantas, este compuesto fenólico se localiza principalmente en los componentes de la pared celular enlazado a la lignina a través de enlaces covalentes; sus principales funciones es dar rigidez a la planta y actuar agente antimicrobiano (De Paiva et al., 2013). Al igual que otros compuestos fenólicos, el AF se sintetiza en el retículo endoplásmico de la planta y se almacenan en las vacuolas (Gan et al., 2019).

El AF es considerado un alimento funcional debido a sus funciones antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, antidiabético, anticolesterolémico, otras (Kumar y Pruthi, 2014). Por lo anterior, la industria farmacéutica ha mostrado mucho interés para su uso en la elaboración de medicamento de uso humano. En producción

animal, los efectos benéficos del AF han sido menos estudiados, sin embargo, actualmente se conoce que funciona como promotor de crecimiento en animales que experimentan estrés oxidativo (Wang et al., 2019a,b; Peña-Torres et al., 2020), así como también evita la oxidación de la carne alargando su vida de anaquel (González-Ríos et al., 2013; 2016). En la reproducción animal también ha mostrado mejorar la actividad ovárica (Macías-Cruz et al., 2018) y maduración de ovocitos (Naowaboot et al., 2016).

2.5.1 Composición química

La estructura química del ácido ferúlico (ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico) se caracteriza por tener un anillo de benceno, con dos grupos (un hidroxilo y un metoxi) unidos a los carbonos 3 y 4 del ácido propenoico (Lee y Hyung, 2017). Se biosintetiza mediante la ruta del ácido shikímico a partir de fenilalanina y tirosina (Gan et al., 2019). El doble enlace de la cadena lateral le confiere dos isómeros: *cis* (líquido aceitoso amarillo) y *trans* (cristal blanco), cabe mencionar que el isómero *trans* es el más común en la naturaleza (De Paiva et al., 2013).

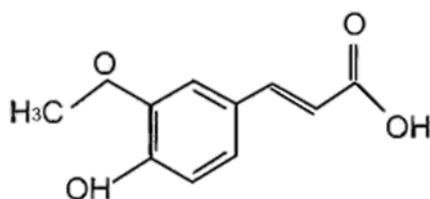


Figura 1. Estructura química del ácido ferúlico.

2.5.2 Ácido ferúlico en la reproducción de la hembra

El impacto que tiene el AF en la reproducción de animales domésticos no ha sido aún estudiado a profundidad. Sin embargo, algunos estudios sugieren efectos benéficos, principalmente como un promotor de la actividad ovárica (Macías-Cruz et al., 2018) y maduración de los ovocitos en estudios *in vitro* (Lee y Hyun, 2017; Tanihara et al., 2018). En corderas prepúberes, la suplementación de 300 mg de AF/día mostró inducir la pubertad durante la época de anestro natural y la madurez

sexual (Macías-Cruz et al., 2018). Adicionalmente en ese estudio observaron que el número de folículos grandes y de cuerpos lúteos por cordera aumentó debido al AF. Otro estudio conducido con ovocitos de puerco madurados *in vitro* reportó que la adición de este compuesto fenólico en el medio de cultivo mejoró la tasa de maduración y fertilización en los ovocitos (Tanihara et al., 2018). La maduración *in vitro* de embriones de cerdos también se mejora con la inclusión del AF en el medio de cultivo, considerando que la tasa de formación de blastocitos y el número de células por blastocito aumentaron con la adición del fenol al medio (Lee y Hyun, 2017). Usando un modelo murino, un estudio encontró que el AF contrarrestó parcialmente todos los efectos negativos de los rayos gamma en el desarrollo y funcionamiento del ovario, de tal manera que este compuesto aumentó el peso del ovario y útero al mismo tiempo que promovió una secreción más normal de LH, FSH y E2, así como en la estructura histológica de los ovarios (Abdel Fattah et al., 2019).

También existen estudios donde usaron planta o extractos de plantas que contenían AF, con resultados similares a los mencionados previamente cuando ofrecieron AF libre. Así, unas ratas alimentadas con el extracto de la planta *Petroselinum sativum* tuvieron un mayor peso uterino, lo cual se asoció con un aumento en la actividad estrogénica (Slighoua et al., 2021). Por su parte, Moshfegh et al. (2016) alimentaron a ratones hembras con polen de la palma datilera egipcia (fuente rica en AF) y observaron que este tratamiento mejoró la población folicular, tamaño del cuerpo lúteo, y concentraciones séricas de P4 y E2.

Cabe mencionar que actualmente no se han definido los mecanismos específicos por los cuales AF genera estos efectos benéficos reproductivos en los animales. Sin embargo, se han sugerido algunos basados en resultados de concentraciones de analitos sanguíneos que requieren ser evaluados. El AF es considerado un potente antioxidante por lo que el principal mecanismo asociado con los efectos positivos en la reproducción es éste (Abdel-Fattah et al., 2019; Wang et al., 2019). Una disminución en las concentraciones de especies reactivas de oxígeno junto con un aumento en la producción de enzimas con actividad antioxidante han sido ampliamente demostrados en animales tratados con AF (Wang et al., 2019). Otro mecanismo está relacionado

con la modulación del sistema insulina-glucosa, el cual permite una mayor entrada de glucosa a los folículos para su crecimiento (Macías-Cruz et al., 2018).

Recientemente, Slighoua et al. (2021) sugirió que los compuestos fenólicos como AF tienen actividad esteroigénica, lo cual aumenta las concentraciones de E2 y sus precursores favoreciendo la proliferación de células a través de la activación de la síntesis de biomoléculas en el tejido uterino; esto explica el aumento en el peso del tracto reproductivo de hembras alimentadas con AF. Al parecer, AF activa la producción de E2 por intervenir en la conversión de colesterol a esta hormona esteroidea (Black et al., 1994). Al respecto, Moshfegh et al. (2016) señalan que compuestos fenólicos como AF pueden aumentar la actividad de la enzima citocromo p450, encargada del transporte del colesterol para su esteroidogénesis.

El AF parece también promover la síntesis de hormonas de la hipófisis anterior, ya que hay evidencias de un aumento en los niveles séricos de la hormona de crecimiento (Gorewit, 1983), FSH y LH (Abdel-Fattah et al., 2019). Esto pudiera estar repercutiendo positivamente en una mejor sincronía del eje hipotálamo-hipófisis-gónada. Estudios *in vitro* señalan que el AF controla a nivel de ovocito y embrión la vía de los factores de supervivencia aumentando al gen Nrf2, el cual induce la síntesis de glutatión intracelular y protege a los ovocitos del estrés oxidativo (Lee y Hyun, 2017).

2.6 Clorhidrato de zilpaterol

El CZ es un AA- β_2 parecido a las catecolaminas que ejerce efectos biológicos en el animal por unirse a receptores adrenérgicos β_2 (RA- β_2). Este AA- β_2 es una droga que actúa vía adrenérgica para modificar el metabolismo y la deposición músculo-grasa corporal (Barnes et al., 2019; Herago y Agonafir, 2017), y también se le atribuyen efectos en los procesos reproductivos asociados con la actividad ovárica (Jordan et al., 1981). Hasta ahora mucho se ha estudiado al CZ como un promotor de crecimiento en animales de engorda, pero poca atención ha recibido el hecho que puede impactar positivamente en la reproducción de los animales (López-Carlos et al., 2018).

El CZ es uno de los dos AA- β permitidos como promotor de crecimiento en engorda de ganado, y esto se debe a que es 12 veces menos potente que el popular AA- β clenbuterol (Avendaño-Reyes et al., 2006), el cual está prohibido actualmente (Domínguez-Vara et al., 2010). Adicionalmente, se ha reportado que su residualidad es baja en los diferentes tejidos que puede consumir el humano, por lo que se sugiere que no es tóxico en las personas que consumen regularmente carne ovina (Shelver y Smith, 2006).

2.6.1 Composición química

El CZ es una catecolamina análoga proveniente de una familia de compuestos farmacológicamente conocidos como AA- β . De acuerdo a su nomenclatura internacional se le conoce como (\pm) -Trans-4, 5, 6, 7-Tetrahydro-7 hidroxil-6 - (isopropilamino) imidazol [4,5,1-jk]-[1] benzazepin - 2 (1H) -uno, monohidrocloruro (FAO, 2012). Estos AA- β son compuestos sintéticos que comparten una estructura química base común, es decir, un anillo aromático de seis asas con un grupo hidroxilo unido al nitrógeno cargado positivamente al β -carbono en la cadena lateral de etilamina, así como un sustituyente en el nitrógeno alifático, el cual corresponde al receptor β específico (Smith, 1998; Beerman, 2014; Figura 2).

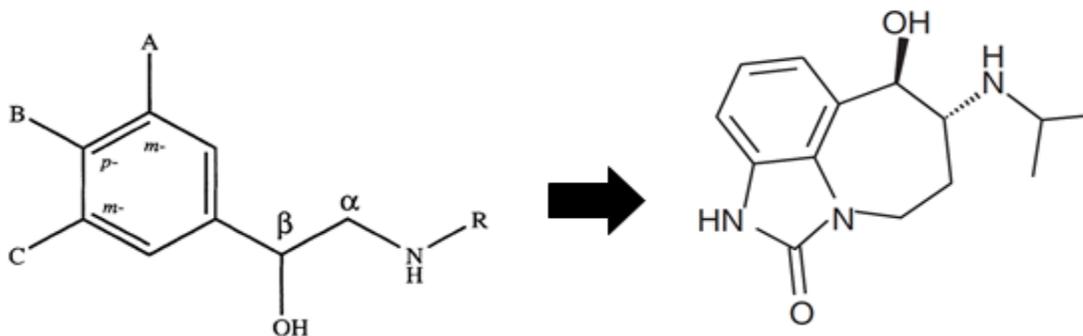


Figura 2. Estructura general de AA- β y de clorhidrato de zilpaterol

Así, todos los AA- β son similares por contener un anillo, sin embargo, difieren en relación a la afinidad que tienen con los RA- β_1 , RA- β_2 y RA- β_3 (Bersmann, 2002). Considerando que la proporción de cada tipo de RA- β varía entre tejidos e incluso entre especie, no todos los AA- β tienen la misma eficacia para funcionar como

promotores de crecimiento en todas las especies (Domínguez-Vara et al., 2010). Los RA- β_1 predominan en animales monogástricos (67 % en músculo esquelético y 73 % en tejido adiposo), mientras que los RA- β_2 son más abundantes en rumiantes (99 % en músculo esquelético y 90 % en tejido adiposo; Johnson et al., 2014). El CZ es un AA- β_2 por lo cual se usa más como promotor de crecimiento en ganado bovino y ovino (Delmore et al., 2010).

2.6.2 Mecanismo de acción reproductivo

El mecanismo de acción a través del cual los AA- β_2 pueden modificar aspectos reproductivos en ovejas se ha estudiado poco. No obstante, se conoce que hay bastantes RA- β en la corteza del ovario de las hembras, los cuales sirven para que las catecolaminas naturales (adrenalina y la noradrenalina) estimulen la actividad ovárica (Beermann, 2014; Meersman, 1998). Particular atención tiene el hecho que RA- β_2 abundan dentro de las células de la granulosa e intersticiales, según un estudio realizado en ratas pre-púberes (Jordan et al., 1981). La disponibilidad de estos RA- β_2 varían de acuerdo a la etapa del ciclo estral, así que hay mayor cantidad durante el proestro y luego disminuyen rápidamente previo al pico pre-ovulatorio de LH; los niveles se mantienen bajos durante el estro y metaestro para nuevamente comenzar a incrementar en el diestro (Aguado, 2002). Otros estudios señalan que el ovario tiene inervaciones adrenérgicas para modular el desarrollo folicular a través de la formación de receptores de gonadotropinas y enzimas esteroigénicas (Dissen et al., 2002).

En un estudio *in vitro*, Mayerhofer et al. (1997) demostraron que los ovarios de ratas neonatales expuestos a isoproterenol (AA- β) y VIP (péptido vasoactivo intestinal, localizado en los nervios sensitivos y autónomos) presentaban un aumento en la disponibilidad de ARNm para receptores de FSH y enzima P450aromatasa. Zsolnai et al. (1982), quienes administraron localmente fenoterol (AA- β) a ratas en celo, observaron un incremento en las concentraciones de P4 y E2, evidenciando que los RA- β tienen un papel regulador en la secreción de hormonas ováricas. Por su parte, Aguado et al. (2002) observaron que los ovarios neonatales de ratas con baja

inervación adrenérgica presentaban una disminución en el número de ovocitos, actividad FSH, esteroigénica y de hormona de crecimiento (Aguado et al., 2002).

Esto sugiere que la acción de los AA- β_2 está asociada directamente con el proceso de foliculogénesis más que con otros eventos reproductivos del ciclo ovárico, tales como ovulación o formación/actividad del cuerpo lúteo. Es posible que efectos benéficos secundarios se presenten en la ovulación y funcionalidad del cuerpo lúteo en respuesta al cambio en la actividad folicular (López-Carlos et al., 2018). Adicionalmente, se ha reportado que la suplementación dietaria de AA- β estimula un aumento agudo en los niveles de insulina, glucosa (Gojmerac et al., 2000) y hormonas esteroideas (Wheeler et al., 1988). Por lo tanto, la suplementación de CZ posiblemente ayude a modificar la actividad ovárica por tres mecanismos: 1) aumentando el número de receptores disponibles para FSH, 2) estimulando la actividad esteroigénica folicular, y 3) modulando el metabolismo energético folicular a través del sistema insulina-glucosa.

2.7 Ácido ferúlico y clorhidrato de zilpaterol en protocolos de sincronización

Dados los mecanismos de acción tanto del AF y CZ, ambos productos podrían ser usados como estimulantes de la actividad ovárica en hembras. Aprovechando estos efectos benéficos, en la actualidad se han conducido algunos trabajos para demostrar que CZ podría ayudar a mejorar la respuesta ovárica y, en consecuencia, la eficiencia reproductiva de ovejas sincronizadas con progestágenos; los resultados no ha sido del todo consistentes (Gutiérrez et al., 2011; López-Carlos et al., 2018). No obstante, el AF no ha sido evaluado como un co-tratamiento de protocolos de sincronización d de estro de ovejas o cualquier otra especie. Por lo tanto, resulta imperante realizar investigación al respecto.

Gutiérrez et al. (2011) encontraron que la suplementación dietaria diaria de 0.15 mg de CZ/kg de PV durante un protocolo de sincronización de estro con progestágenos de 13 días, aumentó la tasa tasa ovulatoria y el porcentaje de partos dobles sin afectar la fertilidad en ovejas Pelibuey. Este efecto positivo del CZ se asoció con un aumento en niveles de glucosa e insulina. Más recientemente, López-Carlos et al.

(2018) suplementaron ovejas Rambouillet con CZ (0.15 mg/kg de peso vivo/d) durante 4 días (fase de reclutamiento folicular; día 6 a 2 ante del retiro de la esponja) como un co-tratamiento a un protocolo de sincronización de estro (progestarona sintética y 400 UI de PMSG) que duró 14 días. Los resultados evidenciaron que el CZ mejoró la conducta al estro (número de montas/oveja, aparición del estro más temprano y más largo), pero la tasa de preñez a primer servicio y la prolificidad no cambiaron.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de estudio

El estudio se llevó a cabo durante el mes de diciembre de 2018, en el municipio de Mexicali, Baja California, región Noroeste de México (latitud 30° 25' N y longitud 114° 42' W). Las condiciones climáticas de esta zona son similares a las del Desierto Sonorense, con temperaturas máximas en verano de 40°C en promedio y mínimas en invierno de hasta 0°C (García, 1985). La zona tiene una precipitación anual de 80 mm, principalmente en los meses de noviembre-diciembre.

3.2 Animales, manejo e instalaciones

Se utilizaron 39 ovejas Dorper con un peso vivo promedio inicial de 58.4 ± 13.9 kg y una condición corporal de 3.5 ± 0.45 unidades (escala de 5 puntos, 1= muy flacas y 5= muy gordas; Russel, 1969). El manejo alimenticio y sanitario que recibieron las ovejas durante el periodo de estudio fue el mismo que se daba rutinariamente en la explotación donde el estudio se condujo. Así que el sistema de producción era intensivo, donde las ovejas se encontraban estabuladas en corrales provistos de comederos, bebederos, sombra y piso de tierra. Además, su alimentación fue *ad libitum* con una ración que contenía una mezcla de los forrajes picados pasto sudan (70%) y paja de avena (30%). Esta dieta se ofreció desde el pre-empadre hasta el parto; adicionalmente, la última semana antes del parto se suplementaron con 400 g de pan molido. No se ofreció agua, en su lugar se dio suero de leche *ad libitum*.

Las ovejas se colocaron en un corral 10 d antes de iniciar el periodo experimental. El objetivo fue que ellas fueran adaptándose a convivir entre ellas. Posteriormente, las ovejas se dividieron en tres grupos acorde al tratamiento, y se colocaron en corral por tratamiento hasta el parto. En el periodo de partos, las ovejas paridas junto con sus crías se separan a un corral anexo.

3.3 Diseño experimental, empadre y diagnóstico de gestación

Todas las ovejas fueron sometidas a un protocolo de sincronización de estro insertando intravaginalmente durante 10 d una esponja impregnada de 20 mg de acetato de flurogestona (Chronogest, Intervet, Ciudad de México). Antes de colocar la esponja en vagina, todas las ovejas fueron pesadas para formar bloques de tres hembras de similar peso vivo (factor de bloqueo), las cuales fueron asignadas aleatoriamente a los tratamientos (t= 3) dentro de cada bloque. Los tratamientos consistieron en aplicar un estimulante ovárico durante el protocolo de sincronización (n=13): 1) testigo, no recibió; 2) suplementación con 0.15 mg de CZ/kg de PV/d (CZ) ; y 3) suplementación con 10 mg de AF/kg de PV/d. En el caso de las ovejas del grupo de CZ y AF, la dosis diaria se suministró dentro de una cápsula de gelatina recubiertas de melaza y pasta de soya; en el caso del grupo testigo, también se ofreció una capsulas de gelatina a cada oveja pero rellenas con 10 mg de pasta de soya como efecto placebo. Cabe mencionar que cada una de las ovejas pasó diariamente por una manga para recibir dicha cápsula.

Finalizados los 10 d de protocolo de sincronización, las esponjas se retiraron y las ovejas fueron expuestas a seis sementales de la raza Dorper con fertilidad probada para ser empadradas de manera natural en un sistema de montas controladas. En general, cada oveja recibió dos montas por un mismo semental, una al momento de la detección del estro y una segunda 12 h después (dos montas por hembra). Para un mejor control del empadre, las ovejas de cada tratamiento se subdividieron en dos grupos y cada uno se colocó en un corral separado; así se tuvieron durante el periodo de empadre seis corrales con las ovejas alojadas. Entre las 12 y 72 h post-retiro de la esponja, un macho se introducía a cada corral durante 20 min cada 3 h, y la oveja que recibía monta se llevaba a otro corral para esperar la segunda monta. Finalizadas las 72 h de monta, las ovejas se volvieron agrupar por tratamiento dentro de un corral. Se realizó diagnóstico de gestación a los 41 días post-retiro de la esponja con un ultrasonido (Animal Profi, Draminsky, Polonia) provisto de un transductor rectal multifrecuencial 3.5/7.5 Mhz.

3.4 Peso vivo y condición corporal

Las ovejas se pesaron individualmente dos veces, al inicio y final del protocolo de sincronización con una báscula digital colgante (Crane Scale, Houston, Texas). La condición corporal también se registró por una sola persona al mismo tiempo que se registraba el PV. Se usó una escala de 1 (muy flaca) a 5 (muy gorda) acorde a la metodología planteada por Russel et al. (1969).

3.5 Análisis de metabolitos, hormonas metabólicas y progesterona

Se colectaron muestras de sangre por venopuncion de la vena yugular para la determinación de metabolitos y hormonas metabólicas durante los días -10, -5, 0, 5 y 10 en relación al retiro de la esponja; en el caso de determinación de concentraciones de P4, la sangre se colectó los días 0, 5, 10 y 15 post-retiro de la esponja. Todas las muestras se colectaron en tubos vacutainer de 10 mL (tapa roja; Becton Dickinson Vacutainer Systems, Franklin Lakes, NJ) cuando las hembras estaban en ayunas en la mañana. Posteriormente, todas las muestras se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 min a 10°C para extraer el suero, el cual se depositó en viales de 2 mL por duplicado y luego se almacenó a -20°C hasta su análisis.

Los metabolitos analizados fueron triglicéridos, colesterol, glucosa, urea y proteína total, mientras que las hormonas fueron triyodotironina (T3), tiroxina (T4), cortisol, insulina y progesterona. Los metabolitos se determinaron con un auto-analizador de química sanguínea de uso veterinario (Easy Kem Vet, KONTRoLab Systems; Morelia, Mich, México), mientras que las hormonas con kits comerciales validados usando un lector de ELISA (P4 y hormonas tiroideas con el equipo Thunderbolt, Gold Estándar Diagnostics, CA, USA; cortisol e insulina con el equipo STAT FAX 303 PLUS; FL, USA).

3.6 Evaluación de la actividad ovárica

La evaluación de actividad ovárica consistió en la medición de la población (número de folículos por oveja) y crecimiento folicular (tamaño de cada folículo) en cuatro

ovejas por tratamiento a las 0, 24 y 48 h después de retirada la esponja intravaginal (Ginther et al., 1994). Esta evaluación ovárica se realizó por ultrasonografía (ultrasonido Aloka Prosound 2, Hitachi Medical Systems, Tokyo, Japón) introduciendo un transductor lineal de 3.5/7.5 MHz en el recto, donde se hizo un mapeo de ambos ovarios para ubicar cada uno de los folículos presentes y dar seguimiento a su crecimiento y/desaparición. Si alguna oveja de las monitoreadas por ultrasonido presentaba estro y recibía monta, no se volvía a monitorear, considerándose que el folículo o folículos alcanzaron máximo tamaño pre-ovulatorio. Adicionalmente, la actividad lútea también se evaluó a los 9 d posteriores a la presencia del estro a través de ultrasonografía. La actividad folicular se definió considerando las siguientes variables (Balaro et al., 2016): número y tamaño promedio de folículos por oveja que emergieron (<3 mm), en crecimiento (3 a <5 mm) y pre-ovulatorios (≥ 5 mm). En cuanto a la actividad lútea, las variables medidas fueron: número de cuerpo lúteos por oveja y tamaño promedio del cuerpo lúteo.

3.7 Actividad estral y comportamiento reproductivo

Se evaluó actividad estral durante el proceso de monta natural, siendo las variables medidas porcentaje de ovejas en estro ($[\text{ovejas en estro/tratadas}] \times 100$) y tiempo a estro (tiempo transcurrido desde el retiro de la esponja hasta el momento que recibió la primera monta). Una oveja presentaba signo de estro cuando se dejaba montar por el macho sin presentar resistencia alguna.

Al diagnóstico de gestación, se registraron las ovejas gestantes para calcular el porcentaje de preñez ($[\text{ovejas gestantes/tratadas}] \times 100$). Al parto, se registró identificación de la madre, fecha de parto y número de crías nacidas con el objeto de calcular las siguientes variables de comportamiento reproductivo: fertilidad ($[\text{ovejas paridas/tratadas}] \times 100$), prolificidad (número de corderos nacidos por oveja parida), fecundidad ($[\text{número total de corderos nacidos/oveja tratada}] \times 100$), porcentaje de partos simples ($[\text{ovejas paridas con una cría/total de ovejas paridas}] \times 100$) y porcentaje de partos múltiples ($[\text{ovejas paridas con dos o más crías/total de ovejas paridas}] \times 100$).

3.9 Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico de SAS (2004). Todas las variables cuantitativas se sometieron a análisis de normalidad con el procedimiento PROC UNIVARIATE, y las variables que no seguían normalidad se transformaron hasta alcanzar normalidad o bien se usaron pruebas de estadística no paramétricas. En el caso de variables como el número de cuerpo lúteo, diámetro folicular emergente y preovulatorio se analizaron con la prueba no paramétrica Kruskal wallis aplicando el procedimiento NPAR1WAY, mientras que área de cuerpo lúteo y número de folículos pre-ovulatorios fueron normalizados por transformación a logaritmo natural y raíz cuadrada, respectivamente. Las variables asociadas con estado corporal, intervalo a estro, prolificidad, área del cuerpo lúteo y número de folículos pre-ovulatorios se sometieron a un análisis de varianza bajo diseño de bloques completamente al azar con el procedimiento PROC GLM. Las variables de concentraciones séricas de metabolitos y hormonas se analizaron con el procedimiento PROC MIXED bajo un DBCA con mediciones repetidas en el tiempo, donde el modelo incluyó los efectos fijos de bloque, tratamiento, tiempo y la interacción tratamiento x tiempo. Se probaron diferentes estructuras de covarianza en cada modelo hasta definir el mejor ajuste de acuerdo a la presencia de los valores de AIC's y BIC's. Los modelos de concentraciones de metabolitos y cortisol se ajustaron con la estructura no estructurada (UN), concentraciones de P4 e insulina con la estructura autorregresiva (AR(1)), y concentraciones de hormonas tiroideas con la simetría compuesta (CS). Las medias se compararon con la opción LSMEAN declarando diferencias significativas a una $P \leq 0.05$. El resto de variables, las cuales fueron de tipo categóricas, se analizaron con una prueba de chi-cuadrada usando el procedimiento PROC FREQ a un nivel de $\alpha=0.05$.

IV. RESULTADOS

4.1. Estado corporal

Los resultados de estado corporal se presentan en el Cuadro 1. Tanto PV y condición corporal fueron similares ($P \geq 0.65$) entre tratamiento al inicio y fin del protocolo de sincronización. Cabe mencionar que todas las ovejas mostraron una disminución en su PV durante el protocolo de sincronización (alrededor de 3 kg), sin ninguna afectación ($P = 0.67$) asociada con los tratamientos.

Cuadro 1. Efecto del ácido ferúlico y el clorhidrato de zilpaterol en el estado corporal de ovejas Dorper sincronizadas para estro con progestágenos.

	Tratamientos			Valor de P
	Testigo	Ácido ferúlico	Clorhidrato de zilpaterol	
Peso vivo inicial (kg)	59.18 ± 4.56	57.50 ± 4.16	58.38 ± 3.57	0.96
Peso vivo final (kg)	55.64 ± 4.40	54.82 ± 3.82	55.28 ± 3.29	0.98
Condición corporal inicial	3.46 ± 0.12	3.5 ± 0.12	3.54 ± 0.14	0.91
Condición corporal final	3.42 ± 0.09	3.33 ± 0.14	3.5 ± 0.14	0.65
Cambio de peso vivo (kg)	-3.53 ± 0.74	-2.67 ± 0.67	-3.10 ± 0.61	0.67

4.2 Metabolismo y progesterona

Los resultados de metabolismo y concentraciones de progesterona se presentan en el Cuadro 2 y Figuras 3 y 4. Las concentraciones séricas de glucosa y proteína total no fueron afectadas ($P \geq 0.28$) por la interacción tratamiento x día o tratamiento solamente. Sin embargo, la interacción modificó ($P \leq 0.03$) las concentraciones séricas de colesterol, triglicéridos y urea (Figura 3). Comparado con el grupo testigo, el FA aumentó ($P \leq 0.05$) las concentraciones séricas de triglicéridos y colesterol entre los días -5 y 5 del retiro de la esponja. Al día 10 post-retiro de la esponja, las

concentraciones de triglicéridos fueron más bajas ($P < 0.05$) y las concentraciones de colesterol similares ($P > 0.05$) con respecto a lo observado en el grupo testigo. Las concentraciones séricas de urea fueron afectadas ($P < 0.05$) por AF solamente el día de retiro de la esponja (d 0), siendo más alta en ovejas de AF que en las otras ovejas. Por su parte, el CZ incrementó ($P < 0.01$) los niveles séricos de triglicéridos sin afectar ($P > 0.05$) los niveles séricos de colesterol en los días -5 y 0 del retiro de la esponja comparado con ovejas testigos. Con respecto al grupo testigo, las concentraciones séricas de colesterol y triglicéridos no fueron afectadas ($P > 0.05$) al día 5 post-retiro de la esponja, pero luego fueron más bajas ($P < 0.05$) al día 10 post-retiro de la esponja debido a la suplementación de CZ. Las concentraciones de urea cambiaron ($P < 0.05$) solamente el día -5 del retiro de la esponja por efecto del CZ, siendo más bajas en el grupo CZ que en los otros grupos.

Cuadro 2. Efecto del ácido ferúlico y el clorhidrato de zilaterol en las concentraciones séricas de metabolitos, hormonas metabólicas y progesterona de ovejas Dorper sincronizadas para estro con progestágenos.

	Tratamiento (T)			Efectos		
	Testigo	Ácido Ferúlico	Clorhidrato de zilpaterol	T	Día	TxDía
Metabolitos (mg/dL)						
Glucosa	71.18 ± 1.89	71.09 ± 1.89	73.98 ± 1.89	0.46	<0.01	0.28
Colesterol	72.67 ± 2.60	79.02 ± 2.60	71.14 ± 2.60	0.09	<0.01	<0.01
Triglicéridos	45.87 ± 0.85	50.29 ± 0.85	49.84 ± 0.85	<0.01	<0.01	<0.01
Proteína total	7.17 ± 0.13	7.36 ± 0.13	7.28 ± 0.13	0.61	0.89	0.77
Urea	19.07 ± 0.52	19.19 ± 0.52	17.84 ± 0.52	0.14	<0.01	0.03
Hormonas (ng/mL)						
Triyodotironina	1.90 ± 0.87	1.98 ± 0.87	1.87 ± 0.87	0.65	<0.01	0.56
Tiroxina	5.32 ± 0.01 ^a	6.43 ± 0.01 ^b	5.77 ± 0.01 ^c	0.03	<0.01	0.06
Cortisol	0.69 ± 0.15 ^a	1.53 ± 0.15 ^b	1.07 ± 0.20 ^c	0.04	<0.01	0.32
Insulina	0.33 ± 0.03 ^a	0.34 ± 0.03 ^a	0.27 ± 0.03 ^b	0.02	0.83	0.57
Progesterona	4.15 ± 0.37	3.38 ± 0.37	3.72 ± 0.37	0.35	<0.01	0.18

^{a,b,c} Superíndices distintos en una misma de hilera indican diferencias entre tratamientos a $P \leq 0.05$.

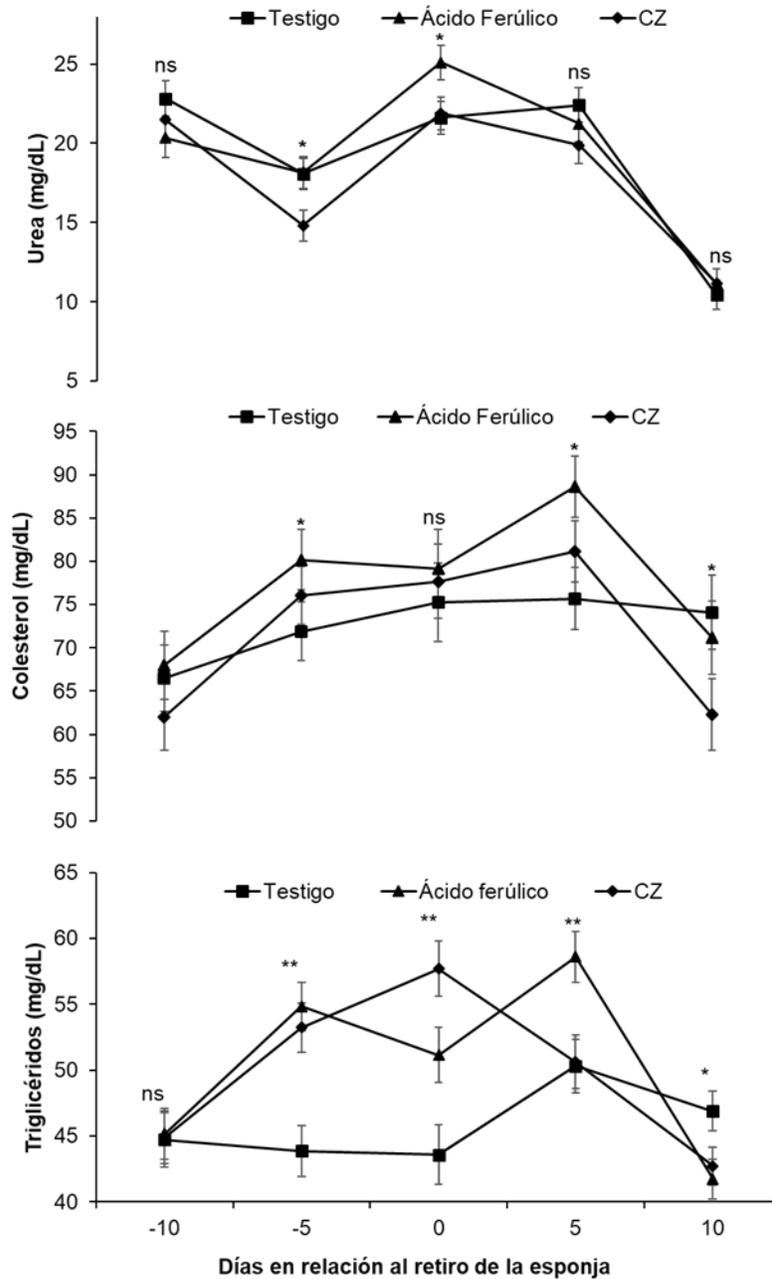


Figura 3. Efecto de la interacción tratamiento x día en las concentraciones séricas de triglicéridos, colesterol y urea en ovejas Dorper sincronizadas para estro con progestágenos (*P < 0.05 y ** P < 0.01).

Con respecto al efecto de los tratamiento en las concentraciones de hormonas, la interacción tratamiento x día no afectó las concentraciones de las hormonas en

general, aunque una tendencia ($P = 0.06$) se observó solamente para concentraciones de T4 (Figura 4). Comparado con el grupo testigo, el AF y el CZ aumentaron ($P \leq 0.05$) las concentraciones séricas de T4 al día 5 antes del retiro de la esponja, y este efecto positivo persistió ($P \leq 0.05$) al día 0 (retiro de la esponja) solamente con AF mientras que el CZ disminuyó las concentraciones de dicha hormona al mismo ($P > 0.05$) nivel que testigo. Al día 5 post-retiro de la esponja, las concentraciones séricas de T4 no fueron afectadas ($P > 0.05$) por los tratamientos. En general, las concentraciones séricas de T3 y P4 no cambiaron ($P \geq 0.35$) debido a los tratamientos, mientras que cortisol e insulina sí ($P \leq 0.04$; Cuadro 2). Las concentraciones de cortisol fueron más altas ($P < 0.05$) con AF y CZ comparado con testigo. En insulina, las ovejas testigo tuvieron similares ($P > 0.05$) concentraciones que las ovejas de AF, pero ambos grupos de ovejas mostraron mayores ($P \leq 0.05$) concentraciones de la hormona que las ovejas tratadas con CZ.

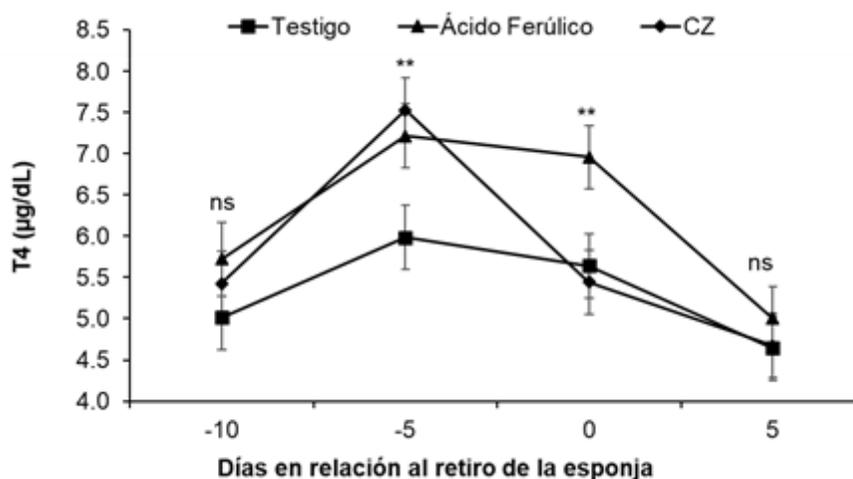


Figura 4. Efecto de la interacción tratamiento x día en las concentraciones séricas de tiroxina (T4) en ovejas Dorper sincronizadas para estro con progestágenos (** $P < 0.01$ y ^{n.s.} $P > 0.05$).

4.3. Actividad ovárica

La evaluación ecográfica de las estructuras ováricas se muestra en el Cuadro 3. El número de folículos emergentes/oveja disminuyó ($P \leq 0.01$) con la suplementación

de AF y CZ, mientras que el número de folículos en crecimiento /oveja solamente disminuyó ($P < 0.05$) debido a la suplementación de CZ. Las ovejas de AF tuvieron mayor ($P = 0.05$) número de folículos pre-ovulatorios que las ovejas testigo, las cuales registraron similar ($P > 0.05$) número de estos folículos que las ovejas de CZ. En cuanto al tamaño folicular, se observó que solamente el diámetro de folículos emergentes fue afectado por los tratamientos ($P = 0.04$), siendo mayor con AF comparado con los otros tratamientos, entre los cuales no hubo diferencias ($P \geq 0.05$). El número de cuerpos lúteos/oveja y su área no variaron ($P \geq 0.24$) entre tratamientos.

Cuadro 3. Efecto del ácido ferúlico y el clorhidrato de zilaterol en la actividad ovárica de ovejas Dorper sincronizadas para estro con progestágenos.

	Tratamientos			Valor de P
	Testigo	Ácido ferúlico	Clorhidrato de zilpaterol	
Número de folículos/oveja				
Emergentes (n)	12.33 ± 0.71 ^a	10.25 ± 0.71 ^b	8.33 ± 0.71 ^c	0.01
Crecimiento (n)	7.67 ± 0.45 ^a	8.04 ± 0.45 ^a	6.01 ± 0.45 ^b	0.05
Pre-ovulatorios (n)	1.67 ± 0.21 ^a	2.20 ± 0.21 ^b	1.50 ± 0.21 ^a	0.05
Diámetro folicular				
Emergentes (mm)	2.05 ± 0.03 ^a	2.19 ± 0.03 ^b	2.17 ± 0.03 ^{ab}	0.04
Crecimiento (mm)	3.39 ± 0.10	3.21 ± 0.10	3.35 ± 0.10	0.53
Pre-ovulatorio (mm)	5.11 ± 0.35	5.57 ± 0.35	5.17 ± 0.35	0.35
Cuerpo lúteo				
Número/oveja (n)	1.80 ± 0.20	2.00 ± 0.32	1.50 ± 0.49	0.24
Área (cm ²)	1.28 ± 0.45	1.58 ± 0.78	1.41 ± 0.75	0.85

^{a,b} Superíndices distintos en una misma de hilera indican diferencias entre tratamientos a $P \leq 0.05$.

4.4 Comportamiento reproductivo

Los resultados de conducta de estro y comportamiento reproductivo se presentan en el Cuadro 4 y Figura 5. El porcentaje de ovejas en estro fue similar ($P = 0.13$) entre tratamientos, pero ovejas tratadas con AF presentaron actividad estral más temprano ($P = 0.04$) que ovejas tratadas con CZ o testigo. El intervalo a estro no varió ($P > 0.05$) entre ovejas testigo y suplementadas con CZ. La tasa de preñez fue de 100% en ovejas testigo y alimentadas con AF ($P > 0.05$), mientras disminuyó significativamente ($P = 0.04$) en ovejas suplementadas con CZ. El resto de las variables reproductivas no variaron ($P \geq 0.37$) entre tratamientos (fertilidad, prolificidad, fecundidad, y porcentajes de partos simple o múltiples).

Cuadro 4. Efecto del ácido ferúlico y el clorhidrato de zilaterol en la conducta estral y comportamiento reproductivo de ovejas Dorper sincronizadas para estro con progestágenos.

	Tratamientos			Valores de P
	Testigo	Ácido ferúlico	Clorhidrato de zilpaterol	
Respuesta al estro (%)	100 (13/13)	100 (12/12)	84.62 (11/13)	0.13
Tasa de preñez (%)	100 (13/13) ^a	100 (12/12) ^a	76.92 (10/13) ^b	0.04
Tasa de parto (%)	92.31 (12/13)	83.33 (10/12)	100 (10/10)	0.37
Fertilidad (%)	92.31 (12/13)	83.33 (10/12)	90.91 (10/11)	0.75
Partos simples (%)	41.67 (5/12)	40 (4/10)	40 (4/10)	0.99
Partos múltiples (%)	58.33 (7/12)	60 (6/10)	60 (6/10)	0.99
Fecundidad (%)	161 (21/13)	150 (18/12)	164 (18/11)	0.94
Tiempo al estro (h)	44.18 ± 3.15 ^a	35.88 ± 3.53 ^b	42.86 ± 3.15 ^a	0.04
Prolificidad	1.75 ± 0.23	1.8 ± 0.23	1.80 ± 0.23	0.95

^{a,b} Superíndices distintos en una misma de hilera indican diferencias entre tratamientos a $P \leq 0.05$.

La suplementación de AF mostró ser una estrategia más efectiva para agrupar la presencia del estro que cualquiera de los otros dos tratamientos (Figura 5). El 73 %

de las ovejas tratadas con AF presentaron estro dentro de las primeras 36 h post-retiro de la esponja intravaginal, mientras que para el grupo testigo y de clorhidrato de zilpaterol, solo presentó estro el 50 y 18 %, respectivamente ($P < 0.05$). Por otra parte, las ovejas tratadas con CZ exhibieron estro mayormente ($P < 0.05$) después de las 36 h post-retiro de la esponja comparado con grupo testigo y AF.

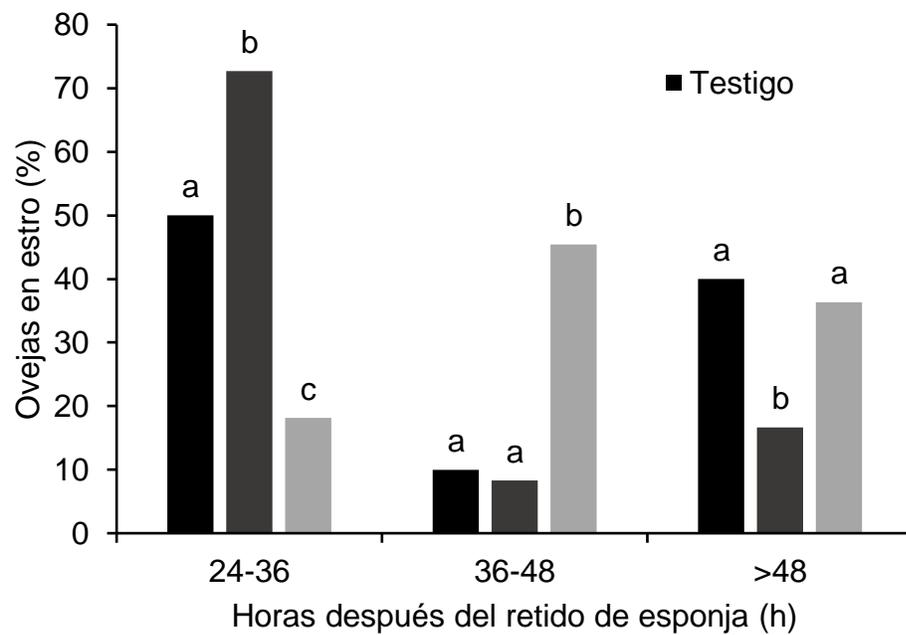


Figura 5. Distribución de estros post-retiro de la esponja en ovejas Dorper sincronizadas para estro con progestágenos y clorhidrato de zilpaterol o ácido ferúlico (^{a,b,c} indican diferencias dentro de cada intervalo a $P < 0.05$).

V. DISCUSIÓN

5.1 Estado corporal

La alimentación de las ovejas con AF o CZ durante el protocolo de sincronización no modificó el estado corporal, ya que tanto PV y condición corporal no cambiaron debido a los tratamientos. Probablemente se deba a que el tiempo de suplementación fue muy corto (10 días), considerando que hay estudios previos en corderas que demostraron un aumento en la tasa de crecimiento debido a la suplementación de CZ durante 30 d (Macías-Cruz et al., 2010; Avendaño-Reyes et al., 2011). Otro estudio donde suplementaron ovejas multíparas con CZ durante 4 d dentro del protocolo de sincronización de estro, tampoco encontraron cambios en el estado corporal de las hembras al retiro de la esponja (López-Carlos et al., 2018). No obstante, estudios conducidos en corderas reportaron que la suplementación de AF no alteró el estado corporal después de ofrecerlo 30 d (Macías-Cruz et al., 2014; 2018). Aunque, una investigación realizada por Valadez (2018) en corderas expuestas a un ambiente de estrés calórico, señala que la suplementación de AF mejoró la tasa de crecimiento cuando la temperatura ambiente superó los 35° C; esto fue relacionado con un aumento en el estrés oxidativo y una efectiva función del compuesto fenólico como un antioxidante. Por lo tanto, el AF podría actuar como promotor de crecimiento si las ovejas se encuentran un cuadro metabólico de estrés oxidativo severo, mientras que el CZ podría requerir un periodo más largo de suplementación para hacer evidente su efecto como promotor de crecimiento.

5.2 Metabolismo y progesterona

El metabolismo energético y de urea se modificó con la suplementación de AF y CZ en las ovejas, sugiriendo que ambos actuaron como moduladores del mismo durante el protocolo de sincronización de estro con progestágenos. Estos hallazgos difieren de los publicados en estudios previos en corderas donde el AF no afectó concentraciones séricas de los mismo metabolitos medido por nosotros (Macías-Cruz et al., 2014), mientras que otro estudio solamente indicó una disminución en los niveles de glucosa circulante (Macías-Cruz et al., 2018). En corderos estresado por

frio, Wang et al. (2019) reportaron cambios en el metabolismo de proteína pero dependientes del nivel de suplementación de AF, principalmente aumentó las concentraciones séricas de proteína total y albumina a dosis bajas del producto (80 mg/kg de alimento). No obstante, el metabolismo de energía no fue alterado en dichos corderos de engorda con ninguna de las dosis (80, 400 y 2000 mg/kg de alimento). Cabe mencionar que las concentraciones de hormonas metabólicas no se han medido en ningún estudio en ovinos. Si bien, la literatura existente en ovinos no deja claro el efecto del AF en la modulación del metabolismo de energía y proteína, algunos estudios en ratas obesas señalan que éste compuesto fenólico es efectivo en mejorar la homeostasis de glucosa y lípidos a través de modular la expresión de genes lipogénicos y glucogénicos (Naowaboot et al., 2016; Salazar-López et al., 2020). Así, el AF ha demostrado mantener euglucemia y reducir dislipidemia por disminuir los niveles de insulina al mismo tiempo que reduce la resistencia de insulina y leptina (Naowaboot et al., 2016).

Cabe mencionar que las ovejas de este estudio no presentaban obesidad, sin embargo, estaban en el límite considerando que una condición óptima para ovejas reproductivas se ubica entre 2.5 y 3.5 unidades. Esto podría explicar parcialmente porque la modulación metabólica de AF observada en las ovejas de pelo difirió en relación a lo reportado para ratas obesas (Naowaboot et al., 2016). De hecho, los resultados de metabolitos y hormonas tiroideas sugieren la activación de tres mecanismo para suplir una mayor cantidad de glucosa a células: 1) gluconeogénesis, 2) resistencia insulínica en tejido graso, y 3) mayor sensibilidad de insulina a glucosa. Así, el AF aumentó las concentraciones séricas de cortisol para promover una mayor glucolisis en hígado, así como resistencia insulínica en tejido graso para incrementar la producción de ácidos grasos libres circulante en sangre, lo cuales a su vez promovieron una mayor producción de triglicéridos en hígado, principal sustrato utilizado en la síntesis de glucosa a través de la ruta metabólica de gluconeogénesis (Qaid y Abdelrahman, 2016). El aumento en los niveles séricos de T4 debido a AF fue probablemente un mecanismo para aumentar la disponibilidad de ácidos grasos libres, ya que tiene una acción lipolítica (Todini et al., 2007). Finalmente, dado que niveles de glucosa e insulina sérica fueron similares entre ovejas testigo y

alimentadas con AF aun cuando la producción de glucosa hepática probablemente aumentó por efecto de cortisol, se puede inferir que el AF mejoró la sensibilidad de insulina a glucosa (Naowaboot et al., 2016). Por lo tanto, este hallazgo confirma que el AF puede mejorar la actividad ovárica en ovejas por modificar el sistema insulina-glucosa, tal como previamente había sugerido Macías-Cruz et al. (2018). Adicionalmente, el aumento en las concentraciones de colesterol antes y después de finalizar el protocolo de sincronización con la suplementación de AF podría estar asociado con la acción esteroideogénica atribuida a este compuesto fenólico (Hashem et al., 2020).

Por otro lado, el efecto CZ sobre el metabolismo de ovejas multíparas no se ha evaluado, mientras que su efecto en el metabolismo de ovinos de engorda no ha sido plenamente definido. En este estudio, las ovejas alimentadas con CZ no cambiaron las concentraciones de glucosa, proteína total y colesterol durante el periodo que se ofreció, mientras que las concentraciones de triglicéridos y T4 aumentaron en dicho periodo, comparado con las ovejas testigo. También, las concentraciones de insulina fueron menores en ovejas tratadas con CZ que en las testigos. En congruencia parcial con estos resultados, Beermann (1987) y Kim et al. (1989) señalan que la suplementación de AA- β aumenta las concentraciones de metabolitos asociados con el metabolismo lípido (triglicéridos y colesterol) y glucosa en ovinos. Sin embargo, López-Calos et al. (2010) encontraron que ni CZ ni ractopamina afectaron las concentraciones séricas de glucosa, triglicéridos, creatinina y proteína total. En total coincidencia con nuestros resultados, otros estudios conducido en ovejas de desecho Moghani reportaron que los agonistas terbutalina y metaproterenol no alteraron las concentraciones séricas de glucosa (Nourozi et al., 2008), pero redujeron las concentraciones de insulina y aumentaron los niveles de T4 (Mohammadi et al., 2006). Similarmente, Beermann (1987) en corderos de engorda observó un aumento en los niveles séricos de la hormona de crecimiento y T4 al mismo tiempo que disminuyeron la concentraciones de insulina e IGF-I. En el caso de chivos castrados, el CZ causó efecto contrarios a los observados en este estudio para insulina y cortisol, pero los niveles de T4 si fueron incrementados por el AA- β_2 (Hatefi et al., 2016).

Los cambios metabólicos asociados con suplementación de CZ en las ovejas de este estudio reflejan una movilización de tejido adiposo hacia la formación de masa muscular, confirmando que los AA- β 2 funcionan como redistribuidor de sustratos energéticos, mayormente movilizándolo tejido graso hacia la formación de masa muscular por acción lipolítica y síntesis de proteína (Johnson et al., 2014). Así, el aumento en los niveles séricos de cortisol y T4 combinado con la disminución de insulina ponen todo el escenario metabólico para evitar lipogénesis y aumentar lipólisis (Mohammadi et al., 2006). Adicionalmente, la disminución en los niveles sérico de urea al día 5 antes del retiro de la esponja sugiere una reducción en la proteólisis (Nourozi et al., 2008; Van Bibber-Krueger et al., 2015).

La concentración sérica de P4 no se modificó por los estimulantes ováricos ofrecidos a las ovejas oralmente. Cabe aclarar que no hay antecedentes previos del efecto de AF o CZ en las concentraciones sanguíneas de P4, representado nuestro trabajo el primer estudio al respecto. Considerando que los niveles de colesterol aumentaron por suplementación de AF, no así con CZ, al día 5 d después de finalizado el protocolo de sincronización de estro, se espera un aumento en los niveles de esta hormona esteroidea. Probablemente, la P4 no aumentó ni con AF ni con CZ porque no tuvo un impacto en el desarrollo de los cuerpos lúteos de las ovejas, según indican los resultados del Cuadro 3.

5.3. Actividad ovárica

El AF tuvo mejor efectividad para modificar la actividad ovárica que el CZ, ya que aumentó el número de folículos pre-ovulatorios y el tamaño de los folículos que emergen. Sin embargo, esto no se asoció con un mayor desarrollo y funcionamiento de los cuerpos lúteos, ya que este compuesto fenólico no afectó el número y el área promedio de los cuerpos lúteos/oveja. Los hallazgos en desarrollo folicular coinciden con lo reportado previamente por Macías-Cruz et al. (2018) en corderas de pelo pre-púberes y Moshfegh et al. (2016) en ratones hembras, es decir, el AF libre o los extractos de plantas ricos en AF aumentan el número de folículos grande (pre-ovulatorios) y disminuyen el número de folículos pequeños (emergen). Aunque en esos estudios también encontraron que el número de cuerpos lúteos/oveja aumentó

con la suplementación de AF, mientras que en esta investigación solamente mejoras numéricas se observaron tanto para número y tamaño promedio de cuerpo lúteo/oveja. Esto puede deberse a que el tamaño de muestra usado para hacer el seguimiento ovárico fue bajo, lo cual pudo afectar la precisión de la prueba.

Los resultados del efecto del AF en el desarrollo folicular de ovejas sincronizadas con progestágenos podrían ser explicados por la activación de diferentes mecanismos que favorecieron en conjunto el aumento en el número de folículos pre-ovulatorios y el tamaño folicular, al menos en los emergentes. El principal está asociado con el efecto antioxidante del AF, el cual reduce la cantidad de ROS foliculares y mejora el metabolismo del mismo por evitar el daño de las células del folículo (Slighoua et al., 2021). Otro mecanismo demostrado con los resultados de metabolismo del presente estudio y sugerido en un estudio previo (Macías-Cruz et al., 2018), es el hecho que este compuesto fenólico aumenta la entrada de glucosa en las células foliculares para promover el crecimiento folicular y la dominancia de un mayor número de folículos; esto basado en ajustes en el sistema glucosa-insulina. Adicionalmente, otros estudios señalan que los niveles de cortisol y T4 aumentan durante la fase folicular principalmente, ya que ambos favorecen un mejor desarrollo de los folículos como intervienen en la secreción de hormonas gonadotropicas y activación de receptores de las mismas (Fanson et al., 2014; Snoj et al., 2014; Todini, 2017); en este estudio tanto cortisol y T4 aumentaron ligeramente en forma significativa con AF, así que es posible que también hayan intervenido para aumentar el número de folículos pre-ovulatorios.

Por su parte, el CZ no mostró ningún efecto benéfico en el desarrollo folicular y luteal de las ovejas de pelo sincronizadas con progestágenos, contrariamente provocó una disminución en el número de folículos que emergieron y crecieron. Estos resultados difieren parcialmente de lo reportado en estudios previos. López-Carlos et al. (2018) alimentó con CZ a ovejas Rambouillet sincronizadas con progestágenos y eCG, y los resultados mostraron que este AA- β 2 no afectó el número y tamaño de folículos dominantes, pero sí aumentó el tamaño de los cuerpos lúteos. Hernández (2005) observó un aumento en el diámetro folicular de vaquillas alimentadas con CZ. Varios

estudios sugieren que los AA- β podrían mejorar la actividad ovárica por tres mecanismos: 1) aumento de los receptores de FSH en las células foliculares mejorando el reclutamiento (Adashi y Hsueh, 1981; 2) aumento en la síntesis hipofisaria de LH por un estímulo directo en las neuronas de GnRH para mejorar desarrollo de cuerpos lúteos (Miszkiel y Kotwica, 2001); y 3) aumento en los niveles sanguíneos de insulina y glucosa beneficiando el crecimiento folicular y la liberación de GnRH (Gojmerac et al., 2000). Sin embargo, al parecer, ninguno de estos mecanismos fue activado en las ovejas del presente estudio debido a CZ, y esto puede ser evidente considerando que el CZ disminuyó la población de los folículos reclutados y en crecimiento, además, el tamaño de los folículos y cuerpos lúteos no cambió. Los resultados de metabolismo mostraron que el CZ disminuyó los niveles circulantes de insulina en las ovejas del estudio, y por lo tanto, este podría ser causa por la cual CZ no resultó benéfico en mejorar la actividad ovárica, particularmente la reducción en la población de folículos reclutados que afectó directamente la cantidad de folículos que crecieron. En congruencia con este hallazgo, Guzmán et al. (2012) reportaron que la suplementación de CZ redujo las concentraciones sanguíneas de insulina, IGF-I y leptina, lo cual causó una baja respuesta reproductiva en vacas de post-parto tratadas con un protocolo de inducción de estro.

5.4 Comportamiento reproductivo

La conducta de estro de las ovejas fue mejorada con la suplementación de AF, pero inafectada con el aditivo CZ. Así, las ovejas alimentadas con AF presentaron signos de estro 7 y 8 h más temprano que ovejas tratadas con CZ o testigo, respectivamente. Además, el AF promovió que la aparición del estro fuera más sincrónico entre 24 y 36 h post-retiro de la esponja. Esto se atribuyó a una mayor capacidad estrógenica de los folículos de ovejas alimentadas con AF. El hecho que los folículos pre-ovulatorios fueran de mayor tamaño, sugiere que también tuvieron una mayor síntesis de E2. Sin embargo, también en la literatura hay evidencia de que el AF estimula la actividad esteroidal de los folículos porque favorece la conversión del colesterol a E2 como aumenta la enzima citocromo p450 (Moshfegh et al., 2016; Slighoua et al., 2001). Por otra parte, el CZ no mejoró actividad estral porque no

incrementó el crecimiento folicular como consecuencia de una disminución en las concentraciones de insulina, así como también de otras hormonas metabólicas como IGF-I y leptina (Guzmán et al., 2012; 2016). Congruente con los resultados de CZ en conducta estral, López-Carlos et al. (2018) señalaron que ovejas testigo y suplementadas con el AA- β presentaban similar respuesta a estro e intervalo a estro.

En general, los parámetros reproductivos no fueron afectados por el uso de AF o CZ como agentes estimuladores de la actividad ovárica en ovejas sincronizadas con progestágenos. Se esperaba que los parámetros asociados con la producción de corderos se mejoraran (prolificidad, porcentaje de partos múltiples y fecundidad) considerando que tanto AF y CZ actuarían estimulando la actividad ovárica de las ovejas. Sin embargo, el CZ no actuó como estimulador del ovario, mientras que el AF sí estimuló el desarrollo folicular pero no fue suficiente para marcar diferencias en la tasa ovulatoria (basado en el número de cuerpo lúteos). La tasa ovulatoria es el parámetro reproductivo que mayormente define el número de corderos nacidos por oveja (Gootwine, 2020). Cabe mencionar que, independientemente de los tratamientos, los parámetros reproductivos encontrados en este estudio son comparable a otros reportados para ovejas de pelo que fueron sincronizadas con progestágenos sintéticos y eCG (Macías-Cruz et al., 2009; Quintero-Elisea et al., 2011).

VI. CONCLUSIONES

Se concluye que la suplementación diaria de AF a ovejas de pelo durante un protocolo de sincronización de estro de 10 d, estimula la actividad folicular pero no el desarrollo de cuerpos lúteos, lo cual resulta benéfico para mejorar la conducta estral pero no la eficiencia reproductiva en general. Al parecer, el AF aumenta la actividad folicular porque actúa como antioxidante y ajusta el metabolismo de glucosa y lípidos para favorecer el consumo de glucosa en células foliculares. Por otra parte, el CZ no actúa como estimulador de la actividad ovárica en ovejas de pelo sincronizadas con progestágenos, por lo que tampoco mejora la conducta estral y el comportamiento reproductivo bajo este protocolo de sincronización. Esto se debe a que la suplementación del CZ actúa negativamente sobre insulina.

VI. LITERATURA CITADA

Abecia, J.A., Forcada, F., González-Bulnes, A. 2012. Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Animal Reproduction Science*, 130(3-4): 173-179.

Aguado, L.I. 2002. Role of the central and peripheral nervous system in the ovarian function. *Microscopy Research and Technique*, 59(6): 462-473

Aké-López, J.R., Aké-Villanueva, J.R., Centurión-Castro, F.G., Aké-Villanueva, N.Y. 2014b. Sincronización del estro y tasa de ovulación de ovejas Pelibuey tratadas con esponjas intravaginales e implantes subcutáneos nuevos y reciclados. *Revista Bioagrocencias*, 7(1):38-42.

Aké-López, J.R., Centurión-Castro, F.G., Magaña-Monforte, J.G., Aké-Villanueva, J.R. (2014a). Efecto del progestágeno y de la dosis de gonadotropina corionica equina en la sincronización del estro y tasa de gestación en ovejas pelibuey inseminadas por laparoscopia. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 1(3):261-268.

Arbues, R., Quintana, C.F., Yáñez, E., Fernández, J. 2018a. Ciclicidad en ovejas Santa Inês e Ideal en el subtrópico argentino. *Revista Veterinaria*, 29(1):3-8.

Arbués, R., Quintana, C.F., Yáñez, E., Kornuta, M., Fernández, J. 2018b. Evaluación de diferentes dosis de gonadotropina coriónica equina en el protocolo de sincronización de celo en ovejas. *Revista Veterinaria*, 29(2):104-108.

Arroyo, J. 2011. Estacionalidad reproductiva de la oveja en México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14(3):829-845.

Arroyo, L.J., Gallegos-Sánchez, J., Villa-Godoy, A., Berruecos, J. M., Perera, G., Valencia, J. 2007. Reproductive activity of Pelibuey and Suffolk ewes at 19 north latitude. *Animal Reproduction Science*, 102(1-2):24-30.

Avendaño-Reyes, L., Macías-Cruz, U., Álvarez-Valenzuela, F.D., Águila-Tepato, E., Torrentera-Olivera, N.G., Soto-Navarro, S.A. 2011. Effects of zilpaterol hydrochloride on growth performance, carcass characteristics, and wholesale cut yield of hair-breed

ewe lambs consuming feedlot diets under moderate environmental conditions, *Journal of Animal Science*, 89(12):4188-4194.

Avendaño-Reyes, L., Torres-Rodríguez, V., Meraz-Murillo, F.J., Pérez-Linares, C., Figueroa-Saavedra, F., Robinson, P.H. 2006. Effects of two β -adrenergic agonists on finishing performance, carcass characteristics, and meat quality of feedlot steers. *Journal of Animal Science*, 84(12):3259-3265.

Ávila-Castillo, B.R., García-Flores, E.O., Molina-Mendoza, P., Peralta-Ortiz, J.J.G., Sánchez-Torres-Esqueda, M.T. 2019. Estrous synchronization in hair sheep using a protocol based on prostaglandin + GnRH. *CienciaUAT*, 13(2):141-151.

Beermann, D.E. 2014. Meat, animal, poultry and fish production and management| Beta-Agonists.

Bodin, L., Drion, P.V., Remy, B., Brice, G., Cognié, Y., Beckers, J.F. 1997. Anti-PMSG antibody levels in sheep subjected annually to oestrus synchronisation. *Reproduction Nutrition Development*, 37(6):651-660.

Catalano, R., Teruel, M., Cabodevila, J., Callejas, S. 2007. Efecto de diferentes dosis de gonadotropina coriónica equina sobre la respuesta reproductiva de hembras ovinas con un tratamiento para inducción de celos. *InVet*, 9(1):11-17.

Cerna, C., Porras, A., Valencia, M.J., Perera, G., Zarco, L. 2000. Effect of an inverse subtropical (19 13' N) photoperiod on ovarian activity, melatonin and prolactin secretion in Pelibuey ewes. *Animal Reproduction Science*, 60:511-525.

Chen, C.Y., Costa, S. M., Carolo, K. 2019. Phenolic Acids. In *Whole Grains and their Bioactives: Composition and Health*. John Wiley and Sons Ltd. pp. 357-382.

Coomans, C.P., Ramkisoensing, A., Meijer, J.H. 2015. The suprachiasmatic nuclei as a seasonal clock. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 37:29-42.

Cunningham, J., Klein, B. 2009. La glándula mamaria. *Fisiología veterinaria*. 4th ed. Barcelona: Elsevier, pp.501-504.

De La Isla, H.G., Aké-López, J.R., Ayala-Burgos, A., González-Bulnes, A. 2010. Efecto de la condición corporal y la época del año sobre el ciclo estral, estro,

desarrollo folicular y tasa ovulatoria en ovejas Pelibuey mantenidas en condiciones de trópico. *Veterinaria México*, 41(3):167-175.

de Melo, T.S., Lima, P.R., Carvalho, K.M., Fontenele, T.M., Solon, F.R., Tomé, A.R., de Lemos, T.L., da Cruz Fonseca, S.G., Santos, F.A., Rao, V.S., de Queiroz, M.G. 2017. Ferulic acid lowers body weight and visceral fat accumulation via modulation of enzymatic, hormonal and inflammatory changes in a mouse model of high-fat diet-induced obesity. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 50(1):e5630.

De Paiva, L.B., Goldbeck, R., Santos, W.D.D., Squina, F.M. 2013. Ferulic acid and derivatives: molecules with potential application in the pharmaceutical field. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49(3):395-411.

Dupont, J., Scaramuzzi, R.J. 2016. Insulin signalling and glucose transport in the ovary and ovarian function during the ovarian cycle. *Biochemical Journal*, 473 (11): 1483-1501.

Fanson, K.V., Keeley, T., Fanson, B.G. 2014. Cyclic changes in cortisol across the estrous cycle in parous and nulliparous Asian elephants. *Endocrine connections*, 3(2):57-66.

García E. 1985. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koppen. (3ra ed.). México, DF: Universidad Nacional Autónoma de México.

Gastelum-Delgado, M.A., Avendaño-Reyes, L., Álvarez-Valenzuela, F.D., Correa-Calderón, A., Meza-Herrera, C.A., Mellado, M., Macías-Cruz, U. 2015. Conducta estral circanual en ovejas Pelibuey bajo condiciones áridas del noroeste de México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 6(1):109-118.

Ginther, O.J., Kot, K. 1994. Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. *Theriogenology*, 42(6):987-1001.

González, A., Murphy, B.D., Foote, W.C., Ortega, E. 1992. Circannual estrous variations and ovulation rate in Pelibuey ewes. *Small Ruminant Research*, 8(3):225-232.

- Gootwine, E. 2020. Invited review. Opportunities for genetic improvement toward higher prolificacy in sheep. *Small Ruminant Research*, 186:106090.
- Gordon I.R. 1996. *Controlled Reproduction in Sheep and Goats*. CAB International, Oxford.
- Gorewit, R.C. 1983. Pituitary and thyroid hormone responses of heifers after ferulic acid administration. *Journal of Dairy Science*, 66(3):624-629.
- Gojmerac, T., Mandić, B., Lojkić, M., Bilandžić, N. 2000. Acute and subacute metabolic and endocrine effects of clenbuterol in female pigs. *Veterinary Research Communications*, 24 (3):179-187.
- Greiner, M., Paredes, A., Rey-Ares, V., Saller, S., Mayerhofer, A., Lara, H.E. 2008. Catecholamine uptake, storage, and regulated release by ovarian granulosa cells. *Endocrinology*, 149(10):4988-4996.
- Guadarrama-Ortiz, P., Ramírez-Aguilar, R., Madrid-Sánchez, A., Castillo-Rangel, C., Carrasco-Alcántara, D., Aguilar-Roblero, R. 2014. Controladores del tiempo y el envejecimiento: núcleo Supraquiasmático y glándula pineal. *International Journal of Morphology*, 32(2):409-414.
- Gutiérrez, C.G., Ferraro, S., Martínez, V., Saharrea, A., Cortez, C., Lassala, A., Hernández Ceron, J. 2011. Increasing ovulation quota: more than a matter of energy. *Acta Scientiae Veterinariae*, 39(Suppl 1):305-316.
- Guzmán, A., Gonzalez-Padilla, E., Garcés-Yépez, P., Rosete-Fernandez, J.V., Calderón-Robles, R.C., Murcia, C., Gutiérrez, C.G. 2012. Reduced response to an estrous induction program in postpartum beef cows treated with zilpaterol and gaining body weight. *Animal Reproduction Science*, 130(1-2):1-8.
- Guzmán, A., Gonzalez-Padilla, E., Garcés-Yepez, P., Rosete-Fernández, J.V., Calderón-Robles, R.C., Whittier, W.D., Keisler, D.H., Gutierrez, C.G. 2016. Increased body condition score through increased lean muscle, but not fat deposition, is associated with reduced reproductive response to oestrus induction in beef cows. *Animal*, 10(10):1706-13.

Hafez, E.S.E., Hafez, B. 2007. Fecundación y segmentación. Reproducción e inseminación artificial en animales. McGraw-Hill, México.

Hashem, N.M., Gonzalez-Bulnes, A., Simal-Gandara, J. 2020. Polyphenols in Farm Animals: Source of Reproductive Gain or Waste? *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(10):1023.

Hatefi, A., Towhidi, A., Zali, A., Zeinoaldini, S., Ganjkhanlou, M., Plascencia, A. 2017. Effects of dietary zilpaterol hydrochloride (β 2-agonist) supplementation on finishing castrated male goats: metabolic endocrine, blood constituents, plasma volume, respiratory rate and cardiac changes. *Journal of Applied Animal Research*, 45(1):447-453.

Hatefi, A., Towhidi, A., Zali, A., Zeinoaldini, S., Ganjkhanlou, M., Masoudi, R., Plascencia, A. 2015. Influence of dietary zilpaterol hydrochloride on feedlot performance, carcass traits, chemical composition of *longissimus* muscle, and plasma metabolites of castrated male goats. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, 39:195-202.

Hatem, A. 2018. The Effects of different doses of equine chorionic gonadotropin on Induction of estrus and reproductive patterns in Assaf ewes out of breeding season. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, 7(06): 2078-2085.

Hernández, J.H. 2005. Efecto de la suplementación con zilpaterol, agonista beta-adrenérgico sobre el ciclo estral en vaquillas Holstein. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Husein, M.Q., Haddad, S.G. 2006. A new approach to enhance reproductive performance in sheep using royal jelly in comparison with equine chorionic gonadotropin. *Animal Reproduction Science*, 93(1-2):24-33.

Johnson, B.J., Smith, S.B., Chung, K.Y. 2014. Historical Overview of the Effect of β -Adrenergic Agonists on Beef Cattle Production. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 27(5), 757-766.

Kotwica, J., Bogacki, M., Rekawiecki, R. 2002. Neural regulation of the bovine corpus luteum. *Domestic Animal Endocrinology*, 23 (1-2):299-308.

- Kumar, N., Pruthi, V. 2014. Potential applications of ferulic acid from natural sources. *Biotechnology Reports*, 4:86-93.
- Lamrani, F., Benyounes, A., Sulon, J., Khaldi, G., Rekik, R., Bouraoui, B., Tahar, A. 2008. Effects of repeated use of PMSG on reproductive performances of the Ouled Djellal ewes. *Journal of Animal and Veterinary Advance*, 2:22-30.
- Lee, K.M., Hyun, S.H. 2017. The beneficial effects of ferulic acid supplementation during *in Vitro* maturation of porcine oocytes on their parthenogenetic developmental. *Journal of Embryo Transfer*, 32(4):257-265.
- López-Carlos, M.A., Aguilera-Soto, J.I., Méndez-Llorente, F., Ramírez, R.G., Rodríguez, H., Cortes, Z., Rincón-Delgado, R.M. 2018. Effect of short-term beta-adrenergic agonist administration along with progestin estrus synchronization on estrous behavior, reproductive performance and ovarian structures of Rambouillet ewes. *Small Ruminant Research*, 169:81-85.
- López-Carlos, M.A., Ramírez, R.G., Aguilera-Soto, J.I., Aréchiga, C.F., Méndez-Llorente, F., Rodríguez, H., Silva, J.M. 2010. Effect of ractopamine hydrochloride and zilpaterol hydrochloride on growth, diet digestibility, intake and carcass characteristics of feedlot lambs. *Livestock Science*, 131(1):23-30.
- Lozano-González, J.F., Uribe-Velásquez, L.F., Osorio, J.H. 2012. Control hormonal de la reproducción en hembras ovinas (*Ovis aries*). *Veterinária e Zootecnia*, 6:134-147.
- Luna-Palomera, C., Macías-Cruz, U., Sánchez-Dávila, F. 2019. Superovulatory response and embryo quality in Katahdin ewes treated with FSH or FSH plus eCG during non-breeding season. *Tropical Animal Health and Production*, 51(5):1283-1288.
- Macías-Cruz, U., Álvarez-Valenzuela, F.D., Torrentera-Olivera, N.G., Velázquez-Morales, J.V., Correa-Calderón, A., Robinson, P.H., Avendaño-Reyes, L. 2010. Effect of zilpaterol hydrochloride on feedlot performance and carcass characteristics of ewe lambs during heat-stress conditions. *Animal Production Science* 50:983-989.

Macías-Cruz, U., Perard, S., Vicente, R., Álvarez, F.D., Torrentera-Olivera, N.G., González-Ríos, H., Soto-Navarro, S.A., Rojo, R., Meza-Herrera, C.A., Avendaño-Reyes, L. 2014. Effects of free ferulic acid on productive performance, blood metabolites, and carcass characteristics of feedlot finishing ewe lambs, *Journal of Animal Science*, 92(12): 5762-5768.

Macías-Cruz, U., Ponce-Covarrubias, J. L., Álvarez-Valenzuela, F.D., Correa-Calderón, A., Meza-Herrera, C.A., Avendaño-Reyes, L. 2013. Reproductive efficiency of Pelibuey and Romanovx Pelibuey ewes synchronized with synthetic progesterone and low doses of PMSG under a hot environment. *Czech Journal of Animal Science*, 58, 546-553.

Macías-Cruz, U., Sánchez-Estrada, T.J., Gastelum-Delgado, M.A., Avendaño-Reyes, L., Correa-Calderón, A., Álvarez-Valenzuela, F.D., Mellado, M. 2015. Actividad reproductiva estacional de ovejas Pelibuey bajo condiciones áridas de México. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 47(3):381-386.

Macías-Cruz, U., Vicente-Pérez, R., López-Baca, M.A., González-Ríos, H., Correa-Calderón, A., Arechiga, C.F., Avendaño-Reyes, L. 2018. Effects of dietary ferulic acid on reproductive function and metabolism of pre-pubertal hairbreed ewes during the anestrous season. *Theriogenology*, 119:220-224.

Mersmann, H.J. 1998. Overview of the effects of β -adrenergic receptor agonists on animal growth including mechanisms of action. *Journal of Animal Science*, 76(1):160-172.

Mohammadi, M., Abazari, M., Nourozi, M. 2006. Effects of two beta-adrenergic agonists on adipose tissue, plasma hormones and metabolites of Moghani ewes. *Small Ruminant Research*, 63(1-2):84-90.

Moshfegh, F., Baharara, J., Namvar, F., Balanejad, Z., Amini, E., Jafarzadeh, L. 2016. Effects of date palm pollen on fertility and development of reproductive system in female Balb/C mice. *Journal of HerbMed Pharmacology*, 5(1):23-28.

Naowaboot, J., Piyabhan, P., Munkong, N., Parklak, W., Pannangpetch, P. 2016. Ferulic acid improves lipid and glucose homeostasis in high-fat diet-induced obese mice. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 43(2):242-250.

NRC. 2007. Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids, and new world camelids. Washington, D.C.

Nourozi, M., Abazari, M., Raisianzadeh, M., Mohammadi, M., ZareShahne, A. 2008. Effect of terbutaline and metaproterenol (two beta-adrenergic agonists) on performance and carcass composition of culled Moghani ewes. *Small Ruminant Research*, 74(1-3):72-77.

Porras, A.A., Zarco, Q. L. A., Valencia, M.J. 2003. Estacionalidad reproductiva en ovejas. *Ciencia Veterinaria*, 9(4):1-33.

Qaid, M.M., Abdelrahman, M.M. 2016. Role of insulin and other related hormones in energy metabolism—A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1):1267691.

Quintero-Elisea, J.A., Macías-Cruz, U., Álvarez-Valenzuela, F.D., Correa-Calderón, A., González-Reyna, A., Lucero-Magaña, F.A., Avendaño-Reyes, L. 2011. The effects of time and dose of pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) on reproductive efficiency in hair sheep ewes. *Tropical Animal Health and Production*, 43(8):1567-1573.

Rawlings, N.C., Bartlewski, P.M. 2007. Clinical reproductive physiology of ewes. In *Current therapy in large animal theriogenology* (pp. 642-649). WB Saunders

Robison, B., Noakes, D.E. 2019. Reproductive physiology of the female. *Veterinary Reproduction and Obstetrics*, 2–34.

Roy, F., Combes, B., Vaiman, D., Cribiu, E.P., Pobel, T., Delétang, F., Maurel, M.C. 1999. Humoral immune response to equine chorionic gonadotropin in ewes: association with major histocompatibility complex and interference with subsequent fertility. *Biology of Reproduction*, 61(1):209-218.

Russel, A.J.F., Doney, J. M., Gunn, R.G. 1969. Subjective assessment of body fat in live sheep. *The Journal of Agricultural Science*, 72(3), 451-454.

SAS. 2004. Institute, SAS/STAT. User's guide statistics released 9.1, 2nd ed. SAS Institute, Inc. Cary, NC, USA.

Salazar-López, N.J., Astiazarán-García, H., González-Aguilar, G.A., Loarca-Piña, G., Ezquerro-Brauer, J.M., Domínguez Avila, J.A., Robles-Sánchez, M. 2017. Ferulic Acid on Glucose Dysregulation, Dyslipidemia, and Inflammation in Diet-Induced Obese Rats: An Integrated Study. *Nutrients*, 9(7):675.

Scaramuzzi, R.J., Campbell, B.K., Downing, J.A., Kendall, N.R., Khalid, M., Muñoz-Gutiérrez, M., Somchit, A. 2006. A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reproduction Nutrition Development*, 46(4):339-354.

Smith, D.J. 1998. The pharmacokinetics, metabolism, and tissue residues of β -adrenergic agonists in livestock. *Journal of Animal Science*, 76(1):173-194.

Tanihara, F., Hirata, M., Nhien, N.T., Hirano, T., Kunihara, T., Otoi, T. 2018. Effect of ferulic acid supplementation on the developmental competence of porcine embryos during in vitro maturation. *Journal of Veterinary Medical Science*, 80(6):1007-1011.

Todini, L. 2007. Thyroid hormones in small ruminants: Effects of endogenous, environmental and nutritional factors. *Animal*, 1(7):997-1008.

Uribe-Velásquez, L.F., Correa-Orozco, A., Osorio, J.H. 2009. Características del crecimiento folicular ovárico durante el ciclo estral en ovejas. *Biosalud*, 8(1):117-131.

Valencia, J., Porras, A., Mejía, O., Berruecos, J. M., Trujillo, J., Zarco, L. 2006. Actividad reproductiva de la oveja Pelibuey durante la época del anestro: influencia de la presencia del macho. *Revista Científica*, 16(2):136-141.

Van Bibber-Krueger, C.L., Miller, K.A., Parsons, G.L., Thompson, L.K., Drouillard, J.S. 2015. Effects of zilpaterol hydrochloride on growth performance, blood metabolites, and fatty acid profiles of plasma and adipose tissue in finishing steers. *Journal of Animal Science*, 93(5):2419–2427.

Wildeus, S. 2000. Current concepts in synchronization of estrus: Sheep and goats. *Journal of Animal Science*, 77(E-Suppl):1-14.

Wyse, C.A., Zhang, X., McLaughlin, M., Biello, S. M., Hough, D., Bellingham, M., Evans, N.P. 2018. Circadian rhythms of melatonin and behaviour in juvenile sheep in field conditions: Effects of photoperiod, environment and weaning. *Physiology & Behavior*, 194:362-370.

Yu, X.J., Wang, J., Bai, Y. 2019. Estrous synchronization in ewes: The use of progestogens and prostaglandins. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A—Animal Science*, 68(4):219-230.