EFECTO DE LA MELATONINA Y DEL PLANO DE ALIMENTACION SOBRE LA SECRECION *IN VITRO* DE PROGESTERONA Y $PGF_{2\alpha}$ LOS DIAS 9 Y 15 DE GESTACION EN OVEJAS DE RAZA RASA ARAGONESA

J.A. Abecia, F. Forcada, J.M. Lozano y O. Zúñiga
Departamento de Producción Animal. Facultad de Veterinaria Zaragoza
*Proyectos AGF 97-1093 y AGF 98-0575

INTRODUCCION

La estacionalidad sexual que presenta la oveja es controlada por el fotoperiodo, cuya señal es transmitida al eje reproductivo neuroendocrino por la melatonina. Por ello, la administración de melatonina ha sido ampliamente utilizada como un medio para adelantar la época de actividad sexual, habiéndose observado incluso un incremento de la prolificidad tras dicho tratamiento (Haresign et al., 1990). Este incremento de la prolificidad observado en ovejas tratadas con melatonina podría haber sido inducido a través de una mayor tasa de supervivencia embrionaria, ya sea por una mejora de la funcionalidad luteal o por una reducción de los mecanismos antiluteolíticos. Algunos estudios han demostrado que la melatonina estimula la producción de progesterona, ya sea *in vivo* o *in vitro*, aunque no hay evidencia de que la melatonina esté involucrada en el control de los mecanismos de reconocimiento maternal de la gestación, por ejemplo, la secreción de prostaglandinas (PG) $F_{2\alpha}$.

En cuanto al efecto del plano de alimentación sobre la respuesta de las ovejas a los tratamientos con melatonina, Forcada et al. (1995) y Rondón et al. (1996) observaron una marcada interacción melatonina exógena x nivel nutricional sobre la tasa de ovulación, con un mayor efecto de aquélla en la mejora de este parámetro sobre ovejas subnutridas o en una peor condición corporal.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de la melatonina exógena sobre la funcionalidad lúteal y la secreción de prostaglandinas por parte del útero, así como su posible interacción con el plano de alimentación. Para ello, se utilizó un modelo *in vitro* para determinar la producción de progesterona por parte del tejido luteal y de $PGF_{2\alpha}$ por el tejido endometrial, incubados en presencia o ausencia de melatonina en el medio.

MATERIAL Y METODOS

En el mes de noviembre, 30 ovejas adultas de raza Rasa Aragonesa fueron alojadas en grupo (41°41'N) y divididas en dos lotes en función del plano de alimentación recibido, a partir de la colocación de esponjas vaginales (Intervet S.A., Salamanca) para sincronización del celo. Las dietas ofertadas cubrieron 1,5 (Lote A, n=15) ó 0,5 (Lote B, n=15) veces las necesidades de mantenimiento. A los 14 días de la colocación de las esponjas, éstas fueron retiradas y las ovejas cubiertas (día 0). Siete ovejas (2A y 5B), que no mostraron signos de celo, fueron retiradas de la experiencia. Doce animales (7A y 5B) fueron sacrificados 9 días tras las cubriciones. Con objeto de identificar aquellas ovejas gestantes, los cuernos uterinos fueron lavados, recuperándose los embriones. Se disecaron los cuerpos lúteos del ovario para determinar la secreción de progesterona *in vitro* (Abecia et al., 1995). El tejido luteal fue triturado,

suspendido en 1 ml de medio M-199 e incubado en duplicado durante 2 h a 37°C, con o sin melatonina (10 ng/ml). La concentración de progesterona en el medio de cultivo fue analizada por kits de RIA (bioMerieux, Marcy L'Etolie, Francia). A continuación, se tomaron muestras de tejido endometrial (aproximadamente 100 mg), incubándose por duplicado en 500 µl de medio de cultivo (Thibodeaux et al., 1994) durante 24 h a 37°C en 5% de CO_2, con o sin melatonina (10 ng/ml). Tras el cultivo, la concentración de $PGF_{2\alpha}$ fue analizada usando kits de ELISA (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI). El contenido de proteína en las muestras de tejido endometrial fue determinado con el fin de expresar la producción de $PGF_{2\alpha}$ por mg de proteína. El día 15 de gestación se repitió este protocolo en las ovejas restantes (6A y 5B).

El efecto del plano de alimentación sobre la secreción de ambas hormonas fue comparado usando análisis de varianza. La mayor o menor secreción en presencia o ausencia de melatonina en el medio de cultivo fue comparada mediante el t-test. Las tasas de fertilidad y de ovulación se compararon con la prueba de χ^2. Debido a que la secreción de $PGF_{2\alpha}$ fue significativamente distinta entre ovejas gestantes y no gestantes, especialmente el día 15 de gestación ($369,5 \pm 88,5$ *vs* 2210 ± 2107 ng $PGF_{2\alpha}$ /mg proteina), y con objeto de distinguir los efectos de la nutrición del efecto de la propia gestación, tan sólo se incluyeron en el análisis estadístico las ovejas gestantes (6A y 4B el día 9 y 6A y 2B el día 15). Debido a que sólo 2 ovejas del lote B presentaron gestación el día 15, se consideró más apropiado no realizar comparaciones estadísticas para la secreción de hormonas dicho día.

RESULTADOS Y DISCUSION

El tratamiento alimenticio no tuvo efecto sobre la tasa de ovulación (A: $1,46 \pm 0,18$; B: $1,40 \pm 0,22$ cuerpos lúteos). Tan sólo 2 ovejas (1A y 1B) estaban vacías el día 9, mientras que el porcentaje de gestaciones el día 15 fue superior en el lote A que en el B (100% vs 40%; $P = 0,06$).

Ni el plano de alimentación ni la inclusión de melatonina en el medio modificó la producción de progesterona el día 9 de gestación, mientras que el día 15 los cuerpos lúteos de las 2 ovejas del lote B mostraron una tendencia a secretar más progesterona en presencia que en ausencia de melatonina (Figura 1). En cuanto a la secreción de $PGF_{2\alpha}$, no se observaron diferencias entre lotes el día 9. Para las muestras tomadas el día 15 de gestación, el tejido endometrial de las 2 ovejas del lote B consideradas secretó una mayor cantidad de $PGF_{2\alpha}$ que las ovejas del lote A. Sin embargo, cuando estas muestras se incubaron con melatonina, el tejido de las ovejas subnutridas produjo menos cantidad de $PGF_{2\alpha}$ en presencia que en ausencia de dicha hormona (Figura 2).

Estos resultados sugieren que puede haber cierto efecto de la melatonina sobre la secreción *in vitro* de $PGF_{2\alpha}$, sólo en aquellas ovejas sometidas a restricción alimenticia, el día 15 de gestación, momento en el que las señales de establecimiento maternal de la gestación comienzan a establecerse. Sin embargo, ya que estos resultados se basan en datos de sólo 2 animales, estas conclusiones deben ser consideradas como meramente indicativas. Las ovejas subnutridas mostraron la menor tasa de gestación y la más alta secreción de $PGF_{2\alpha}$, de tal manera que la reducción en la secreción de prostaglandinas

experimentada por estos animales podría indicar que la melatonina mejoraría la supervivencia embrionaria en las ovejas subnutridas a través de una reducción de las señales luteolíticas. Además, también se observó cierta evidencia de un efecto de la melatonina sobre la función luteal en dichas ovejas, medido a través de la secreción de progesterona *in vitro*.

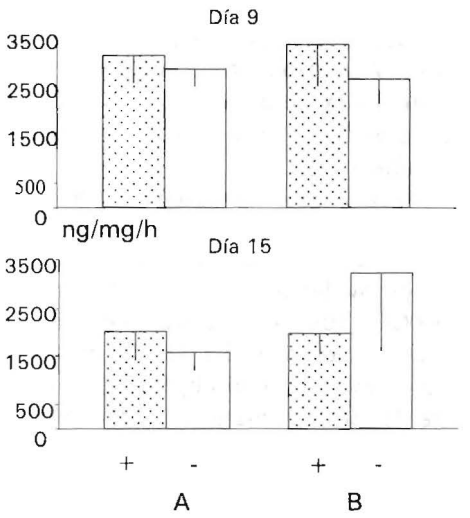


FIGURA 1

Secreción media (±e.s.) de progesterona con (+) o sin (-) melatonina

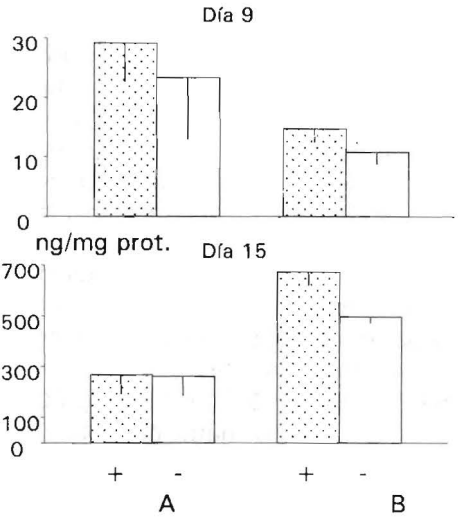


FIGURA 2

Secreción media (±e.s.) de $PGF_{2\alpha}$ con (+) o sin (-) melatonina

En conclusión, la adición de melatonina al medio de cultivo no modificó la secreción de progesterona o $PGF_{2\alpha}$ *in vitro* el día 9 de gestación, independientemente del plano de alimentación. Sin embargo, la presencia de melatonina en el cultivo de las muestras recogidas el día 15 redujo la secreción de $PGF_{2\alpha}$ tan sólo en las ovejas subnutridas, lo que confirmaría la interacción observada previamente entre los tratamientos de melatonina y la nutrición. Sin embargo, ya que estas conclusiones se derivan de datos de tan sólo 2 animales, se hacen necesarios futuros trabajos que puedan confirmar esta hipótesis.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abecia, J.A., Rhind, S.M., Bramley, T.A. and McMillen, S.M., 1995. Animal Science, 61, 57-62.

Forcada, F., Zarazaga, L. and Abecia, J.A., 1995. Theriogenology, 43, 1179-1193.

Haresign, W., Peters, A.R. and Staples, L.D., 1990 Animal Production, 50, 111-121.

Rondón, Z., Forcada, F., Zarazaga, L., Abecia, J.A. and Lozano, J.M., 1996. Animal Reproduction Science, 41, 225-236.

Thibodeaux, J.K., Broussard, J.R., Godke, R.A. and Hansel, W., 1994. Journal of Reproduction and Fertility, 101, 657-662.