

Universidad de Huelva

Departamento de Ciencias Agroforestales



Estudio de los mecanismos implicados en la estacionalidad reproductiva de caprinos mediterráneos : papel de los opioideos, las catecolaminas y la serotonina

**Memoria para optar al grado de doctora
presentada por:**

Irma del Rosario Celi Mariátegui

Fecha de lectura: 1 de junio de 2012

Bajo la dirección de los doctores:

**Luis Ángel Zarazaga Garcés
José Luis Guzmán Guerrero**

Huelva, 2012

ISBN: 978-84-15633-86-0

D.L.: H 317-2012



**Universidad
de Huelva**

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS AGROFORESTALES**

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE LOS MECANISMOS IMPLICADOS EN LA ESTACIONALIDAD
REPRODUCTIVA DE CAPRINOS MEDITERRANEOS. PAPEL DE LOS
OPIOIDEOS, LAS CATECOLAMINAS Y LA SEROTONINA**

Memoria presentada por: IRMA DEL ROSARIO CELI MARIÁTEGUI
para optar al grado de Doctora

Dirigida por: DR. LUIS ÁNGEL ZARAZAGA GARCÉS
DR. JOSÉ LUIS GUZMÁN GUERRERO

Huelva, Abril de 2012

*“Dejamos de temer aquello
que hemos aprendido a entender”*

- Marie Curie -

*Premio Nobel en Física y Química
(1867-1934)*

A todas las mujeres que se dedican y aman la ciencia...

ÍNDICE GENERAL

INDICE GENERAL

RESUMEN	1
SUMMARY	9
JUSTIFICACIÓN.....	17
GLOSARIO DE TÉRMINOS Y ABREVIATURAS	21
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	23
OBJETIVOS	143
ARTÍCULOS PUBLICADOS	145
DISCUSIÓN GENERAL	187
CONCLUSIONES	199
CONCLUSIONS.....	203
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	207
OTRAS PUBLICACIONES DERIVADAS	271



D. LUIS ÁNGEL ZARAZAGA GARCÉS y D. JOSÉ LUIS GUZMÁN GUERRERO, Profesores Titulares de Universidad del Departamento de Ciencias Agroforestales de la Universidad de Huelva, INFORMAN:

Que la Tesis Doctoral titulada: “ESTUDIO DE LOS MECANISMOS IMPLICADOS EN LA ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA DE CAPRINOS MEDITERRÁNEOS. PAPEL DE LOS OPIOIDEOS, LAS CATECOLAMINAS Y LA SEROTONINA”, que se recoge en la siguiente memoria y de la que es autora Dña. IRMA DEL ROSARIO CELI MARIÁTEGUI, Ingeniera Zootecnista, ha sido realizada bajo nuestra dirección, cumpliendo las condiciones exigidas para que la misma pueda optar al Grado de Doctor.

Lo que suscribimos como Directores de dicho trabajo y a los efectos oportunos en Huelva, a 11 de Abril de 2012.

Fdo. Dr. Luis Ángel Zarazaga Garcés

Fdo. Dr. José Luis Guzmán Guerrero

Los trabajos experimentales que conforman la presente Tesis Doctoral han sido financiados por el Ministerio de Educación y Ciencia (C.Y.C.I.T.) a través del Proyecto AGL2006-01426 y por el INIA mediante el proyecto RZ00-019, cuyo investigador principal ha sido el Dr. Luis Ángel Zarazaga Garcés.

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Son tantas las personas que me han ayudado para culminar con éxito la presente Tesis Doctoral que si intentara nombrarlas a todas sería tan largo como la misma Tesis, por lo que quiero indicar que si olvido mencionar a alguna no se sienta ofendida porque sabe de antemano que, desde ya, también le agradezco su apoyo.

Primero, quiero empezar mencionando a mis directores de Tesis: Luis Ángel Zarazaga y José Luis Guzmán, porque sin ellos no hubiese podido hacer absolutamente nada y especialmente a Luis Ángel por haber ideado el proyecto y ponerlo en marcha, lo que me permitió realizar esta interesante investigación. Amigos míos, gracias por enseñarme, orientarme y ayudarme durante estos cinco años de trabajo; por su dedicación, trabajo, entrega y disponibilidad en todo este tiempo que estuve con ustedes. Luis y José Luis, sé que al principio me costó mucho adaptarme al ritmo tan intensivo de trabajo y les agradezco mucho por la paciencia que tuvieron conmigo; pero, ¿saben?, gracias a ello he aprendido muchas cosas y sobre todo he descubierto lo bonita y gratificante que puede ser la carrera investigadora, en la cual espero continuar durante mucho tiempo. Siempre contarán con mi eterno agradecimiento y sepan que los admiro y respeto como profesionales, maestros y amigos, y también que sepan que, al momento de trabajar, ambos saben “ponerse la camiseta y dejarlo todo en la cancha”, como diríamos en Perú. La verdad me quedo sin palabras para continuar, sólo puedo decirles muchas gracias amigos y Dios los bendiga.

En segundo lugar, pero no menos importante, quiero mencionar al Ingeniero José Sarria Bardales, quien fue, y sigue siendo mi “maestro y guía” desde que terminé la carrera en la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM) de Lima (Perú), a quién le agradezco el haberme puesto en contacto con los amigos españoles y que me abrió las puertas para poder realizar el doctorado en España. Gracias por sus consejos y amistad durante todos estos años y que sepa que siempre contará con mi eterno agradecimiento.

Al Dr. Enrique Nolte, quien fue, y sigue siendo mi principal inspiración para iniciarme en el mundo del caprino. Gracias por enseñarme tantas cosas, por su amistad y porque sigamos trabajando en esta especie durante muchos años más.

A mis amigos, Manolo Delgado y Pepe Castel, por su amistad desde que los conocí cuando realizaba el proyecto de fin de carrera en Perú y por sus ánimos para

Agradecimientos

realizar el doctorado en España, así como posteriormente haberme enseñado tanto durante todo este tiempo. Y digo lo mismo de todos los demás amigos de la Universidad de Sevilla, ¡Gracias por todo!

A Migue, por darme el apoyo emocional y ánimos durante todo este largo trabajo de Tesis. No sabes lo que significó para mí el que estuvieras a mi lado todo este tiempo, por tus ánimos y lo más importante, tu cariño y afecto. Niño, mil gracias por todo a ti y a tu familia.

A Carolina y Rocío, mis primeras amigas y compañeras de trabajo cuando empecé con el doctorado y de quienes aprendí mucho el poco tiempo que estuvimos juntas trabajando. Muchas gracias y les deseo lo mejor en todo lo que hagan.

A todos mis amigos de la Granja Experimental de la Universidad de Huelva: a Andrés y Manuel, por toda la ayuda en el manejo de los animales, sus enseñanzas y buen humor “andalú”, fueron excelentes maestros para mí y que sepan que los quiero mucho; a Carmen, por tantos y tantos tubos de sangre que me ayudaste a preparar durante este tiempo y por tu amistad; y a todos mis demás compañeros y amigos de la Escuela, que aunque no los mencione saben que cuentan con mi agradecimiento y aprecio eterno.

Al personal de la Estación de Fisiología de la Reproducción del I.N.R.A. (Nouzilly, Francia) por la realización de los diversos análisis hormonales. No tuve el agrado de conocerlos en persona, pero muchas gracias por todo su apoyo.

A mis amigos españoles, y también como no, a mis “compis” de piso David, Nora y Ana. Gracias chicos por su ayuda mientras trabajaba en la Tesis, así como su ayuda en las traducciones, por acompañarme y darme muchos ánimos durante todo este tiempo. Los quiero mucho y siempre los recordaré con mucho cariño.

A toda mi familia en el Perú, a mis padres, hermanos, abuelita, tíos y primos, que siempre estuvieron pendientes de mis avances y progresos. ¡Este éxito se los dedico a ustedes con orgullo, querida gran familia!

A la memoria de todas las personas que me quisieron en vida, muy especialmente a mi abuelo Augusto, mi tío Jorge y a mi tía Maurita, a quienes amaré y recordaré por siempre lo que me enseñaron en vida, seguiré adelante y cumpliré con todas mis metas para orgullo de todos los que me quieren.

... y para concluir, deseo dedicar este trabajo a alguien MUY ESPECIAL...

*A mi PADRE,
a quien le debo todo lo que soy,
mis logros y donde he llegado hasta ahora.
Con mi eterno cariño, admiración y amor.
Gracias por todo,
PAPITO.*

RESUMEN

RESUMEN

El objetivo principal de este trabajo ha consistido en estudiar, en hembras caprinas Mediterráneas, el papel del fotoperiodo, la alimentación y la melatonina exógena en la regulación de la secreción de LH, analizando la importancia de diferentes sistemas neuroendocrinos que pudieran estar implicados en su regulación. También se ha estudiado si las concentraciones plasmáticas de melatonina tienen relación con la estacionalidad reproductiva, en caprinos Mediterráneos, y si estas concentraciones varían entre ambas venas yugulares.

Para la consecución de estos objetivos se han llevado a cabo 4 experimentos que se presentan a continuación. El manejo y desarrollo experimental se realizó de acuerdo con las directrices españolas de protección de los animales utilizados en experimentación animal (RD 1201/2005) y fueron llevados a cabo por personal entrenado. Todos los experimentos se realizaron en la Granja Experimental de la Universidad de Huelva (latitud: 37° 12' N; longitud 6° 54' O) que cumple los requerimientos de la Comisión de la Unión Europea sobre Establecimientos dedicados a Experimentación (Directiva 86/609) y relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos (Directiva 2010/63).

En el experimento 1 la hipótesis de trabajo era que el fotoperiodo es el principal factor medioambiental que controla la actividad hipofisaria en cabras y que la nutrición puede ser un modulador del mismo. El experimento fue un diseño factorial 2 x 2, con el fotoperiodo artificial y el nivel de alimentación como factores de variación. Para ello se utilizaron cuarenta cabras adultas (3-4 años de edad; $49,4 \pm 1,6$ kg de peso vivo y $2,41 \pm 0,4$ de condición corporal) que fueron ovariectomizadas un mes antes del inicio del experimento. Una semana antes de ser sometidas al tratamiento fotoperiódico experimental se les colocó un implante de estradiol de 3 cm de longitud para asegurar unas concentraciones plasmáticas constantes de estradiol. Desde el 15 de junio fueron distribuidas en dos lotes equilibrados en función del peso vivo y condición corporal y expuestas a cuatro intervalos de 3 meses de días largos (16 Luz: 8 Oscuridad; DL) seguidos de 3 meses de días cortos (8 Luz: 16 Oscuridad; DC) (Lote DLDC, N=20), o viceversa (Lote DCDL, N=20). Las cabras de cada uno de estos lotes fueron divididos, a su vez, en otros dos lotes en función del nivel de alimentación que recibieron: Lote A, recibió una alimentación que cubría 1,1 veces sus necesidades energéticas de mantenimiento (N=10) y lote B que recibió 0,7 veces sus necesidades energéticas de

mantenimiento (N=10). Estos lotes también fueron equilibrados en función de su peso vivo y condición corporal.

Durante todo el periodo experimental, dos veces por semana, se extrajeron muestras de sangre para analizar las concentraciones plasmáticas de LH y, semanalmente, se controló el peso vivo y la condición corporal. Con el fin de establecer la pulsatilidad de la secreción de LH se realizaron tres periodos de muestreo intensivo: (1) al inicio de la inhibición de la secreción de la LH, a los 27 días de iniciarse los días largos, (2) durante la inhibición de la secreción de LH, tras 86 días largos, y (3) al inicio de la estimulación de la secreción de LH, transcurridos 55 días cortos. Durante estos periodos de muestreo las muestras de sangre fueron tomadas cada 10 minutos durante 6 horas.

Para comprobar que los animales interpretaban adecuadamente el fotoperiodo al que estaban sometidos se extrajeron muestras de sangre para determinar las concentraciones plasmáticas de melatonina. Ese muestreo se llevó a cabo a los 45 días de estar las cabras sometidas a días largos (lote DLDC) o días cortos (lote DCDL), en la transición entre el segundo y tercer intervalo fotoperiódico. Las muestras de sangre se extrajeron, a intervalos de una hora, durante 2 horas antes del apagado de las luces y durante 2 horas después del encendido de las luces. Durante el resto del periodo de oscuridad, las muestras se tomaron a intervalos de 2 horas. Las cabras fueron muestreadas siempre en el mismo orden y en oscuridad, utilizando una lámpara frontal que emitía menos de 1 lux de intensidad de luz a la altura de los ojos de las hembras. Estos muestreos fueron realizados por dos personas para extraer la sangre simultáneamente y a la misma altura de ambas venas yugulares.

El fotoperiodo ejerció un claro efecto sobre las ganancias y pérdidas de peso vivo ($P < 0,001$), de manera que las hembras incrementaban su peso durante los días largos y perdían peso durante los días cortos.

Las concentraciones plasmáticas de LH fueron modificadas tanto por el nivel de alimentación como por el tratamiento fotoperiódico en todos los grupos. A lo largo del experimento, las concentraciones plasmáticas de LH del lote A fueron superiores al lote B ($0,60 \pm 0,01$ ng/ml vs. $0,41 \pm 0,01$ ng/ml, respectivamente; $P < 0,001$). Igualmente, las concentraciones plasmáticas de LH fueron superiores durante los días cortos ($0,58 \pm 0,01$ ng/ml vs. $0,44 \pm 0,01$ ng/ml, para los días cortos y días largos, respectivamente; $P < 0,001$). El intervalo medio entre el cambio de días largos a cortos y la estimulación de la secreción de LH fue diferente para cada lote de alimentación ($45,7 \pm 3,1$ días vs.

65,8 ± 2,1 días, para el lote A y B, respectivamente; P<0,001). Igualmente ocurrió con el intervalo entre el cambio de días cortos a días largos y la inhibición de la secreción de LH (29,6 ± 1,9 días vs. 22,2 ± 1,7 días, para el lote A y B, respectivamente; P<0,05).

Durante los periodos intensivos de muestreo, el nivel de alimentación no modificó la frecuencia de pulsos de LH, pero sí se dieron diferencias en cuanto a la concentración y frecuencia de pulsos de LH entre los diferentes periodos de muestreo (P<0,001), siendo en el momento de estimulación de la secreción de LH por los días cortos cuando se observaron los valores más elevados (0,84 ± 0,02 ng/ml y 0,52 ± 0,07 ng/ml; para concentración y frecuencia de pulsos de LH, respectivamente).

Las concentraciones plasmáticas de melatonina fueron menores durante el día que en las horas de oscuridad (P<0,001), con importantes variaciones entre animales (P<0,001) y entre los tratamientos fotoperiódicos, con mayores concentraciones en las hembras que en ese momento estaban siendo sometidas a días largos (45,8 ± 3,6 pg/ml vs. 34,9 ± 1,7 pg/ml, para el lote DLDC y DCDL, respectivamente, P<0,01). Sin embargo, no se observó efecto alguno del nivel de alimentación. También se observó una interacción significativa entre vena yugular y animal (P<0,001).

En conjunto, los resultados del presente experimento, confirmaron que las cabras Mediterráneas son sensibles a los efectos del fotoperiodo, siendo éste el principal factor medioambiental que puede controlar la actividad hipofisaria en condiciones naturales y que la alimentación juega un papel importante como modulador en el efecto que el fotoperiodo ejerce sobre la secreción de LH. Sin embargo, los niveles de alimentación utilizados parecen no modificar las concentraciones plasmáticas de melatonina.

En el experimento 2 se investigó la posible implicación de diferentes mecanismos neuronales (opioideos endógenos, sistema dopaminérgico y sistema serotoninérgico) en la regulación de la secreción de la LH, en función del nivel de alimentación y en diferentes momentos del ciclo fotoperiódico. En este experimento se utilizaron 36 cabras adultas, ovariectomizadas un mes antes de comenzar el experimento y portadoras de un implante de estradiol con las mismas características que en el experimento 1. Las hembras fueron distribuidas en dos lotes equilibrados en función de su peso vivo y condición corporal, recibiendo cada uno 1,1 (Lote A, N=18) ó 0,7 (Lote B, N=18) veces sus necesidades energéticas de mantenimiento. Todas las cabras fueron sometidas, durante 9 meses, de forma alternativa a 3 meses de días largos (DL, 16 h luz) seguidos de 3 meses de días cortos (DC, 8 h luz) y finalizando con otros 3 meses de días largos. Dos veces por semana se extrajeron muestras de sangre para analizar las

concentraciones plasmáticas de LH y semanalmente se controló el peso vivo y la condición corporal.

Para determinar el papel de los diferentes sistemas neuronales que podrían estar implicados en la regulación de la secreción de LH, se estudió el efecto de la administración intravenosa de naloxona (antagonista de los receptores opioideos endógenos), pimozide (antagonista de los receptores dopaminérgicos₂) y cyproheptadina (antagonista de los receptores serotoninérgicos 5-hidroxitriptamina₂) sobre la secreción de LH. Previamente, se estableció cuál era la dosis efectiva que estimulaba la secreción de LH de cada uno de los fármacos. Esta prueba fue realizada en 3 diferentes momentos a lo largo de las 6 semanas posteriores al cambio de DL a DC y se probaron 3 dosis distintas por cada uno de los fármacos (baja, media y alta). Los animales que recibieron las dosis fueron los mismos para cada fármaco y pertenecientes al lote A. Para evitar el posible efecto de permanencia del fármaco en sangre se administró en primer lugar la dosis baja, cinco días después la dosis media y 7 días después la dosis alta. Las dosis utilizadas fueron: 0,50, 1,00 y 2,00 mg/kg peso vivo de naloxona; 0,25, 0,50 y 0,75 mg/kg peso vivo de pimozide; y 0,1, 0,25 y 0,75 mg/kg peso vivo de cyproheptadina. Cada dosis de cada fármaco se aplicó a 3 cabras. Las muestras de sangre fueron obtenidas a intervalos de 10 minutos durante 3 horas [1 hora antes de la inyección del fármaco (periodo control) y 2 horas después de la administración del fármaco (periodo experimental)]. Sólo las concentraciones más altas en los 3 fármacos provocaron una mayor elevación en las concentraciones medias de LH. De este modo, las dosis finalmente utilizadas fueron: 2, 0,75 y 0,75 mg/kg de peso vivo para la naloxona, el pimozide y la cyproheptadina, respectivamente.

Una vez determinada la dosis efectiva que modificaba la secreción de LH se estudió el papel de cada uno de los fármacos en tres momentos diferentes del ciclo fotoperiódico: al inicio de la estimulación de la secreción de LH por los días cortos, al inicio de la inhibición de la secreción de LH por efecto de los días largos y durante la inhibición por los días largos. Las muestras de sangre fueron obtenidas a intervalos de 10 minutos durante 6 horas, divididos en 2 periodos de 3 horas: periodo control (antes de aplicar el fármaco) y periodo tratamiento (tras la aplicación del fármaco).

El peso vivo y la condición corporal fueron superiores en el lote A ($P < 0,001$). De igual manera, las concentraciones plasmáticas de LH fueron superiores en este mismo lote ($0,59 \pm 0,02$ ng/ml) respecto al lote B ($0,40 \pm 0,01$ ng/ml) ($P < 0,001$) y también durante los días cortos con respecto a los días largos ($0,54 \pm 0,01$ vs. $0,43 \pm$

0,01 ng/ml, para días cortos y largos, respectivamente) ($P < 0,001$). Además, se observaron diferencias en las concentraciones medias de LH entre los grupos nutricionales durante los días cortos ($0,65 \pm 0,02$ vs. $0,44 \pm 0,02$ ng/ml, para los lotes A y B, respectivamente; $P < 0,001$) y los días largos ($0,51 \pm 0,02$ vs. $0,35 \pm 0,02$ ng/ml, para los lotes A y B, respectivamente; $P < 0,001$). El intervalo medio entre el cambio de días largos a días cortos y la estimulación de la secreción de LH fue diferente entre ambos niveles de alimentación ($46,6 \pm 3,8$ días vs. $65,4 \pm 2,5$ días, para el lote A y B, respectivamente; $P < 0,001$). Igualmente, el intervalo entre el cambio de días cortos a días largos y la inhibición de la secreción de LH fue más largo en el lote que estaba mejor alimentado ($27,9 \pm 1,6$ días) que en el peor alimentado ($22,6 \pm 1,8$ días) ($P < 0,05$).

Las concentraciones plasmáticas de LH del lote subalimentado sólo fueron modificadas por la inyección de naloxona en el comienzo de la inhibición de la secreción de LH por los días largos. Sin embargo, el lote mejor alimentado respondió con un incremento en las concentraciones ($P < 0,001$) y pulsatilidad ($P < 0,05$) de la secreción de LH tras la inyección de naloxona y cyproheptadina durante el comienzo de la estimulación de la secreción la LH por los días cortos y el comienzo de la inhibición de la secreción de la LH por los días largos. Además, parece ser que el sistema dopaminérgico está implicado en el comienzo de la inhibición de la secreción de la LH por los días largos, puesto que en el lote bien alimentado la inyección de pimozide incrementó las concentraciones ($P < 0,001$) y la pulsatilidad ($P < 0,05$) de LH. Finalmente, durante la inhibición de la secreción de la LH por los días largos tanto el pimozide como la cyproheptadina incrementaron las concentraciones plasmáticas de LH en el lote A.

En el experimento 3 se estudió el efecto de la administración intravenosa de naloxona, pimozide, cyproheptadina y N-metil-D,L-aspartico (NMDA, agonista de los receptores de los aminoácidos excitatorios) sobre la secreción de LH, en respuesta a la aplicación de melatonina exógena en cabras Mediterráneas. Se realizó un diseño factorial 2×2 , incluyendo como factores de variación el tratamiento de melatonina exógena (Melovine®, CEVA Salud Animal, Barcelona, España) (Melatonina: M; Control: C) y el nivel de alimentación (Alto: A; Bajo: B). Se seleccionaron 48 cabras adultas, ovariectomizadas 1 mes antes de realizar el experimento y portadoras de un implante de estradiol de 3 cm de longitud. Fueron distribuidas en dos lotes experimentales, equilibrados en función de su peso vivo y condición corporal, que recibieron 1,1 (Lote A, $N=24$) ó 0,7 (Lote B, $N=24$) veces sus necesidades energéticas

de mantenimiento. Todas las cabras fueron sometidas al mismo tratamiento fotoperiódico que en el experimento 2. Tras la finalización del segundo periodo de días largos, la mitad de cada lote de alimentación recibió un implante subcutáneo de melatonina (Lotes AM, N=12 y BM, N=12 y Lotes AC, N=12 y BC, N=12), quedando todos los animales en fotoperiodo de días largos. Dos veces por semana se extrajeron muestras de sangre para analizar las concentraciones plasmáticas de LH y semanalmente se controló el peso vivo y la condición corporal.

Para los fármacos utilizados en el experimento 2 se utilizaron dosis similares (2, 0,6 y 0,6 mg/kg de peso vivo de naloxona, pimizide y cyproheptadina, respectivamente) y, previamente a la realización de este experimento, se determinó la dosis efectiva a administrar de NMDA. Para ello, se utilizaron 3 cabras del lote A y se les inyectó 3 dosis crecientes de NMDA (1, 2, and 4 mg/kg peso vivo), transcurriendo 48 horas entre una administración y la siguiente. Las muestras de sangre fueron obtenidas a intervalos de 10 minutos durante 3 horas [1 hora antes de la inyección del fármaco (periodo control) y 2 horas después de la administración del fármaco (periodo experimental)]. Se demostró que las concentraciones de LH se incrementaron más claramente con la dosis más alta de NMDA usada (4 mg/kg de peso vivo) que fue, finalmente, la utilizada en el experimento principal.

Una vez fijadas las dosis de cada fármaco, se determinaron las concentraciones plasmáticas de LH en tres momentos distintos del tratamiento con melatonina: (1) el día anterior, día -1; (2) a los 30 días y (3) a los 45 días de la colocación del implante de melatonina. En cada momento, cada animal, recibió naloxona y NMDA 5 días más tarde (N=6), o cyproheptadina y pimizide 5 días más tarde (utilizando otras 6 hembras). Esos 5 días de intervalo se consideraron para permitir la eliminación del fármaco previo. Los fármacos fueron siempre administrados en el mismo orden. En cada momento, las muestras de sangre se extrajeron cada 10 minutos durante 6 horas [3 hora antes de la inyección del fármaco (periodo control) y 3 horas después de la administración del fármaco (periodo experimental)].

De nuevo, se observó un efecto significativo del nivel de alimentación utilizado sobre las concentraciones plasmáticas de LH, previamente a la colocación del implante ($0,65 \pm 0,02$ ng/ml vs. $0,45 \pm 0,01$ ng/ml, para el lote A y B, respectivamente, $P < 0,01$). Además, se observaron mayores concentraciones de LH durante los días cortos ($0,57 \pm 0,02$ ng/ml) que durante los días largos ($0,49 \pm 0,02$ ng/ml) ($P < 0,001$). Una vez colocado el implante de melatonina las concentraciones de LH se incrementaron a los

31,3 ± 3,4 días, independientemente del nivel de alimentación. Sin embargo, se observó una interacción significativa entre el nivel de alimentación y el tratamiento de melatonina ($P < 0,05$), de tal manera que las concentraciones de LH se incrementaron más claramente en el lote B tratado con melatonina.

En el día -1, es decir, durante la plena inhibición de la secreción de la LH por los días largos, el NMDA incrementó las concentraciones ($P < 0,001$) y la pulsatilidad ($P < 0,05$) de LH en ambos lotes de alimentación y la cyproheptadina sólo en el lote A (concentraciones: $P < 0,01$ y pulsatilidad: $P < 0,05$). A los 30 días de la colocación del implante de melatonina, la naloxona incrementó las concentraciones de LH en los lotes tratados con melatonina (Lote AM: $P < 0,01$ y lote BM: $P < 0,05$) y el NMDA en las cabras bien alimentadas (Lotes AM y AC: $P < 0,01$). Respecto a la pulsatilidad de la LH, sólo se vio modificada por la inyección de naloxona y NMDA en el lote AM ($P < 0,05$). Finalmente, a los 45 días de la colocación del implante, la naloxona incrementó las concentraciones de LH en el lote AM, la cyproheptadina en las cabras bien alimentadas (AM y AC: $P < 0,01$) y el NMDA en todos los lotes experimentales ($P < 0,01$). Sin embargo, la pulsatilidad de secreción de LH sólo se vio incrementada por la inyección de cyproheptadina en el lote de hembras bien alimentadas ($P < 0,05$).

Los resultados del presente experimento demuestran que en caprinos Mediterráneos existe una clara interacción entre el nivel de alimentación y el tratamiento con melatonina exógena. Se ha observado que el papel de los diferentes mecanismos neuronales estudiados, que podrían estar implicados en la estimulación de la secreción de la LH por la melatonina exógena, es muy reducido. Así, los opioideos endógenos (naloxona) parecen estar implicados en la estimulación de la secreción de LH por la melatonina, ya que la naloxona incrementó las concentraciones de LH a los 30 días de la colocación del implante, independientemente del nivel de alimentación y a los 45 días de la implantación en las hembras que recibían una ración que cubría 1,1 veces sus necesidades energéticas de mantenimiento. El sistema serotoninérgico (cyproheptadina) parece estar más implicado en el control de la secreción de LH por la alimentación que por la melatonina, ya que una respuesta positiva se observó a los 45 días de la colocación del implante, tanto en animales tratados con melatonina como en los no tratados. En cuanto al papel de los aminoácidos excitatorios (NMDA), parece que es un mecanismo que no está implicado en la estimulación de la secreción de LH por la melatonina, ya que se incrementó la secreción de LH en el Lote A a los 30 días de la

colocación del implante, independientemente del tratamiento con melatonina y en todas las hembras a los 45 días de su colocación.

Finalmente, en el cuarto experimento, se investigó si las concentraciones plasmáticas de melatonina absolutas (nocturnas) o relativas (ratio concentraciones nocturnas/concentraciones diurna) están asociadas con la actividad reproductiva estacional en cabras Mediterráneas de raza Payoya y si estas concentraciones de melatonina varían entre las dos venas yugulares. Se utilizaron 32 cabras adultas enteras que habían parido al menos 5 meses antes y que fueron mantenidas en condiciones de fotoperiodo natural. Diariamente se controló el celo de las cabras mediante machos enteros provistos de mandil y dos veces por semana se tomaron muestras de sangre para la determinación de las concentraciones plasmáticas de progesterona. Además, en cada uno de los equinoccios y solsticios del año se obtuvieron, de cada cabra, muestras de sangre cada hora (3 nocturnas y 2 diurnas) para estudiar las concentraciones plasmáticas de melatonina. Estas muestras fueron obtenidas simultáneamente de ambas venas yugulares por dos personas. En el caso de las muestras nocturnas, se obtuvieron utilizando lámparas que emitían luz roja con una intensidad inferior a 1 lux a la altura de los ojos de los animales.

Las concentraciones plasmáticas de melatonina fueron menores en las muestras diurnas que en las nocturnas para ambas venas yugulares ($P < 0,001$). No se observaron diferencias significativas entre ambas venas en relación al momento de muestreo pero se encontró una elevada repetibilidad. Además, en las concentraciones nocturnas de melatonina, existió una interacción significativa entre vena yugular y animal ($P < 0,001$). Los análisis realizados indican que ni las concentraciones absolutas ni las relativas de melatonina estuvieron relacionadas con las fechas de inicio o final de la actividad reproductiva, ya fuera por la detección de celo o por la actividad ovulatoria. Por lo tanto, se puede concluir que (1) las concentraciones plasmáticas de melatonina son muy variables entre ambas venas yugulares del mismo individuo pero no en la población general (2) las concentraciones de melatonina son altamente repetibles para un mismo individuo y (3) la amplitud en las concentración de melatonina absoluta o relativa no están relacionadas con la estacionalidad reproductiva.

SUMMARY

SUMMARY

The overall aim of this thesis was to study, in Mediterranean female goats, which is the role of photoperiod, nutrition and exogenous melatonin in the regulation of LH secretion, analyzing the importance of different neuroendocrine systems that may be involved in its regulation. Likewise, we have examined whether plasma melatonin concentrations vary between the two jugular veins and what is its relation with seasonal reproductive activity in Mediterranean goats.

To achieve these objectives, we have conducted 4 experiments which are presented below. The handling and experimental development were performed in strict accordance with Spanish guidelines for the protection of experimental animals (RD 1201/2005) and were conducted by trained personnel. All experiments were performed at the University of Huelva experimental farm (latitude 37 ° 12 'N; longitude 6 ° 54' W) that meets the requirements of the European Community Commission for Scientific Procedure Establishments (Directive 86/609) and related to the protection of animals used for scientific purposes (Directive 2010/63).

In experiment 1 the working hypothesis was that the photoperiod is the main environmental factor controlling pituitary activity in female Mediterranean goats, but that its effect might be modulated by the level of nutrition. The experimental design was a factorial 2 x 2 with photoperiod and nutritional treatments as factors of variation. Forty adult goats (3-4 years of age, 49.4 ± 1.6 kg and 2.41 ± 0.4 of body condition score), ovariectomized one month before the beginning of the experiment, were used. One week before the beginning of the experimental photoperiodic treatment, they received a 3 cm-long subcutaneous silastic implant containing estradiol to ensure constant plasma concentrations of estradiol. On 15th June the goats were randomly assigned into two balanced groups according to live weight and body condition score and exposed at intervals of 3 months of long days (16 h of light: 8 h of darkness; LD) followed by 3 months of short days (8 h of light: 16 h of darkness; SD) (group LDSD, N=20) or *vice versa* (group SLDL, N=20). Likewise, the does of each group, were randomly assigned to one of two experimental nutrition groups: Group H, received 1.1 times their nutritional maintenance requirements (N=10) and group L, received 0.7 times their maintenance requirements (N=10). All groups were balanced in terms of animal live weight and body condition score.

For the entire observation period, blood samples were collected twice weekly to analyze plasma LH concentrations and live weight and body condition score of all animals were recorded weekly. In order to establish the pulsatility of LH secretion, there were 3 intensive sampling periods: (1) at the onset of the inhibition of LH secretion, after 27 d of long days, (2) during the inhibition of LH secretion, after 86 d of long days, and (3) at the onset of stimulation of LH secretion, after 55 d of short days. During these sampling periods, blood samples were taken at 10 minute intervals over a period of 6 hours.

The nocturnal and diurnal plasma melatonin concentrations of the does were assessed on day 45 in both the LDS (under long days) and SLD (under short days) groups following the transition from the second to the third photoperiod interval. Blood samples were taken at hourly intervals, starting and finishing 2 hours before and after “lights off” or “lights on”, respectively. The does were always sampled in the same order at each sampling time and under dim-red light and less than 1 lux at 20 cm, avoiding any direct illumination of the eyes. These samples were taken via jugular catheters by two operators ensuring simultaneous sampling from both jugular veins.

The photoperiod had a clear effect on live weight gains and losses of the does ($P < 0.001$), with an increase in live weight during the long day photoperiod and slight reduction during the short days.

Plasma LH concentrations in all groups were modified by nutrition and photoperiodic treatment. Throughout the experiment, plasma LH concentrations were higher in the H group than in L group (0.60 ± 0.01 ng/mL vs. 0.41 ± 0.01 ng/mL, respectively; $P < 0.001$). Further, higher LH concentrations were observed during the short day photoperiod (0.58 ± 0.01 ng/mL vs. 0.44 ± 0.01 ng/mL, for short days and long day photoperiod respectively; $P < 0.001$). The mean interval between the shift from long to short days and the stimulation of LH secretion was different for each nutritional group (45.7 ± 3.1 d vs. 65.8 ± 2.1 d, for H and L group respectively; $P < 0.001$). Similarly, the mean interval between the shift from short to long days and the inhibition of LH secretion was different between nutrition groups (29.6 ± 1.9 d vs. 22.2 ± 1.7 d, for H and L group, respectively; $P < 0.05$).

The frequency of LH pulses did not differ between nutrition groups during the intensive sampling period, however, differences in concentration and LH pulse frequency were observed between sampling periods ($P < 0.001$), with higher pulse frequencies at the time of the beginning of the stimulation of LH secretion by short days

when higher values were observed (0.84 ± 0.02 ng/mL and 0.52 ± 0.07 ng/mL, for concentration and LH pulse frequency, respectively).

Diurnal melatonin concentrations were lower than nocturnal ($P < 0.001$), with large variations between animals ($P < 0.001$) and between photoperiodic groups, with higher melatonin concentrations in the groups during the long day photoperiod (45.8 ± 3.6 pg/mL vs. 34.9 ± 1.7 pg/mL for LDS and SLD respectively; $P < 0.01$), but no significant differences appeared between the nutrition treatments. The interaction *jugular vein x animal* had a significant effect on melatonin concentration ($P < 0.001$).

All together, this data demonstrates that Mediterranean female goats are sensitive to changes in photoperiod, and that this environmental cue may control the timing of the breeding season under natural conditions and that nutrition modulates the effect of photoperiod on LH secretion. However, nutrition would appear to have no effect on melatonin concentrations.

In experiment 2, we studied which neural mechanism (endogenous opioid, dopaminergic and serotonergic system) is involved in the regulation of LH secretion, with and without nutritional modulation and at different times of the photoperiodic cycle. Thirty-six adult female goats were used in this study. They were ovariectomized one month before the onset of the experiment and simultaneously implanted subcutaneously with an estradiol implant, as in experiment 1. Does were randomly assigned into two experimental groups based on the provision of nutrition and balanced for live weight and body condition score, each group receiving 1.1 (H group, N=18) or 0.7 (L group, N=18) times their maintenance requirements. All goats were exposed for 9 months to alternations of 3 months of long days (LD, 16 h light) and 3 months of short days (SD, 8 h light) and ending with another 3 months of long days. Plasma LH concentrations were measured twice a week and live weight and body condition score were recorded weekly.

The effects of intravenous injections of naloxone (endogenous opioid receptor antagonist), pimozide (dopaminergic₂ receptor antagonist) and cyproheptadine (serotonin 5-hydroxytryptamine₂ receptor antagonist) on the LH secretion were studied. A challenge was conducted in order to define the effective dose of each drug that modifies LH concentrations in goats. This challenge was performed on 3 occasions over 6 weeks after the shift from LD to SD and 3 different doses were tested for each drug (low, medium and high). The animals that received doses were the same for each drug and all were in the H group. To avoid possible carry-over effects, the first time, the

same goats received the lowest dose of each drug intravenously. Five days later, they received the intermediate dose and 7 days later received the highest dose of each drug. The doses used were: 0.50, 1.00 and 2.00 mg/kg live weight of naloxone; 0.25, 0.50 and 0.75 mg/kg live weight of pimozide; and 0.1, 0.25 and 0.75 mg/kg live weight of cyproheptadine. Three goats received each dose of each drug. Blood samples were collected at 10-minute intervals for 3 hours starting one hour before the injection of the drug (control period) and continuing 2 hours after intravenous injection of the drug (treatment period). Of all the doses used, only the highest in the 3 drugs elicited an elevation in mean LH concentrations. Thus, the final doses used were 2, 0.75 and 0.75 mg/kg live weight for naloxone, pimozide and cyproheptadine, respectively.

Once the effective dose of each drug that modifies LH secretion was defined, blood samples were assessed during tests in three different photoperiodic situations: the onset of LH stimulation by short days, the onset of LH inhibition by long days and during the LH inhibition by long days. The samples were collected at 10-minute intervals for 6 hours and divided into 2 periods of 3 hours: control period (before the injection of the drug) and treatment period (after drug intravenous injection).

Mean live weight and body condition score were higher in Group H ($P < 0.001$). Likewise, the LH concentrations were higher in Group H (0.59 ± 0.02 vs. 0.40 ± 0.01 ng/mL, for the H and L groups, respectively; $P < 0.001$) and during the short day photoperiod compared with long day photoperiod (0.54 ± 0.01 vs. 0.43 ± 0.01 ng/mL for short and long days, respectively, $P < 0.001$). Moreover, differences in mean LH concentrations between nutritional groups were observed during short-day (0.65 ± 0.02 vs. 0.44 ± 0.02 ng/mL for the A and B groups, respectively, $P < 0.001$) and long-day experiments (0.51 ± 0.02 vs. 0.35 ± 0.02 ng/mL for the A and B group, respectively, $P < 0.001$). The mean interval between the shift from long to short days and the stimulation of the LH secretion differed between nutritional groups (46.6 ± 3.8 d vs. 65.4 ± 2.5 d for the H and L groups respectively, $P < 0.001$). Similar results were demonstrated with the mean interval between the change from short to long days at the onset of the inhibition of LH secretion with a clear effect of nutrition (27.9 ± 1.6 d vs. 22.6 ± 1.8 d for the H and L groups respectively, $P < 0.05$).

Plasma LH concentrations of L group were increased by the injection of naloxone at the onset of the inhibition of LH secretion by long days. However, during the post injection period, naloxone and cyproheptadine induced a clear increase in LH concentrations ($P < 0.001$) and the mean number of pulses in the H group ($P < 0.05$) at the

onset of the stimulation of LH secretion by short days and at the beginning of the inhibition of LH secretion by long days. Furthermore, we observed that the pimozide injection increased the LH concentration ($P < 0.001$) and the mean number of pulses in the H group ($P < 0.05$). These results demonstrated that the dopaminergic system is involved during the onset of the inhibition of LH secretion by long days. Finally, during the inhibition of LH secretion by long days both pimozide and cyproheptadine increased LH concentrations in the H group.

In the 3rd experiment we evaluated the effect of intravenous injections of naloxone, pimozide, cyproheptadine and N-methyl-D,L-aspartic acid (NMDA, excitatory amino acids agonist) in the stimulation of LH secretion by melatonin implants in Mediterranean female goats. The experiment had a 2 x 2 factorial design, including the implantation or not of exogenous melatonin (Melovine®, CEVA Salud Animal, Barcelona, Spain) (Melatonin: M; Control: C) and the nutritional level (High: H; Low: L) as factors. Forty-eight adult female goats were used, ovariectomized one month before the start of the experiment and simultaneously implanted subcutaneously with a 3 cm length implant of estradiol. Does were assigned to two experimental groups based on the provision of nutrition and balanced for live weight and body condition score receiving 1.1 (group H, N=24) or 0.7 (group L, N=24) times the nutritional maintenance requirements. Both groups were subjected to the same photoperiodic treatment as experiment 2. At the end of the second period of long days, each nutritional group was divided into two subgroups, i.e., those received a subcutaneous melatonin implant (Groups HM, N=12 and LM, N=12; and Groups HC, N=12 and LC, N=12), and all animals were maintained under a long day photoperiod. Blood samples were collected twice a week by jugular venipuncture to analyze LH concentrations. The live weight and body condition score of all animals were recorded weekly.

For the drugs used in experiment 2, we used similar doses (2, 0.6 and 0.6 mg/kg live weight for naloxone, pimozide and cyproheptadine, respectively). A dose response curve for the effect of NMDA on LH secretion was constructed in a preliminary experiment to determine the dosage to use in the main experiment, using 3 goats from the H group. Three doses of NMDA were tested at 48 h intervals on the same animals (1, 2, and 4 mg/kg live weight) in increasing order. LH secretion was assessed in serial samples of jugular blood obtained every 10 minute during the hour preceding the drug injection, and every 10 minute for 2 hours thereafter. After the injection of the highest

dosage of NMDA (4 mg/kg live weight), the LH concentrations were higher, and this dose was used for the main experiment.

Once settled the dose of each drug, plasma LH concentrations were determined at different times following melatonin implantation: (1) the day before, day -1, (2) on day 30, and (3) at 45 days after the melatonin subcutaneous implant. At each time, each animal, received naloxone and then NMDA after 5 days (n=6), or cyproheptadine and then pimozide after 5 days (using the other six females), the 5-day period allowing for washout of the previously administered drug. Drugs were always administered in the same order. During all drug challenges, blood samples were collected at 10 min intervals 3 h before (control period) and 3 h after (drug period) the i.v. injection of the drug or corresponding vehicle (controls).

Nutrition had a significant effect on LH secretion prior to melatonin implantation (0.65 ± 0.02 ng/mL vs. 0.45 ± 0.01 ng/mL for the H and L groups respectively, $P < 0.01$). Further, higher LH concentrations were observed during the short days (0.57 ± 0.02 ng/mL) than during the long days (0.49 ± 0.02 ng/mL) ($P < 0.001$). The mean interval between melatonin implantation and the stimulation of LH secretion was 31.3 ± 3.4 days, with no differences between nutritional groups. An interaction between nutrition and melatonin implantation ($P < 0.05$) affecting LH secretion was also observed, indicating that the LH concentrations increased more clearly in the L group treated with melatonin.

On day -1, before melatonin implantation, at the time when LH secretion is inhibited by long days, the NMDA treatment induced higher LH concentrations ($P < 0.001$) and pulsatility ($P < 0.05$) in both the H and L groups and cyproheptadine only in the H group (LH concentration: $P < 0.01$ and LH pulsatility: $P < 0.05$). On day 30, after melatonin implantation, naloxone increased the LH concentrations during the post-injection period in the implanted animals (HM group: $P < 0.01$ and LM group: $P < 0.05$) and NMDA increased the LH concentrations in H groups (HM and HC group: $P < 0.01$). The injection of both naloxone and NMDA increased the mean number of LH pulses in the HM animals ($P < 0.05$). Finally, after 45 days of melatonin implantation, naloxone increased LH concentrations in the HM group, cyproheptadine increased in well-fed goats (HM and HC: $P < 0.01$) and NMDA clearly increased LH concentrations in all experimental groups ($P < 0.01$). However, LH pulsatility was only increased by cyproheptadine in the does of H groups ($P < 0.05$).

These results provide evidence of a clear interaction between nutrition and exogenous melatonin treatment in Mediterranean female goats. In the present experiment, it has been observed that the effects of different neural systems involved in the stimulation of LH secretion by melatonin seem to be very small. Thus, endogenous opioids (naloxone) appear to be most strongly involved in stimulating the LH secretion by melatonin. Thirty days after implantation, naloxone increased LH concentrations irrespective of level of nutrition and at 45 days after implantation in those animals that received 1.1 times their nutritional maintenance requirements. The serotonergic system (cyproheptadine) appears to be most influenced by nutritional level in the control of LH secretion than melatonin, since a clear response was observed at 45 days after the moment of melatonin implantation, irrespective of whether they received melatonin or not. There is no evidence that supports the hypothesis that the stimulation of LH secretion by excitatory amino acids (NMDA) may occur by melatonin influence since a positive effect on the LH secretion was observed in the H group 30 days after implantation, irrespective of whether they received melatonin or not, and in all does at 45 days after melatonin implantation.

Finally, in the fourth experiment, we investigated whether melatonin concentrations vary between the two jugular veins and whether absolute (nocturnal) or relative (nocturnal/diurnal ratio) plasma melatonin concentrations are associated with seasonal reproductive activity in Mediterranean female goats of Payoya breed. Thirty-two adult goats, which had kidded at least 5 months previously, were used and penned under natural photoperiod. Oestrus activity was tested daily using entire aproned males and blood samples were collected twice a week for progesterone concentrations. Nocturnal and diurnal melatonin plasma concentrations from each jugular vein were studied at each equinox and solstice of the year. These samples were assessed at hourly intervals (3 nocturnal samples and 2 diurnal samples) from each goat. Blood samples from the two jugular veins were obtained by venipuncture by two operators under dim red light lamps, less than 1 lux of intensity at eye level, during the nocturnal phase.

Diurnal melatonin concentrations were lower than nocturnal in each jugular vein ($P < 0.001$). No differences between the two veins were observed related to sampling period, but the coefficient of correlation between sampling periods was very high. Additionally, there was a significant interaction ($P < 0.001$) between jugular vein and animal nocturnal melatonin concentrations. The analyses performed indicated that neither the absolute nor the relative melatonin concentrations were related with the dates

of onset or end of reproductive activity, either by oestrus detection or ovulatory activity. Therefore, we can conclude that in goats (1) melatonin concentrations are highly variable between jugular veins in the same individual but not in the general population, (2) melatonin concentrations are highly repeatable for each individual, and (3) absolute and relative amplitudes of melatonin concentrations are not linked to the seasonal breeding activity in Mediterranean goats.

JUSTIFICACIÓN

JUSTIFICACIÓN

La ganadería es una de las actividades productivas que han acompañado al hombre desde tiempo inmemorial, forjando los patrones y principales aspectos de su desarrollo histórico y económico. Los pequeños rumiantes, dentro del cual se encuentran los ovinos y caprinos, han ocupado desde siempre un escalafón importante dentro de los sistemas de producción tradicionales en España. Éstos han sido considerados una actividad económica importante en varias regiones, sobre todo en zonas rurales donde predominan mayormente los sistemas extensivos y semiextensivos. Este hecho se debe a que, por su reducido tamaño, se adaptan a zonas difíciles y poco productivas, sobre todo el caprino, y a que tienen un aprovechamiento más eficiente de los recursos forrajeros. Todo esto ha permitido a las poblaciones locales contar con este ganado como medio de vida en diversas zonas, que van desde la montaña hasta el desierto, donde otro rumiante no sería capaz de llegar.

Desde la incorporación de España en la Unión Europea, la ganadería caprina ha tenido que hacer frente a una serie de situaciones no previstas en un principio, debido a la apertura de las fronteras. Así, a principios del año 2010, el precio de la leche del sector caprino experimentó una bajada alarmante debido a que su principal comprador, Francia, empezó a importar leche proveniente de Holanda, con un precio de venta ligeramente inferior al español. A pesar de que el censo caprino se ha visto incrementado, el número de explotaciones se ha reducido, ya que lo que se busca actualmente es la especialización de la producción para hacer frente a estas dificultades del mercado, lo que podría traducirse en conseguir una mayor productividad y eficiencia en el futuro.

Por lo tanto, para lograr esto, es importante que la producción de leche sea más o menos constante a lo largo del año, evitando los altibajos de la producción, debido a la abundancia de leche en la primavera, por la concentración de los partos. Esta estacionalidad en la producción resulta una desventaja para el ganadero, sobre todo por la disminución de los precios de la leche y también del cabrito, que supone un ingreso secundario en la producción.

La estacionalidad es una estrategia adaptativa mediante la cual las especies animales, mantenidas en su hábitat natural, definen sus periodos de actividad reproductiva según las variaciones de horas de luz diurna a lo largo del año

(fotoperiodo), la situación geográfica (latitud), temperatura, disponibilidad de alimento, interacciones sociales, etc. Esta adaptación genética crea estrategias reproductivas encaminadas a condicionar que la época de partos se produzca en la estación del año en donde las condiciones ambientales, climáticas y de alimentación sean más favorables para el crecimiento y desarrollo de las crías. En el caso de los pequeños rumiantes, como los ovinos y caprinos, el periodo reproductivo se inicia con la luz decreciente del otoño y el periodo de anestro estacional con el inicio de los días crecientes de la primavera. Este periodo de inactividad sexual constituye un importante factor al limitar la productividad de la especie.

A diferencia de otras razas más estacionales, las cabras del Mediterráneo (dentro de las cuales se encuentran las razas españolas) no tienen un periodo de descanso reproductivo tan marcado, de modo que puede permitir la aplicación de técnicas de manejo en función al grado de conocimiento del comportamiento reproductivo de la especie que se tenga. Y aunque ya hay algunos tratamientos para estimular la actividad sexual, el costo de estos tratamientos, a pesar de ser eficaces, los hace, en la mayoría de los casos, inviables e imprácticos comercialmente. Todo esto ha motivado, desde hace varios años, a la realización de estudios que permitan comprender los mecanismos que controlan esta estacionalidad en la especie caprina.

En el ovino se han realizado numerosos estudios con el propósito de explicar los mecanismos neuroendocrinos que regulan su ciclo reproductivo anual y su relación con los cambios en el fotoperiodo. Particularmente, se han estudiado los neurotransmisores que regulan la secreción de hormonas reproductivas específicas, tales como la GnRH y la LH, de manera que se ha observado que en algunos aspectos los ovinos Mediterráneos podrían presentar mecanismos neuroendocrinos que regulan la actividad reproductiva de manera diferente a los ovinos del norte de Europa.

Sin embargo, hay una serie de hechos que nos hacen pensar que los mecanismos neuroendocrinos que controlan la actividad reproductiva en caprino y ovino son diferentes y no extrapolables de una especie a otra. En primer lugar, son muy escasos los trabajos que han tratado de estudiar los aspectos reproductivos en caprino y mucho menos en razas Mediterráneas; en segundo lugar, cuando se analiza la estacionalidad reproductiva se observan importantes diferencias entre ambas especies, como lo demuestran trabajos realizados por nuestro grupo en el año 2005 con la raza caprina Payoya, y en tercer lugar, se ha observado un diferente comportamiento en ambas especies, en lo que al control fotoperiódico de la reproducción se refiere, como es el

caso del anestro estacional, la fotorrefractoriedad a días largos y cortos, e incluso en la respuesta a los tratamientos fotoperiódicos difieren de una manera importante.

Desde hace algunos años se han realizado trabajos para estudiar y demostrar que el fotoperiodo es el principal factor que controla el patrón reproductivo estacional en la especie caprina. Igualmente se ha estudiado el efecto de la nutrición sobre el inicio y duración de la actividad reproductiva, encontrando este efecto más marcado en las razas poco estacionales como las Mediterráneas y las que se encuentran en las zonas del trópico; puesto que el papel sincronizador por el fotoperiodo no resulta ser tan intenso y puede ser fácilmente modificable por otros factores. Por eso, los mecanismos neuronales que regulan la secreción de LH, influidos por los cambios en el *feedback* negativo del estradiol sobre el eje hipotálamo-hipófisis, podrían resultar distintos en las razas Mediterráneas que en aquellas de altas latitudes.

La melatonina es un importante mediador de la reproducción por su papel en la respuesta a los efectos estimuladores e inhibidores de los días cortos y largos, respectivamente. En el caprino, el uso de implantes de melatonina no ha sido tan generalizado como en el caso del ovino, donde ha demostrado tener bastante utilidad a la hora de organizar el ritmo reproductivo anual de las explotaciones. La mayoría de los estudios con melatonina, en el caprino, se han realizado con razas más estacionales, pero en las razas Mediterráneas se suelen usar otros métodos de manejo como el efecto macho y los cambios en la alimentación.

En los ovinos y caprinos, la acción de los mecanismos neuronales responsables de la transducción de las señales fotoperiódicas a señales endocrinas no está completamente dilucidado. Además, diversos estudios sobre esta transmisión del mensaje fotoperiódico demuestran que no es de forma directa, sino que existen unos neurotransmisores responsables de estos cambios, como son los sistemas opioideos endógenos, dopaminérgicos, serotoninérgicos y aminoácidos excitatorios, cuyos efectos han sido estudiados en algunas razas ovinas. Sin embargo, no existe ningún trabajo que demuestre si el efecto de esos neurotransmisores actúa de la misma forma en el ganado caprino Mediterráneo.

Por lo tanto, el propósito de los trabajos presentados en la presente memoria, consiste en determinar cuál es el papel del fotoperiodo en la regulación de la reproducción en función del nivel de alimentación y cuáles son los mecanismos neuronales involucrados en el control de dicho ciclo reproductivo de la hembra caprina Mediterránea.

GLOSARIO DE TÉRMINOS Y ABREVIATURAS

GLOSARIO DE TÉRMINOS Y ABREVIATURAS

α -RE ₂	Receptor α de estradiol	CKI δ	Caseína kinasa 1 delta
3 ^{er} V	Tercer ventrículo	CKI ϵ	Caseína kinasa 1 epsilon
5-HTP	5-hidroxitriptófano	CL	Cuerpo lúteo
5HT _{2A}	Receptor serotoninérgico	CM	Cuerpo mamilar
5-HT	Serotonina (5-hidroxitriptamina)	CRH	Hormona liberadora de corticotropinas
A15	Núcleo dopaminérgico A15	CRY	Gen Criptocromo
5-HTPD	5-hidroxitriptófano descarboxilasa	CYP	Cyproheptadina
AAE	Aminoácidos excitatorios	DA	Sistema dopaminérgico
AANAT	arilalkilamina N-acetil-transferasa	DHA	Área hipotalámica dorsal
Ach	Acetilcolina	E ₂	Estradiol
AFMK	N-acetil-N-formil-5-metoxikynuramina	EM	Eminencia media
AHA	Área hipotalámica anterior	EOPs	Opioideos endógenos (<i>Endogenous Opioids Peptides</i>)
AHP	Área hipotalámica posterior	Frq	Gen <i>Frequency</i>
AMK	N-acetil-5-metoxikynuramina	FSH	Hormona Folículo Estimulante
AMPA	Propionato de α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol	GABA	Ácido gamma-aminobutírico (γ -aminobutírico)
AMPK	Cinasa activada por monofosfato de adenina (<i>AMP-activated protein kinase</i>)	GCS	Ganglio Cervical Superior
aMT6S	6-sulfatoxi-melatonina	GH	Hormona del crecimiento
ARC	Núcleo Arcuato	GHRH	Hormona liberadora de la hormona del crecimiento
ASMT	N-acetilserotonina metiltransferasa	GnRH	Hormona Liberadora de Gonadotropinas
AVPV	Área anterio- y periventricular	GPR54	<i>KiSS1-derived peptide receptor</i>
C	Carbono	HIOMT	hidroxiindol-O-metiltransferasa
Ca ⁺⁺	Calcio	HMV	Hipotálamo ventromedial
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico	HPM	Área pre-mamilar
CC	Condición corporal	IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1 (<i>Insulin-like growth factor 1</i>)

IML	Columna intermedio lateral de la espina dorsal	NPY	Neuropéptido Y
K ⁺	Potasio	OVX	Hembra ovariectomizada
Kainat	Receptor kainato	OVX+E ₂	Hembra ovariectomizada portadora de un implante de estradiol
Kiss	Kisspeptina	P4	Progesterona
LCR	Líquido Cefalorraquídeo	PACAP	Polipéptido activador de la adenilato ciclasa
L-DOPA	L-3-4-dihidroxifenilalanina	Per	Gen <i>Period</i>
LH	Hormona Luteinizante	pg	Picogramos
LHRH	<i>LH-Releasing hormone</i>	PGE ₂	Prostaglandina dinoprostona
mARN	Ácido ribonucleico mensajero	PGF _{2α}	Prostaglandina F2alfa
MBH	Hipotálamo mediobasal	POA	Área Preóptica
MEL	Melatonina	PV	Peso vivo
ml	miligramos	QOp	Quiasma óptico
NA	Noradrenalina	RE-α	Receptores estrogénicos-α
Na ⁺	Sodio	RCh	Área retroquiasmática
NAS	N-acetil-serotonina	RH	Hormonas liberadoras (<i>releasing hormones</i>)
NEFA	Ácidos grasos no esterificados	RP	Receso pineal
NGL	Núcleo geniculado lateral	SAM	S-adenosil metionina
NI/EM	Núcleo infundibular/eminencia media	SN	Secretoneurina
NMD	Núcleo medial dorsal	SNC	Sistema nervioso central
NMDA	N-metil-D,L-aspartico	T	Testosterona
NPM	Núcleo pre-mamilar	TNF-α	Factor de necrosis tumoral
NPV	Núcleo paraventricular	TPOH	Triptófano-5-hidroxilasa
NPO	Núcleo preóptico	VIP	Péptido vasoconstrictor intestinal
NSO	Núcleo supraóptico	VP	Vasopresina
NSQ	Núcleo supraquiasmático	vmPOA	Área preóptica ventromedial
NVM	Núcleo ventromedial	VMC	Vena magna cerebral o vena de Galeno

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.	LA ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA EN EL GANADO	
	CAPRINO	27
1.1.	INTRODUCCIÓN	27
1.2.	FISIOLOGÍA DEL CICLO SEXUAL CAPRINO.	28
1.2.1.	EL CICLO ESTRAL Y PERFILES HORMONALES.	28
1.2.2.	CONTROL NEUROENDOCRINO DEL CICLO ESTRAL Y SUS INTERRELACIONES.	32
1.2.2.1.	CONTROL HIPOTALÁMICO.	32
	- HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROPINAS (GnRH) 33	
1.2.2.2.	CONTROL HIPOFISIARIO.	40
	- HORMONA FOLÍCULO-ESTIMULANTE (FSH).....	41
	- HORMONA LUTEINIZANTE (LH).....	42
	- PROLACTINA	43
1.2.2.3.	CONTROL OVÁRICO.	45
	- HORMONAS ESTEROIDEAS.....	46
	<i>Progesterona</i>	48
	<i>Estradiol</i>	50
	- INHIBINA	53
2.	FOTOPERIODO, MELATONINA Y ESTACIONALIDAD	
	REPRODUCTIVA.....	57
2.1.	INTRODUCCIÓN.	57
2.2.	PAPEL DEL FOTOPERIODO EN LA REGULACIÓN DE LA ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA.....	58
2.2.1.	FOTOPERIODO Y REPRODUCCIÓN.....	58
2.2.2.	EL ANESTRO ESTACIONARIO.....	60
2.2.3.	LA FOTORREFRACTARIEDAD Y EL RITMO ENDÓGENO DE LA REPRODUCCIÓN	62
2.2.3.1.	RITMO ENDÓGENO DE REPRODUCCIÓN.....	62
2.2.3.2.	LA FOTORREFRACTARIEDAD	66
2.3.	LA MELATONINA.....	68
2.3.1.	INTRODUCCIÓN	68

2.3.2.	LA GLÁNDULA PINEAL.....	69
2.3.2.1.	POSICIÓN, MORFOLOGÍA Y ANATOMÍA.....	69
2.3.2.2.	VASCULARIZACIÓN.....	72
2.3.3.	TRANSMISIÓN DE LA SEÑAL FOTOPERIÓDICA.....	73
2.3.3.1.	DEL OJO A LA GLÁNDULA PINEAL.....	73
	- TRACTO RETINO-HIPOTALÁMICO.....	73
	- NÚCLEOS SUPRAQUIASMÁTICOS.....	75
2.3.3.2.	LOS GENES RELOJ (<i>CLOCK GENES</i>).....	75
2.3.4.	SÍNTESIS Y CATABOLISMO DE MELATONINA.....	78
2.3.4.1.	SÍNTESIS POR LA GLÁNDULA PINEAL.....	78
2.3.4.2.	OTRAS FUENTES DE SÍNTESIS DE MELATONINA.....	81
2.3.4.3.	DEGRADACIÓN DE LA MELATONINA.....	83
2.3.5.	SECRECIÓN DE LA MELATONINA.....	85
2.3.5.1.	RITMO DE SECRECIÓN.....	85
2.3.5.2.	VÍAS DE SECRECIÓN.....	89
2.3.5.3.	FACTORES HORMONALES QUE AFECTAN SU SECRECIÓN.	91
2.3.6.	LUGAR Y MODO DE ACCIÓN DE LA MELATONINA.....	91
2.4.	PLASTICIDAD NEURONAL EN LA ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA.....	94
3.	IMPLICACIÓN DE LOS SISTEMAS NEURONALES EN EL CONTROL DE LA REPRODUCCIÓN.....	99
3.1.	INTRODUCCIÓN.....	99
3.2.	OPIOIDEOS ENDÓGENOS.....	100
3.3.	SISTEMA DOPAMINÉRGICO.....	103
3.4.	SISTEMA SEROTONINÉRGICO.....	108
3.5.	SISTEMA NORADRENÉRGICO.....	110
3.6.	AMINOÁCIDOS EXCITATORIOS.....	112
3.7.	NEUROPEPTIDO Y.....	117
3.8.	COROLARIO.....	120

4.	INFLUENCIA DE LA NUTRICIÓN SOBRE EL CONTROL DE LA REPRODUCCIÓN.	123
4.1.	INTRODUCCIÓN.	123
4.2.	EFFECTOS DE LA NUTRICIÓN A LARGO PLAZO	125
4.3.	EFFECTOS DE LA NUTRICIÓN A MEDIO PLAZO	129
4.4.	EFFECTOS DE LA NUTRICIÓN A CORTO PLAZO.....	134
4.5.	MEDIADORES ENTRE LA NUTRICIÓN Y LA REPRODUCCIÓN .	139

1. LA ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA EN EL GANADO CAPRINO

1.1. INTRODUCCIÓN

La estacionalidad reproductiva es una estrategia adaptativa mediante la cual los animales silvestres y algunos domésticos reducen los efectos de los cambios anuales de temperatura y disponibilidad de alimento (Karsch *et al.*, 1984). El motivo de esta estacionalidad es que la actividad reproductiva tenga lugar durante un periodo concreto para que los partos se produzcan en el momento más adecuado del año y que las crías nazcan y se desarrollen cuando las condiciones medioambientales sean las más favorables. De esta manera, las especies estacionales adaptan su periodo de actividad reproductiva en función de la duración de su gestación para que la época de los partos sea siempre en primavera (Hafez, 1952). Esta estacionalidad se mantiene en la mayoría de las razas ovinas y caprinas originarias de latitudes medias y altas ($>35^\circ$; Malpoux *et al.*, 1996), en las que el periodo de actividad reproductiva se corresponde con el otoño-invierno (días cortos o decrecientes) y el periodo de inactividad reproductiva con la primavera y el verano (días largos o crecientes).

La especie caprina se define como una “especie de días cortos”, pues son éstos los que estimulan su actividad reproductiva, mientras que los días largos la inhiben. Este hecho conlleva que en nuestras latitudes la cabra presente un periodo de actividad reproductiva entre el mes de agosto y enero (Gómez-Brunet *et al.*, 2003; Zarazaga *et al.*, 2005), y que incluso los machos tengan una importante reducción de su líbido durante la primavera independientemente del nivel de alimentación (Walkden-Brown *et al.*, 1994a,b; Delgadillo *et al.*, 2004a; Zarazaga *et al.*, 2009a). Sin embargo, en bovinos de leche y porcinos, el proceso de domesticación ha conducido a la pérdida casi total de esta forma de reproducción.

Este ciclo anual de reproducción en los pequeños rumiantes está ligado al control de la actividad neuroendocrina gonadotropa por uno o varios factores medioambientales, siendo el factor medioambiental más repetible, de año en año, la duración del número de horas de luz diarias o fotoperiodo. Es por tanto lógico que sea el principal factor externo que determina el comienzo o la finalización de la época de actividad reproductiva (Bissonnette, 1941; Yeates, 1949; Karsch *et al.*, 1984; Robinson *et al.*, 1985; Chemineau *et al.*, 1988; Maeda *et al.*, 1988; Valencia *et al.*, 1990; Santa María *et al.*, 1990). Como consecuencia, esta estacionalidad reproductiva, produce

importantes variaciones a lo largo del año en la disponibilidad de sus productos, principalmente carne y leche, con épocas de exceso o de escasez de oferta, lo que provoca, al mismo tiempo, importantes variaciones en su precio.

1.2. FISIOLÓGÍA DEL CICLO SEXUAL CAPRINO

1.2.1. EL CICLO ESTRAL Y PERFILES HORMONALES

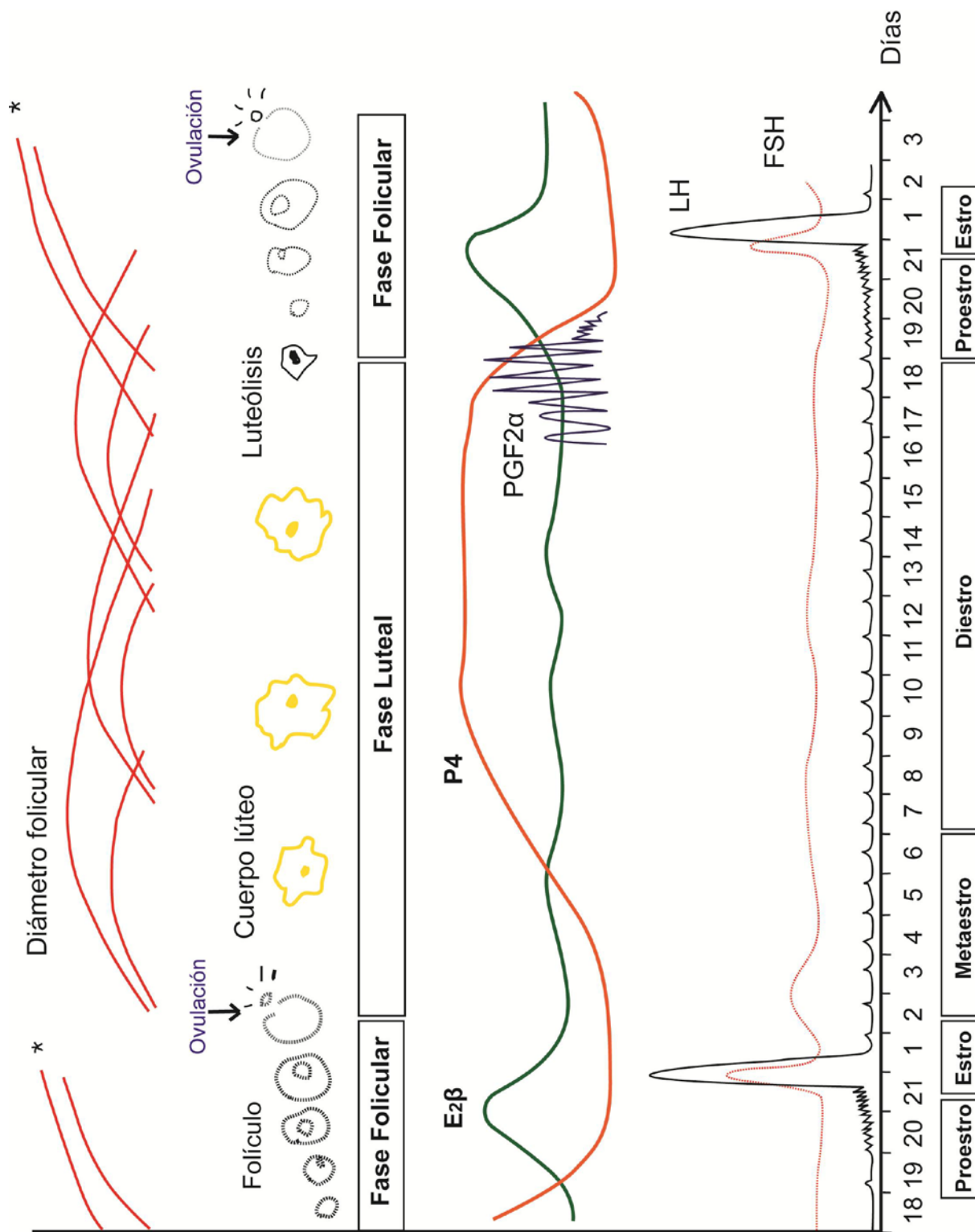
El ciclo sexual o estral comprende los diferentes cambios morfológicos y fisiológicos que ocurren en el ovario y tracto genital de la cabra no gestante que controlan la expresión del celo (Fatet *et al.*, 2010) y cuyo principal objetivo es la preparación de gametos femeninos funcionales y procurar las condiciones adecuadas que permitan su fecundación y nidación en el caso de que se produzca la gestación. Estos cambios se suceden a intervalos más o menos regulares que están asociados a la estacionalidad, definiendo de esta forma un periodo de anestro o inactividad reproductiva y otro de actividad sexual (Chemineau y Delgadillo, 1994).

A lo largo de la estación reproductiva, las hembras pueden pasar por varios ciclos de celo sucesivos. El intervalo de tiempo entre celo y celo en la cabra suele ser de 20 a 21 días, aunque esa duración es variable, habiéndose observado en esta especie ciclos cortos (de 3 a 9 días) y ciclos largos (de 26 a 34 días) (Sánchez, 1981; Valencia y Sánchez, 1986; Chemineau *et al.*, 1992a). En un estudio realizado en la raza Alpina, el 77% de las cabras presentaron un ciclo entre 17 a 25 días, el 14% presentó una media de 8 días y el 9% de 39 días de duración (Baril *et al.*, 1993).

El ciclo estral se divide clásicamente en dos fases: la fase folicular que abarca la fase de *proestro* y *estro* y la fase luteal que comprende el *metaestro* y el *diestro* (Figura 1). A lo largo de este ciclo, el ovario sufre una serie de cambios morfológicos (reclutamiento, crecimiento folicular y maduración folicular) y fisiológicos (regulación endocrina) que culminan en la ovulación (Fatet *et al.*, 2010).

La fase folicular, tiene una duración de unos 5-6 días (se corresponden con los días 18-21 de un ciclo y 1-2 del ciclo siguiente) (Figura 1). Esta fase se divide en *proestro*, que corresponde al periodo de reclutamiento, selección y dominancia folicular, y que se caracteriza por unas crecientes concentraciones de estradiol, producidas por los folículos ováricos en desarrollo, y que desencadena la salida en celo de la hembra. Esta fase que se conoce como *estro*, se corresponde con el día 0 del ciclo

Figura 1. Representación esquemática de los diferentes eventos fisiológicos que ocurren durante el ciclo estral de la cabra: patrones de desarrollo folicular, ciclo ovárico y regulaciones endocrinas [adaptado de Baril *et al.* (1993) y Evans (2003)]



y se caracteriza por unas concentraciones máximas de 17β estradiol en sangre producidas en los folículos dominantes; finalizando con la ovulación (Fatet *et al.*, 2010).

Durante la fase folicular, la hormona folículo estimulante (FSH), secretada por la hipófisis, estimula el crecimiento de los folículos. En esta fase, se producen pequeños picos de secreción de gonadotropinas y estrógenos, que corresponden a los diferentes periodos del crecimiento folicular. De éstos folículos existentes, sólo 2 ó 3 son los que alcanzan los 4 mm de diámetro y son seleccionados para entrar en la fase dominante. Bajo la influencia de la LH, estos folículos alcanzan el estado preovulatorio (6-9 mm), mientras que los folículos subordinados degeneran por un mecanismo de atresia folicular. Este hecho conlleva un incremento periférico de las concentraciones de 17β estradiol, secretado por los folículos de mayor tamaño, que induce el comportamiento del estro y actúa a través de un *feedback* positivo sobre el eje gonadotropo. En la cabra, la duración del periodo de receptividad sexual o celo es de 24 a 48 horas (un promedio de 36 horas). Durante este periodo, se produce el pico preovulatorio de LH que aparece entre las 7 a 18 horas después de iniciado el celo y alcanza niveles de esta hormona de 20 a 100 ng/ml (Valencia y Bustamante, 1986) y que provocará la ovulación 20-26 horas después, produciendo también la luteinización de las células foliculares. El momento exacto de la ovulación, una vez iniciado el celo, varía de 9 a 37 horas, coincidiendo generalmente con el final del periodo del celo (Fatet *et al.*, 2010).

La $\text{PGF}_{2\alpha}$ existente en la membrana folicular ovulatoria desintegra las células de la teca y la túnica albugínea, activando el proceso de colagenolisis, vasoconstricción y apoptosis (o muerte celular) en la superficie del folículo preovulatorio. La conversión de PGE_2 en $\text{PGF}_{2\alpha}$ en la teca, por acción de la enzima 9-keto- PGE_2 -reductasa que es dependiente de la secreción de progesterona folicular (Murdoch *et al.*, 1986; 1991; 1993; Murdoch y Ferris, 1988; Murdoch y Cavender, 1989) Estudios realizados usando indometacina (inhibidor de prostaglandinas) han demostrado que el incremento en la secreción de prostaglandinas es necesario para la ruptura folicular ya que provocan la liberación de la enzima $\text{TNF-}\alpha$ (*factor de necrosis tumoral-}\alpha*) que se encuentra en la pared de las células tecales endoteliales y produce un debilitamiento y adelgazamiento de la pared apical folicular al acercarse la ovulación, proceso conocido como colagenólisis (Johnson *et al.*, 1999; Murdoch y Lund, 1999). El rol potencial de la PGE_2 es menos evidente que el de la $\text{PGF}_{2\alpha}$. Es posible que contrarreste en forma transitoria el

efecto de vasoconstricción de la $\text{PGF}_{2\alpha}$, promoviendo un edema folicular y distensión de la membrana folicular (Murdoch *et al.*, 1983; Murdoch y Myers, 1983).

Este estrés provocado por la acción de las $\text{PGF}_{2\alpha}$ a nivel de la membrana folicular, sería el causante de su ruptura, provocando que el ovocito de segundo orden u óvulo maduro, junto a la zona pelúcida y células de la granulosa, sea liberado al exterior (Murdoch *et al.*, 1986; Murdoch *et al.*, 1997; Johnson *et al.*, 1999). La PGE_2 parece estar implicada de igual modo en el proceso de dispersión de las células de la granulosa (Eppig, 1981), maduración del oocito (Downs y Longo, 1983) y proceso de luteinización (Armstrong, 1981).

En ciertos casos, sobre todo en razas ovinas y caprinas estacionales (Rosa y Bryant, 2003; Fatet *et al.*, 2010) ocurren ovulaciones sin celo aparente (silenciosas), y de forma inversa, celos anovulatorios. Estos estados son más frecuentes durante los periodos de transición entre la época de anestro y la estación reproductiva (Land *et al.*, 1973; Ortavant *et al.*, 1988). A nivel endocrino, es sabido que durante el anestro estacionario se dan ciclos de crecimiento y regresión foliculares e incluso se han encontrado algunos folículos tan grandes como los que se presentan en la fase folicular del ciclo estral (Hutchinson y Robertson, 1966; Matton *et al.*, 1977; Webb y Gauld, 1985). A lo largo del anestro estacional, los folículos producen esteroides y muchos de los efectos de *feedback* positivos y negativos de los esteroides sobre la secreción de LH continúan como si estuviera en época reproductiva y son los que provocan esos estados de ovulaciones sin celo (Gordon, 1997).

Una vez finalizada la fase folicular, comienza la fase luteal que se inicia 5 días después de iniciado el estro y cuya duración es de unos 16-18 días. Esta fase se divide en *metaestro*, cuando las concentraciones periféricas de progesterona comienzan a aumentar y en *diestro*, cuando las concentraciones de progesterona se mantienen altas hasta que ocurre la luteolisis (Fatet *et al.*, 2010). Después de la ovulación el folículo ovárico se transforma en el cuerpo lúteo, donde se produce la progesterona (P_4); esta hormona influye sobre el hipotálamo para reducir la secreción de GnRH e impedir un nuevo celo y ovulación. La progesterona desempeña un papel esencial de retroalimentación o *feedback* negativo en la regulación de las gonadotropinas durante el ciclo, prepara el endometrio para la implantación y mantiene la gestación. En caprino es indispensable contar con la presencia de este cuerpo lúteo (CL) funcional para el

mantenimiento de la gestación (Hunzicker-Dunn y Mayo, 2006). Tras la ovulación, las concentraciones de progesterona se incrementan rápidamente desde el día 4 al día 13.

Si no hay fecundación o el ciclo no ha sido fértil, la función luteal decrece como consecuencia de la regresión del cuerpo lúteo o *luteólisis* debido a la liberación de prostaglandinas ($\text{PGF}_{2\alpha}$) por parte del útero, y se prepara al ovario para el inicio de un nuevo ciclo sexual (Chemineau *et al.*, 1988; Baril *et al.*, 1993).

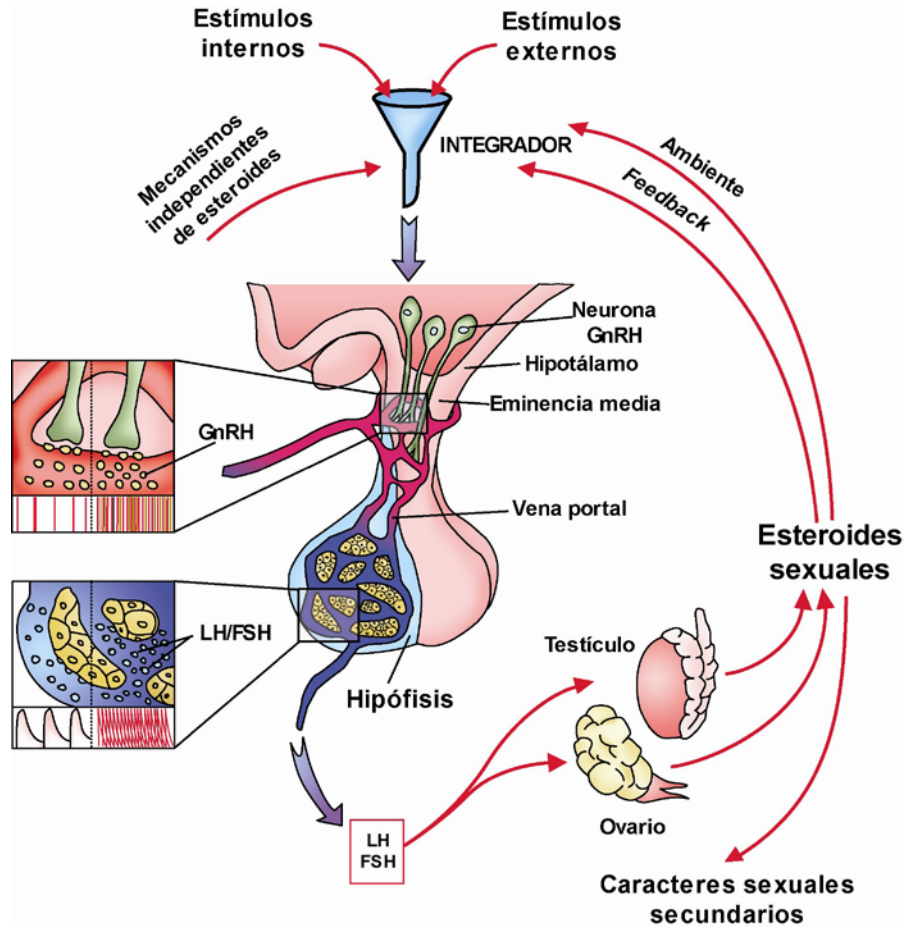
1.2.2. CONTROL NEUROENDOCRINO DEL CICLO ESTRAL Y SUS INTERRELACIONES

1.2.2.1. CONTROL HIPOTALÁMICO

El hipotálamo es una región del cerebro que controla un gran número de funciones corporales (Figura 2). Se sitúa en la zona media de la base cerebral rodeando a la porción ventral del tercer ventrículo (Lincoln, 1992). Limita cranealmente con el quiasma óptico, caudalmente con los cuerpos mamilares y dorsal y ventralmente con el tálamo y la eminencia media, respectivamente (Figura 3). Su importancia radica en su función como regulador nervioso y endocrinológico, es decir, funciona como transductor, cambiando la información neuronal a humoral y sirviendo de intermediario entre el sistema nervioso central (SNC) y la hipófisis (Malven, 1993).

El hipotálamo se compone de neuronas que funcionan como transductores celulares, que presentan funciones tanto endocrinas como neuronales, que se agrupan en masas conocidas como núcleos, y entre ellos se establece una compleja red de fibras mielínicas y amielínicas. Estos núcleos tienen diversas funciones, contribuyendo a la modulación funcional de muchos procesos biológicos, por ejemplo, en la parte craneal del hipotálamo se encuentran los núcleos que modulan la temperatura corporal (Domanski *et al.*, 1991) y la síntesis de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), de la cual se hablará posteriormente. Pero no es, ni mucho menos, la única sustancia producida a este nivel. Así, otros importantes péptidos secretados son la hormona liberadora de tirotrópina (TRH), la hormona liberadora de corticotropina (CRH), la hormona liberadora de la hormona del crecimiento o GH (GHRH) o la somatostatina (hormona inhibidora de la secreción de GH).

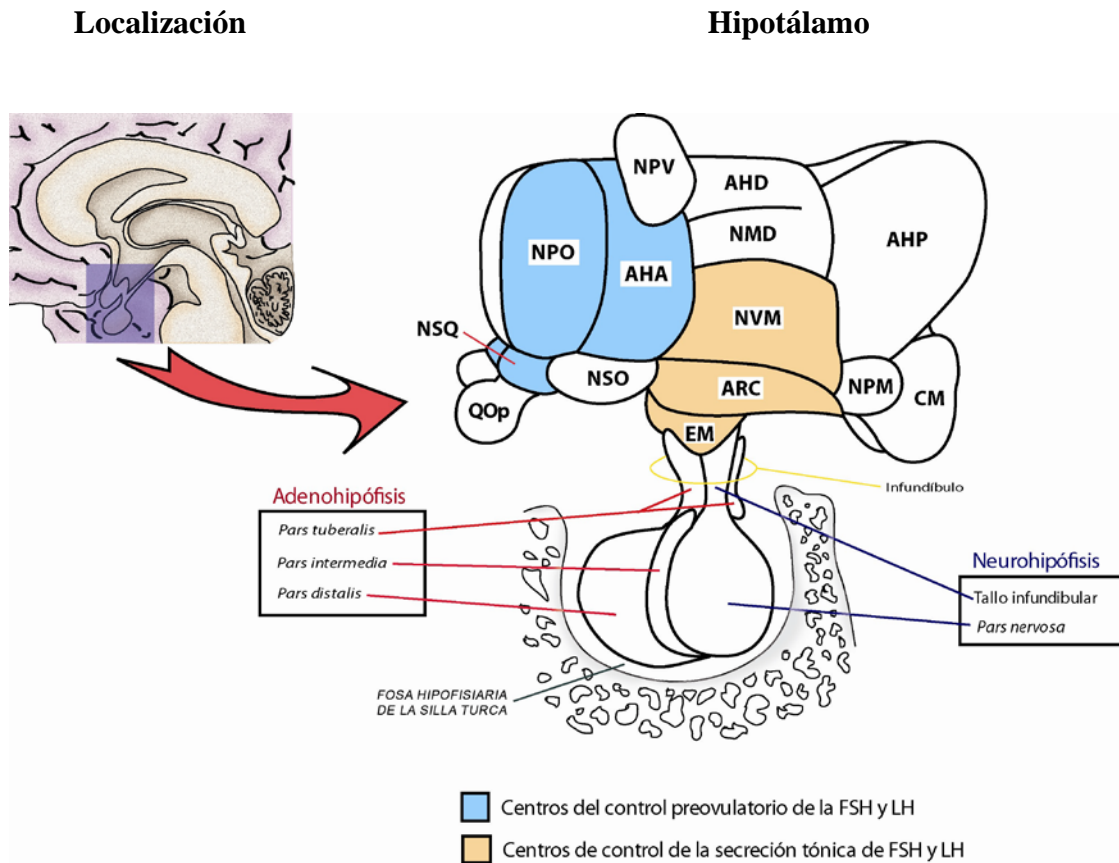
Figura 2. Esquema representativo del eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal. El hipotálamo actúa como un centro integrador de señales, en respuesta a las cuales secreta una serie de hormonas liberadoras a la hipófisis, regulando la secreción de hormonas hipofisiarias (adaptado de Gutiérrez, 2009).



- HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROPINAS (GnRH)

La GnRH (*Gonadotrophin-Releasing Hormone*) o LHRH (*LH-Releasing Hormone*) es la hormona más importante de las que se secretan en el hipotálamo desde un punto de vista reproductivo. Es un decapeptido perteneciente al grupo de las hormonas liberadoras (*Releasing Hormones, RH*), que como tales, ejercen su acción uniéndose a receptores específicos localizados en la superficie de células “diana”, donde se liberará la hormona deseada. Tras esta unión específica, se activa la enzima adenilciclase, que convierte el ATP en AMP cíclico (cAMP) que actúa como mensajero intracelular provocando que la membrana celular se vuelva más permeable al ión Ca^{++} . Este ión incrementa la contracción de los miofilamentos que dirigen los gránulos que contienen la hormona hacia la periferia y producen su liberación al exterior (McDonald, 1989).

Figura 3. Dibujo esquemático mostrando el hipotálamo y la hipófisis con sus partes. ARC, núcleo arcuato; AHA, área hipotalámica anterior; DHA, área hipotalámica dorsal; NMD, núcleo medial dorsal; EM, eminencia media; CM, cuerpo mamilar; NPM, núcleo pre-mamilar; QOp, quiasma óptico; NPV, núcleo paraventricular; NPO, núcleo preóptico; AHP, área hipotalámica posterior; NSQ, núcleo supraquiasmático; NSO, núcleo supraóptico; NVM, núcleo ventromedial [adaptado de Lincoln (2002) y Gutiérrez (2009)].



Las neuronas GnRH tienen su origen en la placa embrionaria olfatoria (Schawanzel-Fukuda y Pfaff, 1989) y, durante el desarrollo fetal, migran hacia el cerebro, ocupando principalmente dos núcleos de la parte más ventral del diencéfalo que son: el hipotálamo mediobasal (primates y humanos) y el área preóptica (POA) en el caso de roedores y ovino. Su localización exacta puede variar entre especies. Estas neuronas envían sus axones hacia la parte externa de la eminencia media, que se localiza en la base del hipotálamo, donde la GnRH es liberada a los capilares del sistema portal-hipofisiario y por la vía del tracto septo-óptico infundibular alcanza las células gonadotropas de la hipófisis anterior o adenohipófisis donde estimula la secreción de las siguientes gonadotropinas: la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) (Karsch *et al.*, 1984; Barrell *et al.*, 1992). Los lugares donde

la GnRH tiene receptores, también llamadas áreas blanco, involucran además al sistema límbico, el centro gris del mesencéfalo y al sistema olfatorio, este último, involucrado con el comportamiento sexual por la detección de feromonas (Goodman y Gilman, 1990).

Una vez liberadas, las gonadotropinas se dirigen hacia las gónadas para promover el crecimiento folicular y la producción de estradiol (E_2), que a su vez estimula la secreción cíclica de GnRH y, como consecuencia, la liberación de LH a nivel hipofisiario. Estas acciones desencadenan la ovulación a nivel del ovario, lo que determina los acontecimientos del ciclo sexual durante la estación reproductiva (Clarke y Cummings, 1985; Evans *et al.*, 2003). La liberación de GnRH también está controlada por factores tanto internos como externos entre los que destacan el metabolismo, la sensibilidad a los esteroides gonadales, la melatonina, la nutrición, el desarrollo, el fotoperiodo, entre otros (Legan y Karsch, 1980). Estos factores causan una clara reducción en la secreción de gonadotropinas durante el anestro estacional (Henniawati *et al.*, 1995; Zarazaga *et al.*, 2005), lo que podría reflejarse en cambios en la acción del estradiol sobre la liberación de GnRH (Karsch *et al.*, 1993).

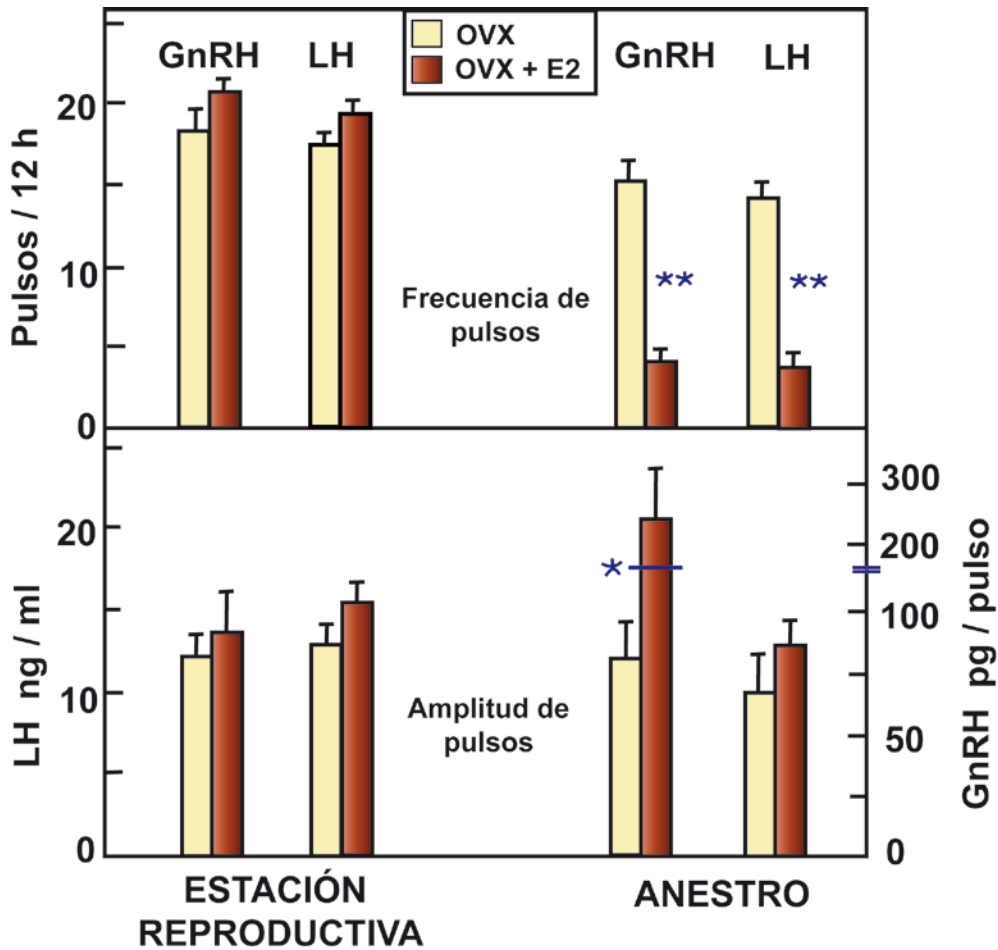
La secreción de GnRH es de tipo pulsátil, y la frecuencia y amplitud de los pulsos varía a lo largo del ciclo sexual determinando sus acontecimientos durante la estación reproductiva. Debido a que las concentraciones de GnRH sólo pueden ser medidas a nivel de la circulación portal hipotálamo-hipofisiaria, siempre ha significado una dificultad el momento de explicar la naturaleza de la secreción de la GnRH (Barrell *et al.*, 1992). Dicha secreción está inhibida durante la fase luteal del ciclo estral a causa de los elevados niveles de progesterona producida por el cuerpo lúteo (Karsch *et al.*, 1987), situación que cambia tras la luteolisis, ya que la brusca caída de los niveles plasmáticos de progesterona provoca un aumento en los pulsos de GnRH y LH (Clarke *et al.*, 1987), estimulando la secreción de estradiol en la fase folicular que inicia el pico preovulatorio de GnRH y LH, y que desencadena la ovulación (Clarke, 1988; Moenter *et al.*, 1991) (como ya se describió en el apartado anterior). La frecuencia de pulsos de GnRH, y por lo tanto de LH, también se reducen considerablemente durante el periodo de anestro estacionario, llegando a presentarse un ritmo de un pulso cada 12 horas (Barrell *et al.*, 1992). Esta baja frecuencia no se debe a una alteración en la capacidad neurosecretora de la GnRH, ya que la ovariectomía conlleva un claro aumento de la

pulsatilidad de GnRH en el periodo de inactividad sexual (Karsch *et al.*, 1993) (Figura 4).

Dado que las concentraciones basales de estradiol, como las de la fase folicular, suprimen la secreción pulsátil de GnRH durante el anestro y no en estación sexual (Moenter *et al.*, 1990; Barrel *et al.*, 1992; Karsch *et al.*, 1993), parece confirmar el hecho de que la variación estacional de la frecuencia de pulsos de GnRH, y por lo tanto de LH, es consecuencia de un cambio en la respuesta hipotalámica al *feedback* negativo del estradiol en función del fotoperiodo prevalente (Karsch *et al.*, 1980; Webster y Haresign, 1983). Por ello, las hembras ovariectomizadas y portadoras de un implante de estradiol (OVX+E₂) es un modelo experimental ampliamente utilizado para realizar trabajos en los que se pretende demostrar la estacionalidad reproductiva de la hembra. El motivo es que, este modelo experimental refleja claramente los cambios en la sensibilidad del eje hipotálamo-hipófisis al estradiol, ya que dichos implantes logran unas concentraciones constantes de la hormona a lo largo del año (Legan *et al.*, 1977; Goodman *et al.*, 1981). A su vez, otros sistemas de neuronas (catecolaminérgicas y opioidérgicas) participan en la integración de la información del medio externo (luz, temperatura, olores, interacciones sociales) e interno (concentración de esteroides) regulando la secreción de GnRH (Kalra y Kalra, 1984).

En la mayoría de los estados fisiológicos de la vida reproductiva se ha podido demostrar una relación temporal entre la señal hipotalámica (pulsos de GnRH) y la respuesta hipofisiaria (pulsos de LH) (Clarke y Cummings, 1982). Sin embargo, en algunas situaciones especiales en las que la frecuencia de pulsos de GnRH se dispara, por ejemplo en la descarga preovulatoria, la naturaleza pulsátil de la LH puede quedar bloqueada debido a un incremento de sus niveles basales (Caraty *et al.*, 1987). A pesar de que se acepta esta relación, aún no está claro cuál es el papel de la GnRH sobre la descarga preovulatoria de LH, y por lo tanto, sobre la ovulación. Existen algunas teorías para explicar esta situación, por ejemplo la teoría del modelo *determinístico* indica que es necesario que exista una descarga previa de GnRH para inducir el pico preovulatorio de LH y por lo tanto la ovulación.

Figura 4. Frecuencia de pulsos de GnRH y LH en ovejas ovariectomizadas (OVX) u ovariectomizadas e implantadas con estradiol (OVX+E₂) durante la estación sexual y el anoestro estacionario (adaptado de Karsch *et al.*, 1993).



Otra de las teorías propuestas, llamada modelo *permissivo*, dice que ese aumento de GnRH no es necesario para que ocurra el pico preovulatorio de LH. Ambas teorías han sido confirmadas mediante trabajos, por lo que es posible que ambas coexistan en la formación de ese pico de LH. Karsch *et al.* (1997) afirman que para que sea posible esta descarga preovulatoria de LH es necesario que se dé un aumento en la secreción de GnRH, de manera intensa y continuada a lo largo de toda la descarga de LH, de tal forma que confirma lo que plantea el modelo *determinístico*. Además, ese incremento de GnRH es estimulado por el estradiol, y se ha comprobado que la cantidad necesaria de GnRH para producir la ovulación es en realidad mucho menor que la secretada. De igual forma, existen trabajos que confirman un aumento de la sensibilidad hipofisiaria

antes del pico de LH, confirmando así lo que dice la teoría *permissiva* (Brooks y McNeilly, 1996).

Por otro lado, diferentes estudios han mostrado que existe un marcado cambio estacional en los efectos del *feedback* negativo del estradiol sobre la secreción tónica de GnRH y LH, hecho que ha sido demostrado inicialmente en ovejas OVX + E₂ (Karsch *et al.*, 1973) y en cabras (Zarazaga *et al.*, 2005; Duarte *et al.*, 2008). De este modo, durante la estación reproductiva, se ha confirmado que el uso de dosis bajas de estradiol no tiene efecto inhibitorio sobre la liberación pulsátil de GnRH, mientras que durante el anestro, el mismo tratamiento, produce una profunda reducción en la frecuencia de pulsos de GnRH (Karsch *et al.*, 1993). Igualmente, en éste trabajo se ha demostrado la relación entre la secreción de GnRH y la LH durante el anestro, de modo que la alteración que se produce durante la época de inactividad sexual en el *feedback* negativo del estradiol sobre la secreción de LH se lleva a cabo a través de una reducción en la frecuencia de liberación hipotalámica de GnRH, más que por descenso en la amplitud de los pulsos o en la capacidad de respuesta de la hipófisis a la secreción de GnRH (Karsch *et al.*, 1993).

Durante los últimos años se han venido realizando estudios en la especie ovina para determinar cuáles son los mecanismos que intervienen en la transmisión del *feedback* negativo del estradiol al sistema GnRH así como la del funcionamiento de esa compleja red neural (Chemineau *et al.*, 2010; Goodman *et al.*, 2010). Es sabido que en la oveja, la actividad dopaminérgica inhibe la pulsatilidad de la GnRH probablemente al final de esa red neuronal, a nivel de la eminencia media y el núcleo arcuato (Thiéry *et al.*, 1989; Vigiúé *et al.*, 1997), a través de los receptores dopaminérgico D₂ (Bertrand *et al.*, 1999). Considerables evidencias respaldan la hipótesis de que las neuronas dopaminérgicas (DA) del núcleo A15 en el área retroquiasmática (RCh) del hipotálamo son probablemente un núcleo clave intermedio entre las células vinculantes del estradiol y las neuronas GnRH localizadas en el área preóptica ventral del cerebro (Thiéry *et al.*, 1989, 1995; Gallegos-Sánchez *et al.*, 1997; Anderson *et al.*, 2001; Goodman *et al.*, 2010).

Los cambios estacionales en el transporte de esteroides de las zonas periféricas hacia el cerebro, vía cambios en la permeabilidad de membrana de la barrera hemato-cerebral, podrían ser responsables de parte de este mecanismo (Thiéry y Malpoux, 2003; Thiéry *et al.*, 2006). Pero la parte principal de este fenómeno probablemente tiene lugar

en varias áreas hipotalámicas específicas previamente identificadas o conteniendo receptores de estradiol. Estudios realizados por Meyer y Goodman (1985; 1986) demostraron que las neuronas del núcleo dopaminérgico A15, que se localiza en el RCh, del cual se hablará en capítulos posteriores, son estimuladas por el estradiol e inhiben la secreción de GnRH durante el anestro, situación que no ocurre en la época reproductiva. Debido a que estas neuronas del núcleo A15 no contienen los receptores estrogénicos- α (RE- α), es probable que otras neuronas que contienen receptores RE- α envíen proyecciones aferentes al núcleo A15 estimulándolas cuando las concentraciones de estradiol aumentan durante el anestro. De este modo, estudios farmacológicos y anatómicos, realizados en ovino, han identificado dos áreas neuronales, donde el estradiol inhibe la secreción de LH durante el anestro por medio del sistema dopaminérgico: el RCh y el área preóptica ventromedial (vmPOA) (Gallegos-Sánchez *et al.*, 1997; Anderson *et al.*, 2001; Hardy *et al.*, 2003). Sin embargo, otras áreas (área medial y lateral del POA y área ventromedial del hipotálamo) no ejercen ningún efecto en la inhibición de la secreción de la LH por el estradiol durante el anestro (Gallegos-Sánchez *et al.*, 1997). Basado en estudios similares, se ha demostrado que las células que contienen receptores RE- α , localizadas principalmente en el POA, tienen diferentes neurotransmisores y principalmente del gamma-aminobutírico (γ -aminobutyric acid o GABA) y del glutamato. Éstos actúan de manera aferente controlando la actividad del núcleo A15 durante el anestro estacionario con el estradiol inhibiendo la producción de GABA y estimulando la producción de glutamato durante este periodo del año, combinación que permite la activación de las neuronas del núcleo A15, inhibiendo la frecuencia de pulsos de GnRH (Herbison *et al.*, 1993; Bogusz *et al.*, 2008; Goodman *et al.*, 2010).

Estudios recientes han demostrado la existencia de otros mecanismos centrales que participan en el control de la secreción pulsátil de GnRH. La “plasticidad neuronal”, llamada también plasticidad neural o sináptica, se refiere a los cambios en la red neuronal de adhesión de las moléculas cuando éstas establecen comunicación, y que modula la percepción de los estímulos con el medio, tanto de entrada como de salida, y ha sido demostrada su existencia en las neuronas GnRH (Lehman *et al.*, 2002). Estudios realizados a nivel del área preóptica, alrededor de la periferia de los cuerpos celulares que contienen la GnRH, mostraron que la expresión de las moléculas de GnRH, a este nivel, fue más activo durante la época reproductiva que en el anestro (Viguié *et al.*,

2001). Además, se han descrito modificaciones en la plasticidad neuronal de las células del núcleo A15 en el cambio estacional que se produce al pasar de la estación reproductiva al anestro estacionario. Esta plasticidad es dependiente de las hormonas tiroideas, sin embargo, la plasticidad de las neuronas GnRH es independiente de las tiroideas. Todo ello indica que los cambios estacionales de las neuronas GnRH, por sí solos, no son suficientes para iniciar el anestro estacionario, sino que la plasticidad de las neuronas del núcleo A15 median el efecto del *feedback* negativo del estradiol y contribuyen al inicio del periodo de inactividad reproductiva (Adams *et al.*, 2006).

Otro factor recientemente descubierto e importante a considerar está referido al rol estimulador de la kisspeptina y su receptor GPR54 (*KiSS1-derived peptide receptor*) en el control estacional y fotoperiódico de la pulsatilidad de la GnRH/LH, y cuyas interacciones serán vistas más adelante en esta revisión (Clarke *et al.*, 2009a; 2009b; Smith *et al.*, 2009; Clarke y Smith, 2010; Chalivoix *et al.*, 2010; Chemineau *et al.*, 2010).

1.2.2.2. CONTROL HIPOFISIARIO

La hipófisis o glándula pituitaria (ver Figura 3) es un órgano de forma redondeada localizado debajo del hipotálamo, en la base del cráneo, en una depresión del hueso esfenoides conocido como “silla turca”, y por los lados y por arriba está en contacto con la duramadre craneal y la médula espinal, por lo tanto, separada de todas las formaciones que la rodean, excepto del hipotálamo. En esta glándula se pueden distinguir dos partes importantes:

- La adenohipófisis (lóbulo anterior), compuesta principalmente de células secretoras de hormonas proteicas. Pueden distinguirse a su vez tres partes: *pars anterior (pars distalis)*, *pars intermedia* y *pars tuberalis*. Las células gonadotropas se localizan en su estructura y producen la hormona folículo estimulante (FSH) y la luteinizante (LH), ambas moduladas por la actividad de la GnRH (Malven, 1993). También en esta área se hallan las células lactotropas, encargadas de la secreción de prolactina, localizadas en la *pars anterior* (Stirland *et al.*, 2001; Romanowicz *et al.*, 2004)
- La neurohipófisis (lóbulo posterior), se puede dividir en *pars eminens* y *pars nervosa*, aunque esta última se incluye dentro del infundíbulo del hipotálamo,

siendo conocida como eminencia media. Es considerada como una extensión del hipotálamo ya que se compone de los axones de las neuronas hipotalámicas pertenecientes a los núcleos paraventricular y supraóptico. En ella se almacenan dos hormonas producidas en el hipotálamo: la oxitocina y la vasopresina.

Existe una tercera porción que es el tallo hipofisario, ubicado entre la *pars eminens* y la *pars nervosa*, y rodeado por la misma *pars tuberalis* de la adenohipófisis. De hecho, en las especies animales el hipotálamo y la hipófisis forman un complejo fisiológico importante para la síntesis y secreción de hormonas peptídicas, lo que contribuye al control de diversas actividades como son el desarrollo corporal, a nivel gonadal el control del ciclo estral, a nivel orgánico la capacidad de adaptación a los constantes cambios que se presentan durante el día, la secreción láctea, excreción renal y otras muchas actividades (Malven, 1993).

- **HORMONA FOLÍCULO-ESTIMULANTE (FSH)**

La FSH, también llamada folitropina, es una glucoproteína con un peso molecular de 32.000 Da y con una vida media entre 2 y 4 horas. Consiste en 2 subunidades distintas: la *subunidad α* , que es compartida con la hormona luteinizante (LH), la gonadotropina coriónica humana (hCG) y por la hormona estimulante del tiroides (TSH) y la *subunidad β* . La FSH es producida por las células gonadotropas de la hipófisis anterior, y su síntesis y secreción está regulada por factores hipofisarios, gonadales y neurales (Padmanabhan *et al.*, 2002). La FSH está sometida al control hipotalámico a través de la secreción de la GnRH, aunque no se encuentra tan ligada a esta hormona como la LH, ya que a diferencia de esta última, la secreción de FSH no es pulsátil, más bien se ha puesto de manifiesto la existencia de un ritmo endógeno en su secreción, produciéndose en forma de “olas”, aproximadamente cada 6 días (Bister y Paquay, 1983).

La principal función de la FSH es estimular el crecimiento y la maduración de nuevas generaciones de folículos, además permite la adquisición de la capacidad enzimática precisa para la luteinización y la expresión de los receptores de LH (Heckert y Griswold, 2002). Su papel se pone de manifiesto durante la fase folicular al participar en la selección y en el desarrollo del folículo dominante (donde el número de células de la granulosa se incrementa de aproximadamente 1×10^6 células en el momento de la

selección a más de 50×10^6 células en el estado preovulatorio) (Gougeon y Testart, 1990; Hillier, 2001). Este folículo dominante comienza a secretar más inhibina que el resto de folículos, inhibiendo el crecimiento de éstos y favoreciendo el suyo propio. La inhibina es una hormona no esteroidea que actúa a nivel de la hipófisis anterior controlando la secreción de FSH e incrementando la producción de andrógenos que a su vez intervienen en la biosíntesis de estrógenos, proceso que ocurre a través de la enzima P450 aromatasa, secretada por las células de la granulosa y que es crucial para que el folículo adquiera su potencial estrogénico (Toda y Shizuta, 1993). Este proceso es conocido como *aromatización de las células de la granulosa* (Woodruff *et al.*, 1987; Picton *et al.*, 1990). La aromatización es un proceso que consiste en la oxidación y eliminación de un grupo metil de la cadena de 4 anillos (A, B, C y D) de los esteroides, transformando el anillo A en un estado aromático (de allí el nombre), y permitiendo la producción de estrógenos. Cabe resaltar que, en el caso del macho, el estradiol también puede ser producido por aromatización a partir de la testosterona (Toda y Shizuta, 1993; Carreau *et al.*, 2002).

- **HORMONA LUTEINIZANTE (LH)**

Es una glucoproteína con un peso molecular aproximado de 30.000 Da y con una vida media de 30 minutos. Al igual que la FSH, se compone de 2 subunidades llamadas α y β , y es una de las hormonas usadas por el cerebro para el control gonadal (Lincoln *et al.*, 1987). Se secreta de manera pulsátil desde la *pars anterior* de la adenohipófisis en respuesta a los pulsos de la GnRH.

Los efectos principales de la LH en la hembra son estimular el desarrollo folicular hasta la maduración, ovulación y el inicio de formación del cuerpo lúteo que permite el inicio de la secreción de progesterona (Fatet *et al.*, 2010). El patrón de secreción de los pulsos de LH es muy similar en todas las especies mamíferas y se caracteriza por un rápido aumento de los niveles plasmáticos durante 5 a 10 minutos, seguido de un progresivo descenso de dichos niveles de acuerdo a la vida media de la hormona (Caldani *et al.*, 1993). Durante el estro, los patrones de secreción cambian a una liberación preovulatoria de LH, pudiendo aumentar las concentraciones hasta en 100 veces comparadas con las basales (Lincoln *et al.*, 1987). La secreción de tipo pulsátil de la LH es muy importante, ya que de este modo se conservan activos los receptores gonadales de gonadotropinas, permitiendo una adecuada producción y

secreción de estrógenos y progesterona (Malven *et al.*, 1990). La amplitud de los pulsos de LH depende de la cantidad de hormona que se encuentre almacenada, preparada y lista para ser liberada en la hipófisis; y de igual forma, esa cantidad viene determinada por la frecuencia de pulsos de GnRH desde el hipotálamo (Clarke y Cummings, 1985).

El principal control que se ejerce sobre la secreción de LH es el mismo que actúa sobre la GnRH, es decir, a través de los esteroides ováricos. Tanto la progesterona como el estradiol suprimen la liberación tónica de LH, pero actúan de diferente manera: la progesterona opera directamente sobre el hipotálamo, provocando una bajada en la frecuencia de pulsos de GnRH; en cambio, el estradiol disminuye la capacidad de respuesta de la hipófisis a la GnRH, y por tanto, inhibiendo la amplitud de pulsos de LH (Goodman y Karsch, 1980). Esto produce un efecto de *feedback* negativo, es decir, los niveles de LH disminuyen, lo cual mantiene una secreción de LH y esteroides de tipo tónico o basal; y un segundo sistema de secreción con mayores concentraciones de esteroides que provoca un *feedback* positivo incrementando así las concentraciones y pulsos de LH, que sería responsable de la secreción de tipo preovulatoria de esta hormona (Currie *et al.*, 1991; Malpoux *et al.*, 1993). Parece, incluso, que el estradiol también es capaz de contribuir al incremento de la frecuencia de pulsos de LH durante la fase folicular, que por lo tanto, es posible, que no esté sólo provocada por el descenso de los niveles de progesterona tras la luteólisis (Karsch *et al.*, 1983).

- PROLACTINA

La prolactina es una hormona peptídica secretada por unas células especializadas llamadas lactotrofos en la parte anterior de la hipófisis. Esta hormona existe en todos los vertebrados y cumple funciones importantes, tanto a nivel reproductivo como a otros niveles, como participar en todos los periodos de desarrollo de la glándula mamaria, incluyendo su crecimiento, inducción de la lactogénesis, mantenimiento de la lactación y la síntesis de progesterona en el cuerpo lúteo (Djiane y Kelly, 1993). El tiempo de permanencia en sangre es de aproximadamente 21 min (Gow *et al.*, 1983).

La secreción de prolactina sigue un patrón estacional, coincidiendo las mayores concentraciones de la hormona durante la época de anestro (en el verano) y las más bajas en la estación reproductiva (a principios del otoño), tanto en la oveja (Walton *et al.*, 1977; Santiago-Moreno *et al.*, 2000; Gómez-Brunet *et al.*, 2008) como en la cabra (Prandi *et al.*, 1987; Emesih *et al.*, 1993; Santiago-Moreno *et al.*, 2003). En un estudio

realizado por Santiago-Moreno *et al.* (2003), en el ibex ibérico (*Capra pyrenaica hispanica*), se mostró que las concentraciones plasmáticas de prolactina respondieron al fotoperiodo, siendo altas durante los días largos y bajas durante los días cortos, con niveles basales en octubre, muy similares a los de la cabra doméstica (Prandi *et al.*, 1988). Sin embargo, el momento de inicio del incremento de las concentraciones de prolactina en abril, observado en el ibex ibérico, se produjo 3 meses más tarde que en el muflón europeo (*Ovis gmelini musimon*) (Santiago-Moreno *et al.*, 2000) y un mes después que en la cabra doméstica (Prandi *et al.*, 1988). Estas diferencias genéticas podrían estar relacionadas con los mecanismos centrales neuroendocrinos relacionados con la duración del día y el control de la secreción de las hormonas gonadotropas (Lincoln, 1990).

La secreción de prolactina parece tener un ritmo endógeno. En trabajos realizados por Gómez-Brunet *et al.* (2008), donde estudiaron el efecto de los días largos constantes y del fotoperiodo natural sobre la secreción de prolactina, tanto en ovejas domésticas como salvajes, demostraron que en ambos casos había una variación anual de la secreción de prolactina, pero la amplitud de su secreción fue menor en los animales sometidos a fotoperiodo de días largos. Además, se expresó de diferente manera entre los animales domésticos y salvajes, mostrando las ovejas domésticas una mayor sensibilidad a los días largos constantes que las salvajes. En un estudio realizado en cabras preñadas por Prandi *et al.* (1988) se observó que la gestación no modifica los patrones anuales de prolactina comparados con cabras no preñadas, demostrando que en la cabra la duración del día es el principal determinante de la secreción de prolactina, tanto en hembras gestantes como vacías.

Existen estudios que sugieren que, durante la fase folicular, la prolactina puede modular positivamente la secreción de GnRH/LH (Picazo *et al.*, 2000). Este rol de la prolactina en la modulación de la frecuencia de pulsos de GnRH se basa en el descubrimiento de receptores de esta hormona en las áreas hipotalámicas del cerebro de la oveja (Tortonese *et al.*, 1996), que están implicados en la secreción de GnRH (Thiéry *et al.*, 1989). De todos modos, alteraciones en las concentraciones de prolactina durante la época reproductiva y en el anestro no son reflejo de alteraciones en la secreción de las gonadotropinas (Webster y Haresign, 1983) y de la ciclicidad ovárica (Worthy *et al.*, 1985; Gómez-Brunet *et al.*, 2008). Esto indica que es poco probable que las concentraciones de prolactina estén relacionadas con la actividad reproductiva, sino que

ésta probablemente sea controlada a través de otras vías (Karsch *et al.*, 1989; Jansen y Jackson, 1993). Estudios sobre comportamiento reproductivo en carneros usando bromocriptina, antagonista dopaminérgico de la prolactina, en primavera y otoño refuerzan esta hipótesis, ya que la acción directa de este antagonista fue sólo sobre las concentraciones de prolactina pero no sobre las áreas cerebrales que controlan el comportamiento reproductivo (Regisford y Katz, 1994).

Se ha relacionado la estacionalidad de la secreción de prolactina con los cambios de pelaje a lo largo del año, situación que ocurre en varias especies mamíferas, como por ejemplo en los hámsteres (Duncan y Goldman, 1984) y en la muflón (Santiago-Moreno *et al.*, 2004), presentándose la muda cuando las concentraciones son mayores, aunque en las especies domésticas parece no ejercer demasiada influencia. Estos mismos autores (Santiago-Moreno *et al.*, 2005), trabajando con el muflón europeo, encontraron que la prolactina podría ejercer un posible rol sobre los cambios de crecimiento del cuerno en animales adultos. También se ha sugerido su papel en la regulación del ciclo estacional de crecimiento y metabolismo, ya que el tratamiento a base de bromocriptina provoca un descenso en el peso vivo y/o cantidad de alimento ingerido. Estos efectos, aunque relacionados, no pueden ser revertidos del todo con la aplicación de prolactina, por lo que otros factores deben de estar también involucrados (Eisermann *et al.*, 1984).

Igualmente, las relaciones entre las variaciones de prolactina y la temperatura son muy interesantes. Así, independientemente de las concentraciones existentes de prolactina en plasma, las variaciones en la temperatura media están siempre acompañadas por variaciones en las concentraciones de prolactina, las cuales han sido observadas tanto en la especie bovina (Wetteman y Tucker, 1974), ovina (Pelletier, 1973) como caprina (Mori *et al.*, 1985; Maeda *et al.*, 1986).

1.2.2.3. CONTROL OVÁRICO.

El ovario de las especies mamíferas es el lugar donde se almacenan y desarrollan los ovocitos formados durante la vida fetal y su principal función es la regulación de éstos a lo largo de la vida reproductiva del animal. El ovario se encarga del crecimiento y desarrollo de los folículos, ya sea hacia la ovulación o hacia la atresia, así como preparar al útero para acoger al posible ovocito fecundado. Tiene un papel fundamental como órgano endocrino, que a partir de la señal enviada por las gonadotropinas,

produce y libera hormonas esteroideas a través del folículo, considerado la unidad esteroideogénica fundamental del ovario, y también a través del cuerpo lúteo que produce la progesterona. La producción de dichas hormonas es resultado de la coordinación de dos tipos de células somáticas, las de la teca interna y las de la granulosa, existiendo entre ellas pequeñas diferencias en cuanto a su síntesis, provocadas, fundamentalmente, por los receptores hormonales contenidos en su membrana celular. También difieren en cuanto a la actividad de los complejos enzimáticos propios de cada una y de su estado dentro del folículo (Baird *et al.*, 1976; Gore-Langton y Armstrong, 1988).

- HORMONAS ESTEROIDEAS

Las hormonas esteroideas o estrógenos ováricos son los productos secretados por los folículos ováricos mejor conocidos y caracterizados. Todos los esteroides son derivados del colesterol, que está compuesto por 27 átomos de carbono (C27), siendo su forma circulante la principal fuente para la esteroideogénesis. Las lipoproteínas, que contienen el colesterol, son captadas de la circulación y almacenadas en el interior de las células ováricas, fundamentalmente como ésteres de ácidos grasos de cadena larga. Las hormonas esteroideas son producidas en la teca interna y en las células de la granulosa del folículo ovárico bajo el control de la FSH y de la LH, además de otros factores intrafoliculares entre los que destaca la inhibina, a la cual se hará referencia posteriormente.

Actúan a través de sus receptores intracelulares específicos, se unen a ellos e inician la respuesta biológica permitiendo el desarrollo del tracto genital y determinando su estado morfofuncional. Los estudios realizados sobre la secreción de esteroides ováricos se han centrado en dos esteroides: la progesterona y el estradiol. *In vivo*, la progesterona parece ser secretada en la sangre exclusivamente por el cuerpo lúteo (Bjersing *et al.*, 1972), mientras que el estradiol es secretado sólo por los folículos, siendo ambos patrones de secreción bastante semejantes (Baird *et al.*, 1976; Baird y Scaramuzzi, 1976).

Los receptores a la LH se encuentran en la teca y en las células intersticiales del ovario (Han *et al.*, 1974; Zeleznik *et al.*, 1974), mientras que las células de la granulosa de los folículos en crecimiento parecen tener receptores únicamente para la FSH (Zeleznik *et al.*, 1974; Amsterdam *et al.*, 1975). Con la maduración del folículo, se

forman, en las células de la granulosa, receptores a la LH, que son estimulados por la FSH y el estradiol, alcanzando su mayor proporción en el folículo totalmente maduro, justo antes de la ovulación. De este modo, el hecho de que el folículo tenga receptores a la LH en la teca interna y en la granulosa en este momento constituye un hecho fundamental para poder responder al pico preovulatorio de LH y así poder ovular (Thibault y Levasseur, 1979).

Los receptores esteroideos son controlados, por un lado, por las mismas hormonas esteroideas y, por otro lado, por acción de otro tipo de sustancias (Spencer y Bazer, 1995). De este modo, la autorregulación ha quedado demostrada claramente por la utilización de cultivos de líneas celulares en los que el estradiol resultó tener un papel inductor sobre los receptores de progesterona, mientras que su papel es el contrario sobre sus propios receptores (Robel, 1993). Esta regulación se produce a nivel de la transcripción de los genes que codifican los receptores. En el caso de la regulación por parte de otras sustancias, llamadas antihormonas, pueden ejercer su regulación bien a nivel de la producción hormonal o compitiendo en la unión hormona-receptor (Zúñiga, 2002).

Desde el punto de vista reproductivo, el lugar de acción esteroidea más importante es el eje hipotálamo-hipófisario, donde ocurre la regulación de la secreción de GnRH, y por lo tanto de la FSH y LH. Estudios a nivel hipotalámico, realizados en ovejas, han identificado receptores para los distintos tipos de esteroides, reflejando una distribución muy similar para las células hipotalámicas portadoras de los receptores estrogénicos α y β , así como receptores de progesterona y andrógenos (Scott *et al.*, 2000). Gracias a estas investigaciones realizadas en la especie ovina se ha demostrado que el núcleo ventromedial hipotalámico es una zona clave en la regulación de la secreción de GnRH por parte de los esteroides gonadales (Blache *et al.*, 1991; Fabre-Nys *et al.*, 1994). También las hormonas esteroideas juegan un papel importante en la manifestación del comportamiento del celo (Signoret y Balthazart, 1993) y el maternal (Poindron y Schaal, 1993).

A diferencia de cómo ocurre en el ovino, en la especie caprina, existen pocos trabajos en cuanto a la descripción del control ovárico y acción esteroidea (Chemineau *et al.*, 1982; Ginther y Kot, 1994; De Castro *et al.*, 1999; Medan *et al.*, 2003), de tal modo que su dinámica folicular y perfiles hormonales aun no han sido del todo clarificados a lo largo del ciclo estral de la cabra. Medan *et al.* (2003), según estudios

realizados con ultrasonografía en cabras Shiba , mostraron que la dinámica folicular y el crecimiento de los folículos ováricos exhiben un patrón de oleadas.

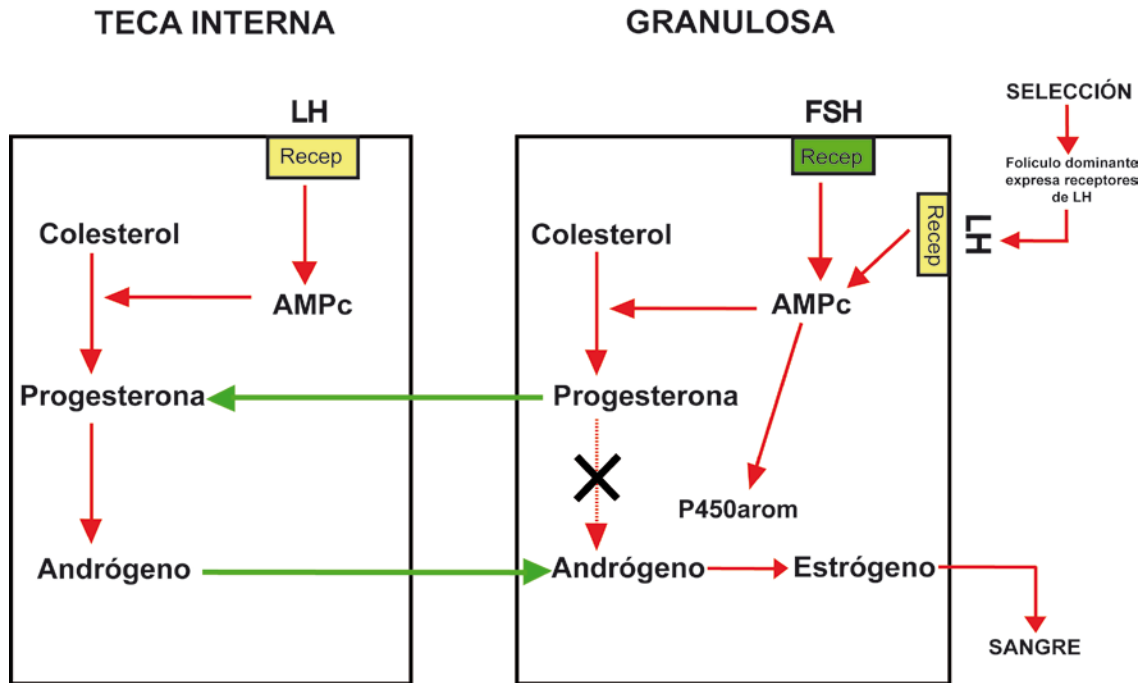
Progesterona

La progesterona, también conocida como P4 (pregn-4-ene-3,20-dione) es una hormona esteroide C-21 y es el principal de los progestágenos. Se forma, fundamentalmente, en el cuerpo lúteo de las cabras cíclicas, y, en el caso de otros pequeños rumiantes, en la placenta. Además también puede sintetizarse en las glándulas adrenales y el hígado. Su estructura se deriva del núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno, del que derivan los esteroides y cuya arquitectura molecular es igual a la del colesterol.

La principal fuente de progesterona son las células luteales. Estas células proceden de la transformación de las células de la granulosa del folículo, y tanto las células de la granulosa como las de la teca contribuyen a la formación del cuerpo lúteo (McClellan *et al.*, 1975; O'Shea *et al.*, 1980). Por lo tanto, se puede decir que en el cuerpo lúteo existen dos tipos de poblaciones celulares: un grupo de origen tecal, formado por células pequeñas y otro, cuyo origen son las células de la granulosa, y que son de mayor tamaño (O'Shea *et al.*, 1980) (Figura 5). Las pequeñas células luteales presentan un mayor número de receptores a la LH (Fitz *et al.*, 1982), por lo que la producción directa de progesterona viene fundamentalmente de estas células, a partir del colesterol captado y almacenado en ellas. Las células grandes, cuya capacidad de respuesta a la LH es menor (Fitz *et al.*, 1982), captan el colesterol almacenado por las pequeñas, siendo capaces de secretar progesterona por periodos más largos (Lemon y Mauleón, 1982). Las células pequeñas se encuentran entre las células más grandes en base a uniones gap (*gap junctions*), facilitando la difusión del colesterol y de otros precursores de la progesterona entre ellas.

Las concentraciones de progesterona son prácticamente indetectables al inicio del ciclo (Hauger *et al.*, 1977) y se produce un aumento gradual entre los días 2-8 para alcanzar una concentración máxima de 1,5 a 3 ng/ml, dependiendo de la raza (Bindon *et al.*, 1979; Quirke *et al.*, 1979). Las concentraciones máximas de progesterona también varían dentro del momento de la época reproductiva siendo las más altas las que se producen a la mitad que al principio o al final de ésta (Wheeler y Land, 1977).

Figura 5. Esquema mostrando la estructura de las células de la teca interna y de la granulosa y la unión de la LH y FSH a sus receptores durante la foliculogénesis (adaptado de Liu, 2007).



Posteriormente, las concentraciones de progesterona permanecen relativamente estables entre los días 8 y 18 del ciclo, para disminuir bruscamente a niveles basales en los siguientes 2-3 días (Figura 1). En la oveja, a diferencia de lo que ocurre en las ratas y los primates, la secreción de progesterona no aumenta claramente en respuesta a la oleada preovulatoria de LH, pero sí que se incrementa en el interior del folículo preovulatorio, jugando un importante papel en el proceso de la ovulación (Bjersing *et al.*, 1972). Además se ha observado que aumenta la cascada de prostaglandinas PGE_2 a nivel del folículo preovulatorio facilitando la síntesis de $PGF_{2\alpha}$, incrementa la actividad del tejido folicular permitiendo la ovulación (Murdoch *et al.*, 1986), como ya se ha comentado anteriormente. En estudios realizados con cabras Shiba sobre dinámica folicular se encontró que la elevación de las concentraciones de progesterona suprime la secreción pulsátil de LH y el crecimiento folicular; además, se observó que las concentraciones periféricas de progesterona parecen estar correlacionadas con el diámetro del cuerpo lúteo, pudiendo ser usado como indicador de esas concentraciones (Medan *et al.*, 2003; Sukanuma *et al.*, 2007).

A nivel hipotalámico, la progesterona tiene un efecto de *feedback* negativo sobre la liberación de gonadotropinas (Goodman y Karsch, 1980; Clarke y Cummings, 1985; Price y Webb, 1988). Una de las funciones de la progesterona es inhibir la liberación de LH, que es secretada en pulsos característicos de baja frecuencia y gran amplitud durante la fase luteal (Rahe *et al.*, 1980). Cuando se produce la luteólisis, la concentración de progesterona en sangre disminuye y aumenta la frecuencia de los pulsos de LH. Igualmente, una importante acción de la progesterona es la disminución del número de receptores estrogénicos del endometrio y el aumento de las enzimas que metabolizan el estradiol (Rivera-Lozano *et al.*, 2006).

Tanto la progesterona como el estradiol poseen receptores en las células endoteliales de la glándula mamaria, participando en la mamogénesis. Concretamente, el estradiol se une a dichos receptores produciendo un aumento en el número de receptores para progesterona, y la unión de esta hormona limita la aparición de receptores para la prolactina y por tanto limita su efecto lactogénico (Delouis y Richard, 1993). Ambos esteroides, progesterona y estradiol, intervienen en la motilidad uterina durante el celo, y son de gran importancia en el transporte de los ovocitos a lo largo del oviducto, en la implantación del blastocisto, en la preparación del tracto reproductivo para la posible gestación en caso de que esta se produzca, en la funcionalidad del cuerpo lúteo y, además, en favorecer la utilización de los nutrientes de una forma más eficiente por la hembra durante la gestación (Zarazaga, 1994).

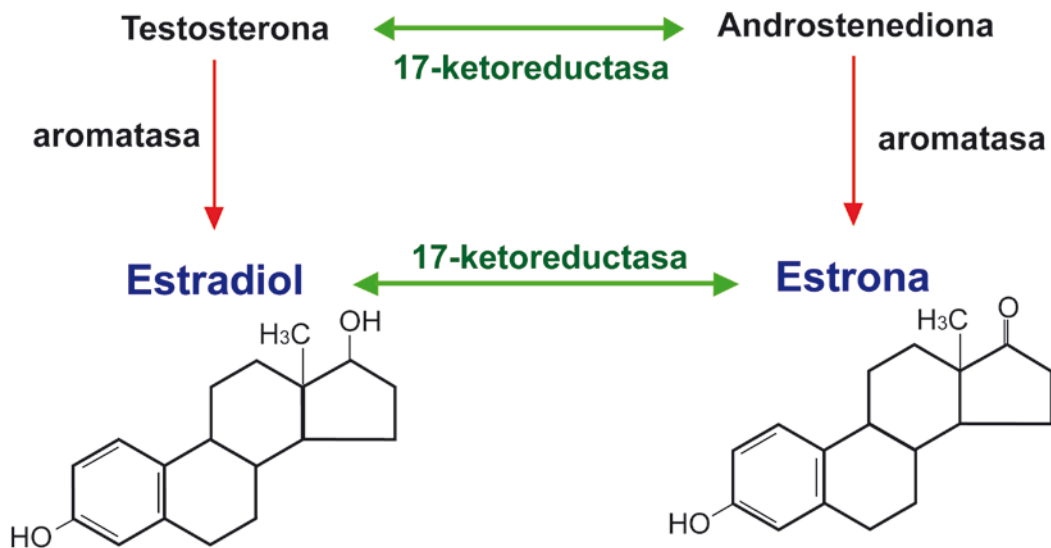
Mientras que en la oveja, la placenta se convierte en la principal fuente de progesterona pasados los 2 primeros meses de gestación (Baril *et al.*, 1993; Rivera-Lozano *et al.*, 2006), en la cabra, la presencia de un cuerpo lúteo funcional resulta indispensable a lo largo de toda la gestación (Fatet *et al.*, 2010). La producción placentaria de progesterona en la cabra resulta insuficiente para mantener la gestación, como lo demuestran trabajos donde los animales han sido sometidos a ovariectomía (Sheldrick *et al.*, 1981). El parto en las cabras ocurre como consecuencia de una bajada drástica de la progesterona 12 a 24h antes del inicio del parto (Fatet *et al.*, 2010).

Estradiol

El estradiol (llamado E₂ o 17 β -estradiol) es una hormona esteroidea, que al igual que otros esteroides, deriva del colesterol y se sintetiza a partir de los andrógenos por las células de la teca. Una fracción de la androstenodiona es convertida a testosterona

por acción de la enzima 17-ketoreductasa y que a su vez es convertida en estradiol en las células de la granulosa por la acción de una enzima llamada aromatasa (Figura 6). En una vía alternativa, la androstenodiona es aromatizada a estrona, que posteriormente será convertida a estradiol por la 17-ketoreductasa (Baird y Scaramuzzi, 1976; Goodman e Inskeep, 2006).

Figura 6. Aromatización de la androstenodiona en estradiol (adaptado de LaVoie y King, 2009)



Estudios en ovinos realizando medidas de las concentraciones de estradiol en sangre venosa del ovario (Baird *et al.*, 1976; 1981) o en la circulación periférica, (Hauger *et al.*, 1977; Wheeler y Land, 1977; Karsch *et al.*, 1979) concuerdan en que el aumento de estradiol se produce después de la primera caída en las concentraciones de progesterona en la luteolisis, y aumenta de cinco a diez veces durante los días siguientes. Este incremento de los picos de estradiol da inicio al comienzo de la oleada preovulatoria de LH y rápidamente disminuye a concentraciones basales. La secreción de estradiol durante este periodo parece provenir en gran parte del folículo destinado a ovular, que está creciendo rápidamente en este momento, afectando a nivel de la hipófisis y mostrando relación con la amplitud de pulsos de LH (Bjersing *et al.*, 1972; Martin, 1984; Mann *et al.*, 1992). Sin embargo, un aspecto interesante a tener en cuenta es que, a diferencia del ovino, estudios realizados en la cabra muestran que no solamente el folículo destinado a ovular secreta estradiol, sino que es secretado por la totalidad de los folículos grandes de cada oleada folicular (Medan *et al.*, 2003). Estos

mismos autores encontraron que, de las 4 oleadas foliculares que se registraron en las cabras Shiba antes de ocurrir la ovulación, la primera y la última oleada fueron en donde los folículos secretaron la mayor cantidad de estradiol comparadas con las fases intermedias. Esto podría ser atribuido a la bajada de la liberación de LH registrada en la mitad de la fase luteal (Kawate *et al.*, 2000).

El estradiol estimula la secreción de pulsos de LH de alta frecuencia pero de baja amplitud (Goodman y Karsch, 1980; Karsch *et al.*, 1984). Como hormona esteroidea, el estradiol tiene un papel importante, que, en general, consiste en el desarrollo y mantenimiento de la funcionalidad de los órganos femeninos estrógeno-dependientes, así como la aparición de los caracteres sexuales secundarios, el desarrollo corporal y de la glándula mamaria y la aparición del celo, entre otros (Karsch *et al.*, 1984). Dentro de su función en el desencadenamiento de la secreción preovulatoria de LH, el E₂ aumenta la sensibilidad hipofisiaria al estímulo de la GnRH (Kesner *et al.*, 1981), con el aumento del número de receptores para ésta en las células hipofisiarias (Schoenemann *et al.*, 1985).

Tanto la progesterona como el estradiol ejercen acciones de *feedback* sobre la secreción de GnRH que se realiza de forma opuesta y secuencial a lo largo del ciclo sexual; existiendo, sin embargo, evidencias de que estos efectos a pesar de ser opuestos, se encuentran relacionados estrechamente (Caraty y Skinner, 1999). Es conocida la acción del estradiol en la inhibición de la secreción de pulsos de LH durante el anestro (Baird *et al.*, 1976), mientras que en la época reproductiva el estradiol inhibe la amplitud de los pulsos de LH, pero no la frecuencia de los mismos (Goodman *et al.*, 2010). Esto sugiere que el hipotálamo es el sitio de acción donde ocurren los cambios estacionales de sensibilidad del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal al estradiol, pero lo que aún no se tiene claro son los cambios anatómicos y funcionales que ocurren dentro del hipotálamo y que son responsables de los cambios en la sensibilidad al *feedback* negativo del estradiol.

Por otra parte, la sensibilidad de la actividad del hipotálamo al estradiol puede aumentar o reducirse en función del nivel de ingesta de alimentos (Rhind *et al.*, 1991), como se verá más adelante en los siguientes capítulos. Por esa razón, el empleo de animales OVX+E₂ proporcionan un modelo experimental utilizado en la investigación de la estacionalidad y la nutrición, ya que reflejan los cambios en la sensibilidad del eje

hipotálamo-hipofisario al estradiol en una situación de liberación constante de este esteroide (Henniawati *et al.*, 1995; Zarazaga *et al.*, 2005).

El estradiol, aparte de actuar sobre el hipotálamo en la regulación de la secreción de la GnRH y de las gonadotropinas de forma indirecta, también tiene efectos sobre la hipófisis; demostrando que es capaz de provocar un aumento en el contenido hipofisario de la subunidad β de LH (Rotten, 1993). También, se ha estudiado la estimulación del estradiol en la secreción de prolactina, ya sea por una hipertrofia de los lactotrofos hipofisarios o a través de la regulación de la sensibilidad de dichas células a otros factores que regulan la secreción de prolactina como puede ser la dopamina (Djiane y Kelly, 1993).

- INHIBINA

La inhibina se define como una hormona glicoprotéica gonadal que regula la secreción de FSH de la glándula hipofisaria y el desarrollo folicular en el ovario de las especies mamíferas (Baird *et al.*, 1991; Medan *et al.*, 2007). Está constituida por 2 subunidades de 230 y 134 aminoácidos, cuya función es inhibir la secreción de GnRH y FSH y, en menor extensión de LH, al final del ciclo ovárico (Franchimont *et al.*, 1979; Demoulin *et al.*, 1980). Su secreción la realizan las células de la granulosa, fundamentalmente, de los grandes folículos antrales y por lo tanto está directamente relacionada con el desarrollo folicular, actuando como mediadora en las fases de reclutamiento y crecimiento de los folículos, así como en el control del número de folículos que llegarán a madurar en el próximo ciclo, interviniendo, por lo tanto, sobre la tasa de ovulación.

Su función es controlar la secreción de FSH a través de un mecanismo *feedback* negativo, y en sinergia con el estradiol (Findlay y Clarke, 1987; Martin *et al.*, 1988; Baird *et al.*, 1991; Mann *et al.*, 1992), aumentando su producción a medida que el folículo madura. De este modo, las fluctuaciones que se observan en el patrón de secreción de ambas hormonas podrían ser la causa de los cambios en la secreción de FSH, asociados con las ondas foliculares (Medan *et al.*, 2003). Sin embargo, ese cambio no es tan claro como en el caso del estradiol; esto puede deberse a que la inhibina no sólo es secretada por el folículo ovulatorio sino que también se libera desde los pequeños folículos e incluso desde aquellos que se encuentran en proceso de atresia (Driancourt *et al.*, 1993). Si bien se ha demostrado que la secreción de la inhibina A,

uno de los complejos de esta hormona que está relacionado con la presencia de grandes folículos, está negativamente correlacionado con la concentración de FSH (Medan *et al.*, 2003).

Además de controlar la secreción de FSH, la inhibina también actúa sobre el mismo ovario, incrementando la producción de andrógenos en las células de la teca dependiente de la LH (Findlay *et al.*, 1992). El papel de control de la inhibina sobre la secreción de FSH se ha demostrado también mediante técnicas de neutralización pasiva de la inhibina durante el ciclo estral que desencadenaron un incremento de la secreción de FSH endógena. Es más, una hipersecreción de FSH endógena seguida de una inmunoneutralización de la inhibina estimula el desarrollo de folículos más grandes en el ovario (Medan *et al.*, 2007). Otra función, que ha sido demostrada de la inhibina, ha sido su papel en el control del desarrollo folicular a través de la regulación de la secreción endógena de la FSH durante las primeras fases de gestación en la cabra (Kandiel *et al.*, 2008).

El control de la secreción de la inhibina es bastante complejo, si bien el principal factor regulador es la propia FSH, que tiene efectos positivos tanto *in vivo* como *in vitro*. Así, un tratamiento crónico con FSH incrementa la producción de inhibina, que posiblemente es un reflejo de la estimulación del desarrollo folicular (Tsonis *et al.*, 1988; McNeilly *et al.*, 1989). También se ha observado que la secreción de inhibina se incrementa cuando se inyecta FSH y desciende cuando ésta se retira, pero estas respuestas se producen a las 24 horas de haberse realizado el tratamiento, correlacionándose con el crecimiento folicular y la atresia, respectivamente. Estos mismos autores observaron que cuando además de administrar FSH se suministra LH, la secreción de inhibina no se vio afectada (Campbell *et al.*, 1998; 1999). Si bien, el pico preovulatorio de LH parece suprimir la secreción de inhibina porque las concentraciones de ésta caen a los niveles más bajos del ciclo sexual una hora después del mismo (Souza *et al.*, 1997; Knight *et al.*, 1998). Este hecho se debe principalmente a la ovulación y la atresia de los folículos antrales por el pico preovulatorio de LH (Souza *et al.*, 1997), sin embargo cuando se provoca la ovulación usando sólo LH la secreción de inhibina no se ve disminuida tan claramente (Campbell *et al.*, 1999). Este último resultado plantea la interesante posibilidad de que el aumento de la FSH preovulatoria, o alguna otra hormona liberada en este momento, sea la causa de la rápida disminución de la inhibina al inicio del ciclo estral (Campbell *et al.*, 1999).

Existen otras sustancias intraováricas que actúan como reguladores locales, pues son producidas y ejercen su actividad en el folículo ovárico, tales como la activina, que ejerce su acción sobre los receptores específicos en las células de la granulosa, estimulando la producción de hormonas inducidas por la FSH; o la folistatina, cuya misión parece ser contraria a la de la activina, estimulando por sí sola la producción de progesterona inducida por la FSH (Findlay *et al.*, 1992).

2. FOTOPERIODO, MELATONINA Y ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA

2.1. INTRODUCCIÓN

El fotoperiodo es el principal factor ambiental que permite, a determinadas especies estacionales, identificar e incluso definir con algunos meses de antelación el momento más favorable para los nacimientos desde el punto de vista del clima y disponibilidad de alimento a lo largo del año (Malpaux *et al.*, 1999).

El carácter invariable de los cambios fotoperiódicos a lo largo de los años, junto a la diferencia de intensidad y duración del anestro en función de la latitud, demuestran el importante papel en las variaciones de las horas de luz en la regulación de la actividad reproductiva (Rivera *et al.*, 2003). Diversos estudios en el ganado ovino (Yeates, 1949; Karsch *et al.*, 1984) y caprino (Chemineau *et al.*, 1992a; Gómez-Brunet *et al.*, 2008; Duarte *et al.*, 2010; Delgadillo *et al.*, 2011) han demostrado que manipulando artificialmente el fotoperiodo natural puede condicionar que aquéllos entren en actividad reproductiva en pleno anestro estacionario.

La domesticación ha supuesto la casi total eliminación de la estacionalidad en el ganado bovino lechero y en la especie porcina; en cambio, eso no ha sucedido en el caso de los pequeños rumiantes, como ocurre con el caprino, e incluso razas localizadas en latitudes más cercanas al ecuador siguen conservando, en diferente medida, esa estacionalidad.

Este anestro estacional, en condiciones de fotoperiodo natural, es controlado por mecanismos de fotorrefractoriedad y la fotosupresión, y mediados por diferentes procesos neuronales que han puesto de manifiesto la naturaleza endógena del ritmo reproductivo (Kao *et al.* 1992). A lo largo de las últimas dos décadas se han realizado numerosos estudios sobre el control de la estacionalidad y el papel de la glándula pineal como sincronizador estacional de la actividad reproductiva, transformando las señales luminosas en endocrinas a través de un complejo mecanismo en donde interviene la melatonina, siguiendo su propio patrón circadiano en relación a la duración del día y de la noche (Zarazaga, 1994).

Además de los ritmos circadianos existentes, en los últimos años también se ha puesto de manifiesto la existencia de otros ritmos endógenos, conocidos como plasticidad neuronal y los llamados genes reloj (*clock genes*). El concepto de plasticidad neuronal está referido a las adaptaciones circadianas y estacionales, en donde se

contempla que las células neuronales no son estáticas como se pensaba años atrás, sino que están en constante dinamismo y cambian en respuesta a los cambios fisiológicos internos del individuo, así como a los cambios del medio ambiente (Lehman *et al.*, 2010). El inicio o fin de la actividad reproductiva, preñez, lactancia, consumo de alimento, por citar algunos ejemplos, son resultado de la modificación de las conexiones que ocurren a nivel cerebral en ciertos momentos del año, aunque dichas conexiones no son funcionales en otros momentos, lo que todavía resulta una incógnita para los investigadores.

Por otro lado, los genes reloj permiten anticipar al animal los cambios que pueden ocurrir a lo largo del año, responden independientemente del estímulo luminoso, son característicos de cada individuo y autónomos, siendo regulados por el calendario interno propio del animal (Lincoln *et al.*, 2003).

2.2. PAPEL DEL FOTOPERIODO EN LA REGULACIÓN DE LA ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA

2.2.1. FOTOPERIODO Y REPRODUCCIÓN

El fotoperiodo, como definición, es la variación estacional de la duración del periodo de iluminación diaria y es el factor ambiental más repetible a lo largo de los años (Chemineau *et al.*, 1992b; Malpoux, 2006; Chemineau *et al.*, 2010). El papel del fotoperiodo, como controlador de la actividad reproductiva, ha sido puesto en evidencia en una serie de experiencias donde se ha mostrado que el periodo de actividad sexual puede ser desplazado en el tiempo, modificando el régimen fotoperiódico y sin cambiar otros factores medioambientales. Así, la inversión del ciclo fotoperiódico anual provoca un retraso de 6 meses de la estación sexual (Karsch *et al.*, 1984). Igualmente, mediante la realización del ritmo fotoperiódico semestral, en donde se somete a los animales a regímenes luminosos que reproducen cada 6 meses las variaciones anuales del fotoperiodo, se generan dos estaciones reproductivas en un mismo año (Mauleon y Rougeot, 1962; Pelletier y Almeida, 1987). Por lo tanto, la alternancia cada tres meses de días largos (16 horas de luz: 8 horas de oscuridad) y días cortos (8 horas de luz: 16 horas de oscuridad), induce una alternancia de periodos de actividad y reposo sexual, de forma que los primeros se producen tras el inicio de los días cortos y los segundos tras el paso a días largos, pero siempre con un periodo de latencia. En el caso de la oveja, la

alternancia de 90 días largos y 90 días cortos induce el inicio de la actividad ovulatoria o el aumento de la secreción de LH tras 40-60 días tras el paso de los animales de días largos a cortos mientras que la inactividad reproductiva se manifiesta tras 20-30 días después del paso de días cortos a largos (Karsch *et al.*, 1984; Thimonier, 1989). En el caso de la cabras, Chemineau *et al.* (1988) indican que el inicio de la actividad ovulatoria se produce tras 74-85 días después del paso de días largos a cortos, indicando que los caprinos responden un poco después que los ovinos a los tratamientos fotoperiódicos.

Dos mecanismos principales controlan las variaciones estacionales: el ritmo endógeno circanual de actividad neuroendocrina que aparece cuando los animales son mantenidos experimentalmente en fotoperiodo constante, y los cambios de la duración del día y su interpretación por el sistema nervioso central, vía la duración de secreción de melatonina por la glándula pineal. En concreto, la disminución de la duración del día coincide con el período de actividad sexual, mientras que su aumento es el período de anestro.

De este modo, se pueden aplicar estrategias para manipular la actividad reproductiva modificando el fotoperiodo. Diferentes tratamientos luminosos pueden producir cambios tanto en machos como en hembras, sin embargo se ha demostrado que un mismo tratamiento fotoperiódico puede tener efectos positivos o negativos según la experiencia fotoperiódica previa (Hafez, 1952; Robinson y Karsch, 1984; Chemineau *et al.*, 1992b). Estudios realizados por Robinson y Karsch (1988) han demostrado que la percepción de determinados momentos del fotoperiodo anual son realmente necesarias para sincronizar la actividad reproductiva; así, trabajos llevados a cabo en ovejas pinealectomizadas (Wayne *et al.*, 1990) sugieren que los días largos que le siguen al solsticio de invierno son los responsables de sincronizar el momento de inicio de la actividad sexual. Otros estudios concluyen que ese periodo del año se encarga de romper la fotorrefractoriedad a los días cortos y por lo tanto el animal se vuelve sensible y será capaz de responder al acortamiento de los días que tendrá lugar tras el solsticio de verano (Jackson *et al.*, 1988). En otras palabras, se puede decir que el aumento de la duración del día tras el inicio de la primavera podría ser el responsable del inicio de la estación reproductiva a finales del verano (Malpaux *et al.*, 1989; Thimonier, 1989).

Por todo ello, son las variaciones anuales del fotoperiodo las que marcan el comienzo y fin de la actividad reproductiva en las especies con mayores sensibilidades

estacionales y localizadas en las zonas templadas del planeta. En el caso de la especie caprina, estos periodos de actividad reproductiva máxima (agosto-enero, resultado de la estimulación de los días decrecientes tras el solsticio de verano) se alternan con otros de actividad sexual mínima o de ausencia total de actividad reproductiva (anestro, febrero-julio, resultado del aumento de la duración del día tras el solsticio de invierno) (Chemineau *et al.*, 1992a; Forcada *et al.*, 2000; Zarazaga *et al.*, 2005).

A diferencia de la oveja (Karsch *et al.*, 1984; 1989), existen pocos estudios sobre los mecanismos fisiológicos que controlan la estacionalidad reproductiva en la cabra (Rivera *et al.*, 2003). En razas francesas (45° Latitud Norte), la época reproductiva empieza en septiembre, cuando la duración del día comienza a disminuir y continúa hasta marzo (Bodin *et al.*, 2007). En cabras criollas argentinas (30° Latitud Sur) la época reproductiva se da entre los meses de Marzo y Septiembre (otoño/invierno) y la estación de anestro entre Octubre y Febrero (primavera/verano) (Rivera *et al.*, 2003). En un estudio realizado en México, con cabras alpinas y criollas, Delgadillo *et al.* (2004b) observaron que la estación reproductiva comprendía desde el inicio del otoño hasta el final del invierno. Igualmente, en la raza Malagueña, se ha descrito que los ciclos ováricos se producen entre los meses de septiembre y febrero (Gómez-Brunet *et al.*, 2003) o en la raza Payoya, donde el periodo de actividad reproductiva se presentó entre los meses de agosto y febrero, con una disminución de la actividad entre marzo y junio (Zarazaga *et al.*, 2005). De este modo, muchos de los resultados descritos sobre estacionalidad reproductiva pueden verse influidos por la raza, la latitud o la presencia del macho, entre otros.

Otros factores, como la temperatura o la disponibilidad de alimento desempeñan un papel secundario y son considerados como moduladores de ésta actividad (Zarazaga *et al.*, 2005), situación que no ocurre en las zonas más próximas al ecuador, donde la amplitud de las variaciones fotoperiódicas es menor y hace que dichos factores determinen la actividad sexual de las razas menos estacionales (Fatet *et al.*, 2010).

2.2.2. EL ANESTRO ESTACIONARIO

El anestro estacionario es la consecuencia de un descenso en la actividad del eje hipotálamo-hipofisario por el cual queda reducida la frecuencia de pulsos de GnRH y en consecuencia también la secreción de las hormonas hipofisarias (Karsch *et al.*, 1984). El

mecanismo regulador de la función reproductiva se localiza a nivel del hipotálamo, por lo que el mensaje fotoperiódico actúa sobre él y sobre las células neurosecretoras del sistema nervioso central. El hipotálamo, a su vez, regula la secreción de GnRH a través de la retroacción de los esteroides ováricos, lo que se traduce en una variación estacional de los pulsos de LH, de tal forma que la frecuencia de los pulsos se incrementa durante los días cortos y disminuye en los largos. Los efectos del fotoperiodo sobre la secreción de LH y el *feedback* negativo de los esteroides pueden ser simulados usando ovejas pinealectomizadas y utilizando infusiones seriadas de melatonina (Bittman *et al.*, 1985).

En estudios realizados con ovejas OVX+E₂ durante la época reproductiva, el estradiol demostró tener muy poco efecto en la inhibición de los pulsos de LH y ninguno sobre la frecuencia de los mismos (Goodman *et al.*, 1982); existiendo, por lo tanto, una marcada disminución de la sensibilidad del eje gonadotropo al *feedback* negativo del estradiol durante esta época (Legan *et al.*, 1977; Karsch *et al.*, 1980; Goodman *et al.*, 1981). Por el contrario, en anestro estacional, el estradiol se convierte en un potente inhibidor de la frecuencia de pulsos de GnRH y LH (Karsch *et al.*, 1980; Goodman *et al.*, 1982), de forma que la frecuencia de liberación de las hormonas hipofisarias disminuye hasta llegar a niveles basales, alrededor de un pulso cada 12 horas (Barrel *et al.*, 1992), lo que tiene lugar debido a un marcado aumento en la sensibilidad del hipotálamo al *feedback* negativo del estradiol ovárico. Como ya se explicó en el capítulo 1 de esta Revisión, estos cambios en la sensibilidad al estradiol, son un reflejo del cambio estacional que el fotoperiodo produce sobre la actividad de las neuronas hipotalámicas que muestran sensibilidad a los estrógenos y que están en contacto con las neuronas GnRH del hipotálamo mediobasal (Gayrard *et al.*, 1994; Havern *et al.*, 1994; Lehman *et al.*, 1996).

Otro aspecto importante, en relación a las variaciones estacionales de la reproducción y al anestro estacionario, es que la secreción de prolactina se ve afectada por el fotoperiodo, siguiendo un patrón estacional, siendo las mayores concentraciones durante la época de anestro (en el verano) y las más bajas en la estación reproductiva (a principios del otoño), tanto en la oveja (Walton *et al.*, 1977) como en la cabra (Prandi *et al.*, 1987; 1988). De forma que estos últimos autores sugieren que los niveles de prolactina son una “señal” de la época de anestro (altos niveles) o reproductiva (bajos niveles) más que una “causa” de la estacionalidad reproductiva.

2.2.3. LA FOTORREFRACTARIEDAD Y EL RITMO ENDÓGENO DE LA REPRODUCCIÓN

La restricción de la actividad reproductiva a una cierta época del año es algo común en las especies mamíferas estacionales (Heideman y Bronson, 1994), siendo un fenómeno dominado principalmente por el fotoperiodo. A lo largo de las últimas dos décadas se han realizado diversos estudios, tanto en ovino como en caprino, acerca de los diferentes mecanismos por los cuales el ciclo anual reproductivo es controlado y de qué forma actúa el fotoperiodo sobre dicho ciclo (Malpaux *et al.*, 1989; Wayne *et al.*, 1990; Chemineau *et al.*, 2008; Gómez-Brunet *et al.*, 2008; Chemineau *et al.*, 2010). Durante muchos años se creyó que el inicio de la actividad reproductiva se debía a la estimulación de los días cortos o decrecientes y que la época de anestro era debida a la acción de los días largos o crecientes (Yeates, 1949; Mauleón y Rougeot, 1962; Legan y Karsch, 1980), lo que llevó a caracterizar a la oveja y la cabra como especies de días cortos.

Sin embargo, la regulación del ciclo anual de la reproducción es más complicada de lo que pudiera pensarse y debe ser tratada con cierta prudencia, ya que involucra estados de fotorrefractariedad, así como la existencia de un ritmo endógeno responsable de controlar la reproducción como se explicará más adelante en este capítulo.

2.2.3.1. RITMO ENDÓGENO DE REPRODUCCIÓN

Malpaux *et al.* (1988), en un trabajo realizado con ovejas Suffolk, acerca del papel del fotoperiodo sobre la actividad reproductiva, sugirieron que la transición entre la estación sexual y el anestro estacionario no estaba específicamente controlado por los cambios en la longitud del día, sino que señalaron que la oveja tenía su propio ritmo endógeno de reproducción. Los estados refractarios parecen ser consecuencia de este llamado ritmo endógeno de manera que en ausencia de variaciones fotoperiódicas, usando ovejas, ya sea pinealectomizadas o sometidas a días cortos o largos constantes durante varios años, éstas muestran una alternancia de periodos de reposo y de actividad sexual (Ducker *et al.*, 1973; Malpaux *et al.*, 1988; Karsch *et al.*, 1989; Thimonier, 1989; Wayne *et al.*, 1990; Gómez-Brunet *et al.*, 2008; 2010); si bien, estos últimos son muy variables entre individuos y, además, no están sincronizados en comparación con los

animales en estación reproductiva normal. Por tanto, el papel del fotoperiodo natural parece ser el de sincronizar el citado ritmo endógeno con un periodo igual a un año (Malpaux *et al.*, 1989), alternando a lo largo del mismo los periodos de actividad reproductiva y anestro estacionario.

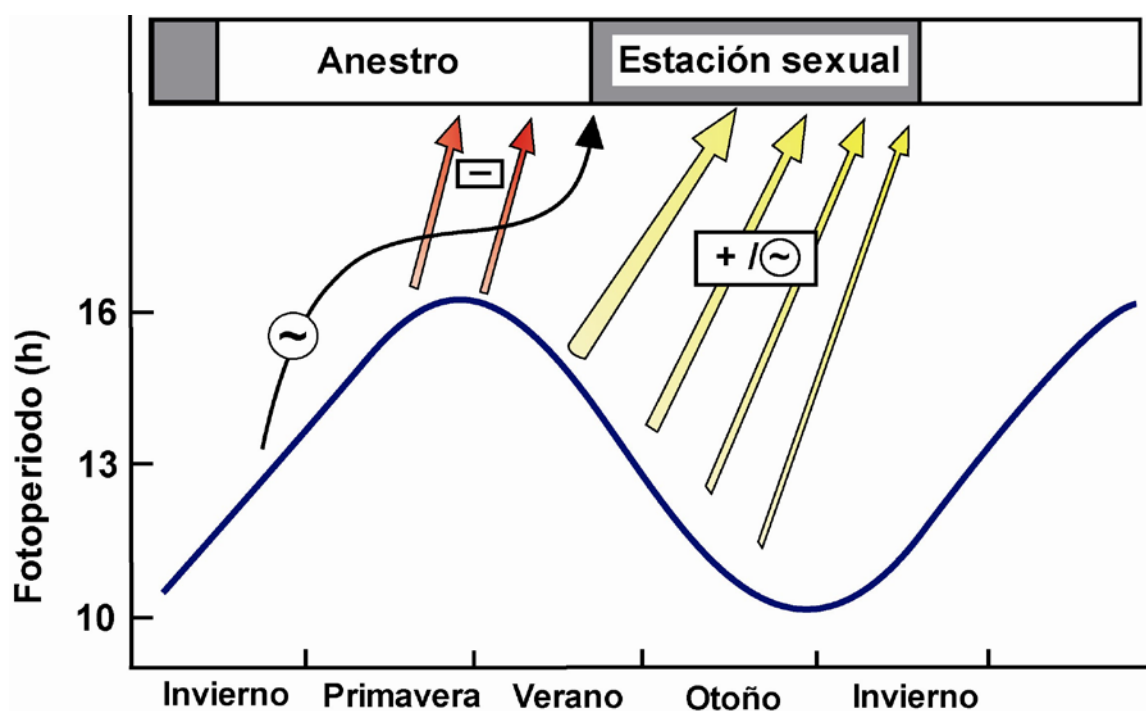
En conjunto, todos estos trabajos han demostrado que el aumento de la longitud del día tras el solsticio de invierno puede actuar sobre el momento en que finaliza la actividad sexual, pero la razón principal que determina la transición al anestro estacionario es, dicho en otras palabras, un apagado de la actividad reproductiva como resultado de un ritmo endógeno subyacente de reproducción (Malpaux *et al.*, 1988). Igualmente, se ha demostrado que los días largos de primavera son primordiales para iniciar el ritmo endógeno de reproducción y en particular determinar el momento del inicio de la temporada reproductiva a finales de verano (Malpaux *et al.*, 1989).

Por otra parte, los animales fotoperiódicos o que regulan su actividad reproductiva a través del fotoperiodo, son capaces de interpretar una misma duración del día (por ejemplo, 13h ó 14h) como una señal estimuladora o inhibitoria en función del fotoperiodo precedente, lo que se conoce como “historia o experiencia fotoperiódica previa” (Goldman, 2001; Tricoire, 2002). Este hecho se manifiesta claramente al demostrar que la duración del día, en el momento de inicio de la estación sexual en el otoño de climas templados, es unas 2 horas superior (de media) a la duración del día en el momento en que se inicia el anestro estacionario (13-14h vs. 11-12h). Robinson y Karsch (1987) comprobaron esta afirmación al transferir ovejas OVX+E₂ de 16h a 13h de luz, lo cual resultó en la estimulación de la actividad ovárica, o en el caso contrario, esta actividad fue inhibida cuando estos mismos animales fueron expuestos con anterioridad a 10h de luz por día. Debido a que un día de 13h ó 14h ocurre 2 veces al año (inicio y final del verano), estos experimentos demuestran que los animales son capaces de adaptar su ciclo fotoperiódico anual e identificar de forma inequívoca el significado de la variación de la luz del día, por lo que es importante conocer esa experiencia fotoperiódica para poder determinar su estado reproductivo. Sin embargo, esto no ocurre con otras hormonas, por ejemplo la prolactina, en donde la experiencia fotoperiódica no afecta su secreción (Lincoln, 1999).

De este modo, y utilizando como modelo experimental las ovejas pinealectomizadas y OVX+E₂, y bajo el criterio de que las ovejas sin glándula pineal responden en función de su historia fotoperiódica previa a la citada pinealectomía,

Malpaux *et al.* (1989) y Wayne *et al.* (1990) consiguieron describir gráficamente el ritmo circanual endógeno de reproducción y su regulación por el fotoperiodo, tal y como se expone en la Figura 7. La validez de este modelo se ha propuesto a partir de resultados obtenidos en la oveja y su validez debería poder ser manifestada en otras especies estacionales, como la caprina.

Figura 7. Modelo de la regulación de la estacionalidad sexual en la oveja (más detalles en el texto). Acción del fotoperiodo para sincronizar el ritmo endógeno (~); acción inhibitoria del fotoperiodo (-); acción estimulante del fotoperiodo para mantener la actividad reproductiva con una duración normal (+) (adaptado de Malpaux *et al.*, 1989).



El aumento de la longitud del día, desde el solsticio de invierno hasta el solsticio de verano, es fundamental para el inicio de la actividad sexual, de manera que la duración de la exposición a este fotoperiodo creciente determina el momento de inicio de la estación reproductiva (sincronización, ~). Además, los días largos también parecen suprimir activamente la función reproductiva en torno al momento del solsticio de verano (-). el fotoperiodo decreciente, desde el solsticio de verano al equinoccio de otoño, no es un requisito para el inicio de la estación sexual en su momento habitual, pero proporciona las señales fotoperiódicas necesarias para que la estación reproductiva que va a comenzar tenga una duración normal (Malpaux *et al.*, 1989; Wayne *et al.*,

1990; Woodfill *et al.*, 1991), además de constituir un importante estímulo para lograr la máxima expresión de la actividad neuroendocrina que se produce al principio de la estación sexual. Por último, el fotoperiodo decreciente que tiene lugar desde el equinoccio de otoño al solsticio de invierno parece jugar un papel importante en la ruptura de la fotorrefractoriedad a los días largos, asegurando que la oveja responda al subsiguiente incremento de la duración del día que sincronizará la estación sexual del año siguiente (+). De hecho, el eje neuroendocrino es insensible a una señal de días largos iniciada tras el equinoccio de otoño y finalizada antes del solsticio de invierno, y seguida de días cortos (Sweeney *et al.*, 1997). Como información complementaria a estos aspectos, Woodfill *et al.* (1991) mostraron que ovejas pinealectomizadas no tratadas con melatonina presentaban una actividad reproductiva asincrónica respecto a hembras enteras, concluyendo que, si bien la glándula pineal es necesaria para la sincronización del ritmo, no lo es para la generación del mismo.

Además, los días largos que ocurren tras el solsticio de invierno, son los encargados de sincronizar el momento de inicio de la actividad sexual y esto se basa en que la información fotoperiódica de los días largos de primavera sincronizan el ritmo endógeno para que la actividad reproductiva se inicie en el otoño, mientras que los días cortos de invierno serían responsables de mantener esta actividad. Entonces, a lo largo del anestro estacionario se dan lugar dos situaciones fotoperiódicas distintas: el inicio de dicho periodo se produce como consecuencia de una fotorrefractoriedad a los días cortos, mientras que a partir de la mitad del mismo predomina la sensibilización a los efectos inhibidores de los días largos y crecientes antes del solsticio de verano.

Por otro lado, es necesario señalar que existen otros factores que pueden modular los efectos del fotoperiodo y alterar el momento de inicio de la estación sexual. En este sentido, ovejas pinealectomizadas eran capaces de responder a factores sociales tales como la presencia del macho o de hembras enteras (Wayne *et al.*, 1990). Así, también se ha demostrado la existencia de una plasticidad neuronal y los genes reloj que otorgan al animal la capacidad de predecir los cambios que podrían suceder a lo largo de año siguiendo un mecanismo autónomo y que serán explicados más adelante en este capítulo.

2.2.3.2. LA FOTORREFRACTARIEDAD

En muchas de las especies estacionales, una prolongada exposición a fotoperiodos constantes induce un estado de fotorrefractoriedad, causando una reversión espontánea de la condición fisiológica previa (Lincoln *et al.*, 2005). En la oveja, varios autores han aportado que la fotorrefractoriedad, tanto a los días cortos como a los días largos, juega un papel primordial en la regulación de la actividad reproductiva durante la transición de una estación a otra (Robinson y Karsch, 1984; Robinson *et al.*, 1985).

Este es el primer paso para saber que existe un ritmo interno o ritmo circadiano, cuyos cambios sincronicen el ritmo de la reproducción (Malpaux *et al.*, 1996). Como ya se explicó anteriormente, la actividad sexual no comienza por el estímulo del acortamiento de los días tras el solsticio de verano, sino que lo hace porque el animal se vuelve refractario al efecto negativo de los días largos que ha estado experimentando desde el solsticio de invierno (Robinson *et al.*, 1985; Malpaux *et al.*, 1989). Del mismo modo, el final de la época de actividad sexual no se debe al efecto inhibitorio de los días largos, sino a que el animal entra en un estado de fotorrefractoriedad a los días cortos a los que se encuentra sometido desde el solsticio de verano (Robinson y Karsch, 1984).

Esta fotorrefractoriedad ha sido ampliamente estudiada en la especie ovina, pero los estudios referentes a los estados refractarios en la especie caprina son limitados y con resultados bastante variables. Así, cabras sometidas a fotoperiodo de días largos durante 7 meses reactivaron su actividad ovulatoria de manera cíclica, y la fotorrefractoriedad a los días cortos ocurrió con más de 300 días de exposición (Mori *et al.*, 1984). Contrariamente a esta afirmación, en otros estudios, se observó una fotorrefractoriedad a los 120 días de exposición corta, siendo la respuesta igual de los mismos animales al ser expuestos permanentemente a días largos (Chemineau *et al.*, 1992b).

Con el fin de esclarecer si el inicio de la actividad ovulatoria en la especie caprina es consecuencia del efecto estimulador de los días cortos o de la fotorrefractoriedad a los días largos; o en el caso contrario, si el inicio del anestro estacionario es por el efecto inhibitorio de los días largos o la fotorrefractoriedad a los días cortos, Gómez-Brunet *et al.* (2010) y Delgadillo *et al.* (2011) demostraron que el final de su actividad reproductiva se debe a que los animales entran en un estado de fotorrefractoriedad a los días cortos del invierno y no como consecuencia del efecto

inhibitorio de los días crecientes tras el solsticio de invierno y que el inicio de la actividad reproductiva se produce porque los animales entran en un estado de fotorretractariedad a los días largos del verano y no por los días decrecientes tras el solsticio de verano. Lo que sugiere que existe un ritmo endógeno que regula los cambios reproductivos estacionales.

De todos modos, Gómez-Brunet *et al.* (2010) proponen que la respuesta al fotoperiodo, varía con la raza e incluso con la especie. Así, en razas ovinas de latitudes altas (>52°N), que son muy estacionales, se ha observado que el fin de la actividad reproductiva no se ve afectada por mantener a esos animales bajo un fotoperiodo constante de días cortos (Robinson y Karsch 1984; O'Callaghan *et al.*, 1992), mientras que en latitudes más bajas (39-40°N), donde las razas son menos estacionales, el comienzo del anestro se retrasa cuando esas ovejas son mantenidas en condiciones de fotoperiodo de días cortos constantes (Minton, 1990). Incluso, estos mismos autores, han observado diferencias en la respuesta a este fotoperiodo, sobre el inicio del anestro, entre el muflón y la oveja de raza Manchega en la misma latitud (Gómez-Brunet *et al.*, 2001; 2002). De manera que el comienzo del anestro en la oveja Manchega se ve retrasado en esas condiciones, pero no en el caso del muflón (Gómez-Brunet *et al.*, 2010). Este hecho podría venir dado porque existen importantes diferencias en la estacionalidad reproductiva entre ambos (Santiago-Moreno *et al.*, 2000).

En este sentido, la cabra, a diferencia de la oveja, es mucho más estacional, independientemente de su raza u origen, mostrando una estacionalidad reproductiva similar a las ovejas de latitudes altas, lo que parece ser, les hace responder de diferente manera cuando se las mantiene en un fotoperiodo de días cortos. De este modo, la cabra Malagueña responde de manera similar al muflón, no modificándose el inicio del anestro estacionario (Gómez-Brunet *et al.*, 2010). Por todo ello, parece que las diferencias genóticas en la estacionalidad reproductiva podrían estar relacionadas con la respuesta a la refractariedad a los días cortos, de manera que sería, probablemente, el mecanismo fisiológico más importante en la regulación del inicio del anestro estacionario en razas con una elevada estacionalidad reproductiva, pero no en razas menos estacionales (Gómez-Brunet *et al.*, 2010).

Al contrario de lo descrito hasta ahora, tanto la cabra (Gebbie *et al.*, 1999; Arellano *et al.*, 2001; Gómez-Brunet *et al.*, 2010) como la oveja (O'Callaghan *et al.*, 1992; Gómez-Brunet *et al.*, 2002) cuando son mantenidas en fotoperiodo de días largos,

comienzan su actividad reproductiva en el mismo momento que aquellos animales a los que no se les ha sometido a dicho fotoperiodo, por lo que en ambas especies, la refractariedad a los días largos podría estar implicada en el comienzo del periodo de actividad reproductiva (Gómez-Brunet *et al.*, 2010).

2.3. LA MELATONINA

2.3.1. INTRODUCCIÓN

La importancia de la glándula pineal en la fisiología circadiana ha sido evidenciada con los más de 1.000 trabajos de investigación realizados en la última década (Borjigin *et al.*, 2012), los cuales sería imposible de abarcar en un solo capítulo. La glándula pineal es considerada como el nexo de unión entre el fotoperiodo y el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal (Reiter, 1980), ya que es la glándula responsable de transportar el mensaje fotoperiódico al sistema reproductivo a través de la secreción de melatonina.

La melatonina, también llamada N-acetil-5-metoxitriptamina fue descubierta por Lerner *et al.* (1958). Es una indolamida de color amarillo claro y con un punto de fusión entre los 116°C-118°C (Szmuszkovicz y Heinzelman, 1960); es muy poco soluble en agua, aunque sí lo hace en etanol, permitiendo su paso por las capas celulares por difusión pasiva (Pautler y Hall, 1987). Además de participar en la función reproductiva (Goldman, 2001; Malpaux *et al.*, 2001; Revel *et al.*, 2009), también le han sido atribuidos roles en el control del sueño (Cajochen *et al.*, 2003), en enfermedades degenerativas y ciertos cánceres (Bartsch y Bartsch, 2006; Reiter *et al.*, 2007), en la diabetes (Nishida, 2005; Peschke y Muhlbauer, 2010) y otras muchas funciones (Watson, 2011).

Desde hace algunos años se han venido realizando estudios acerca de los mecanismos centrales y locales que regulan la amplitud, ritmos y tiempo de síntesis de melatonina en la glándula pineal de los mamíferos (Zarazaga *et al.*, 2000; Goldman, 2001; Malpaux *et al.*, 2001; Revel *et al.*, 2009). Esto ha permitido demostrar la importancia de la pineal como responsable de la recepción final de la longitud del día y de la transformación de esta señal visual a hormonal mediante la secreción de melatonina, además de la generación de conceptos nuevos como los que serán tratados más adelante en este apartado.

2.3.2. LA GLÁNDULA PINEAL

Denominada también epífisis en referencia a su nombre en latín *epiphysis cerebri*, es el órgano principal de secreción de melatonina. Su descripción se remonta 200 años a.C. en la antigua Grecia, donde el médico Galeno (130-200 años d.C.), la consideró como una glándula que contenía numerosos vasos sanguíneos, a la vez que era rodeada y apoyada por un tejido compacto (Arendt, 1995). Siglos más tarde, en 1662, el filósofo francés Descartes describió a la glándula pineal como “el centro del alma”, a través del movimiento del espíritu humano, recogiendo la información del cuerpo y controlándolo desde allí (Collin *et al.*, 1988). Además, Descartes llegó a afirmar que la función pineal era activada por los estímulos visuales de la retina, intuición que resultó ser correcta y demostrada mucho tiempo después. La comparación anatómica del órgano parietal fotosensorial de los vertebrados inferiores con la glándula pineal de los mamíferos permite aprender de la historia evolutiva de este órgano y evidenciar la influencia constante de la luz en su funcionamiento, que puede ser de forma directa o indirecta.

2.3.2.1. POSICIÓN, MORFOLOGÍA Y ANATOMÍA

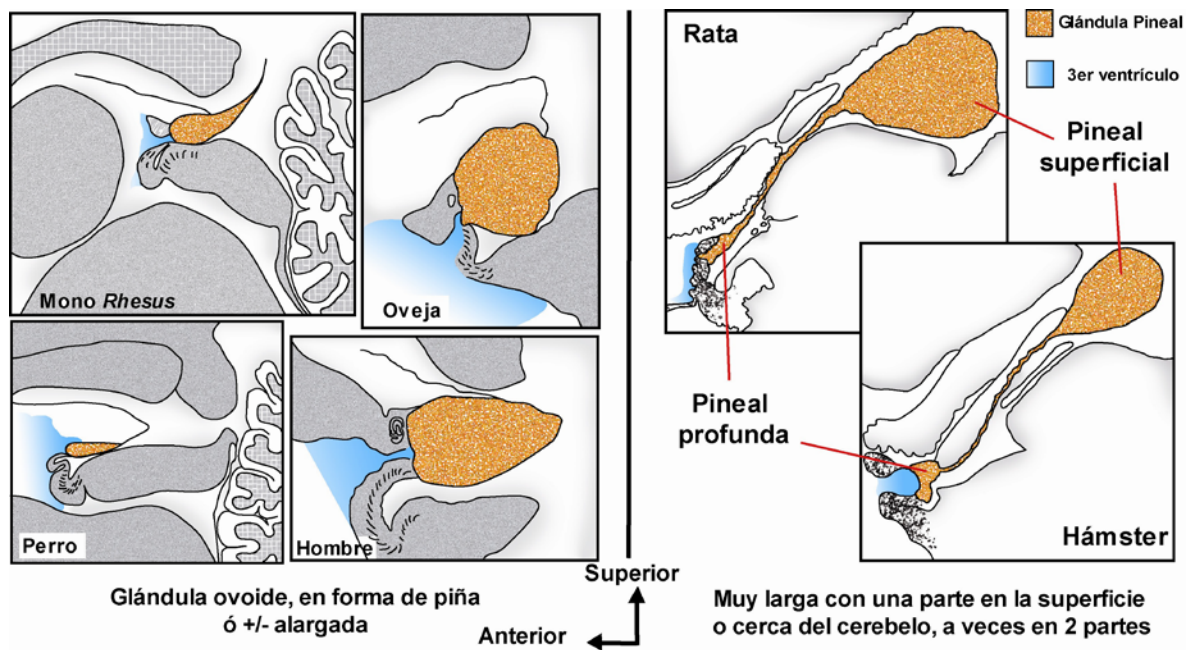
La glándula pineal es una estructura cerebral neuroendocrina única situada en la línea media del cerebro, y cuya principal función es la de traducir la información de luz y oscuridad a toda la fisiología del cuerpo, vía liberación de la hormona melatonina (Arendt, 1995). Se desarrolla a partir de una evaginación de la bóveda del ventrículo medio y se localiza en el techo del tercer ventrículo (3^{er}V), por debajo del rodete del cuerpo calloso y entre los dos tubérculos cuadrigéminos anteriores, que forman una pequeña depresión triangular llamada lecho de la glándula pineal, siendo su origen embrionario común en todas las especies mamíferas.

Su función principal es la síntesis rítmica de melatonina siguiendo el ciclo día/noche. Para ello, la glándula pineal cuenta con una estrecha relación, por una parte, con el sistema nervioso que le aporta la información luminosa proveniente de la retina para controlar los mecanismos de síntesis de melatonina, y por otra parte, la circulación sanguínea a través de la cual la glándula pineal difunde su mensaje hormonal traduciendo la información fotoperiódica. Debido a su origen anatómico, la glándula

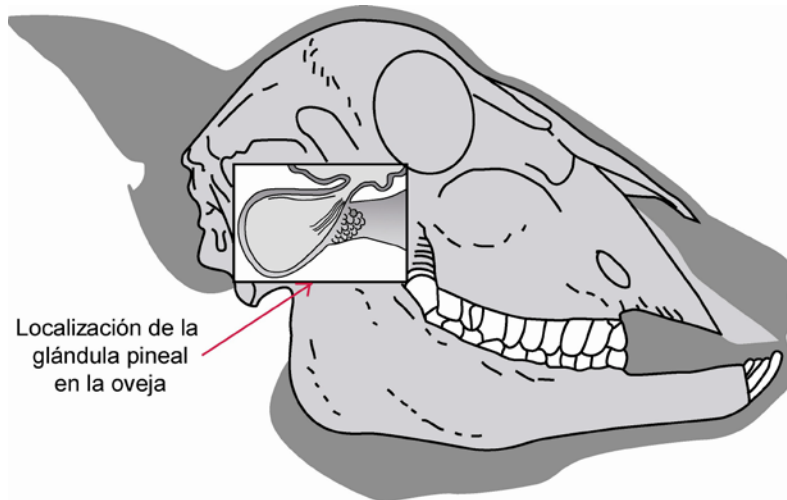
pineal está ligada al sistema cerebroventricular: es parte del techo del 3^{er}V, pero la naturaleza del intercambio con este sistema aún es desconocido (Tricoire, 2002).

Vollrath (1981) realizó una clasificación de los diferentes tipos de glándula pineal en los mamíferos, según su posición con respecto al 3^{er}V, en tres tipos principales (ver Figura 8):

Figura 8. Representación esquemática de la glándula pineal en diferentes especies en función del tipo morfológico y su posición a nivel de la cabeza del caprino [(adaptado de Vollrath (1981) y Clarke (2002)].



Localización de la glándula pineal en la cabeza de la cabra



- a. Tipo A o Proximal, donde la glándula pineal tiene forma ovoide (oveja, cabra, topo, tejón, erizo) o forma de piña (primates, incluyendo al hombre, marsupiales). En este caso, está conectada a la comisura habenular con un tallo grueso, que se inserta en una parte del 3^{er}V, llamado *recessus* pineal. Este tipo de glándula se encuentra al lado del 3^{er}V.
- b. Tipo AB o Próximo-Intermedio, en la cual la glándula pineal está estirada, siendo su longitud al menos el doble de su anchura (caballo, mula, burro, vaca, cerdo, perro). El *recessus* pineal aparenta ser insignificante en comparación con el volumen de la misma glándula, a diferencia de la glándula tipo A.
- c. Tipo ABC o Próximo-Intermedio-Distal, en este caso la glándula pineal es muy larga y una parte significativa de los tejidos de la superficie pineal aparecen yuxtapuestos en el cerebelo (rata, ratón, cobaya, conejo). La glándula también puede estar formada por dos partes unidas por un tallo largo. A continuación está compuesto de una “pineal profunda” adyacente al 3^{er}V y a una “pineal superficial” ubicado cerca de la duramadre (hámster, jerbo).

Otras dos características morfológicas de la glándula pineal a ser consideradas son el peso y el volumen, cuyas medidas han sido utilizadas desde hace tiempo como índices de la actividad funcional de la glándula pineal y provocando una mayor o menor producción de melatonina (Coon *et al.*, 1999; Gómez-Brunet *et al.*, 2002) y variando de manera sensible según la latitud. Por ejemplo, la glándula pineal es más voluminosa en roedores en lugares con menor exposición al sol en comparación de aquellos que se encuentran más cerca al ecuador (Legait *et al.*, 1973). Del mismo modo, las focas que habitan cerca del círculo polar ártico tienen una glándula pineal mucho más grande que la mayoría de los mamíferos (Stokkan *et al.*, 1995).

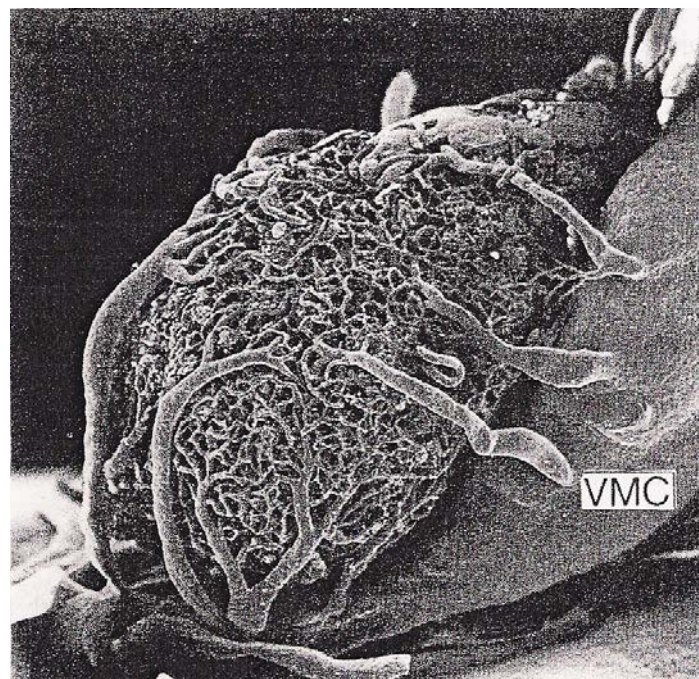
Los pinealocitos son componentes de las células fotorreceptoras que forman el órgano pineal en los peces, anfibios, reptiles y aves, cuya función es informar directamente al sistema nervioso central de la duración del día por vía nerviosa (Collin *et al.*, 1988; 1989). Con la evolución, los pinealocitos de los mamíferos y las serpientes perdieron su fotosensibilidad, y su conexión nerviosa directa con el córtex cerebral es a través de prolongaciones citoplasmáticas, con función neurosecretora, orientadas a los capilares sanguíneos en donde se libera el mensaje hormonal, la melatonina. En los mamíferos, la glándula pineal está constituida en más del 90% por pinealocitos y en los

humanos puede contener seis tipos diferentes (Vollrath, 1981). Además, de los pinealocitos, la glándula pineal está constituida por células *gliales* que cumplen la función de soporte de las neuronas, células fagocitarias y neuronas de otro tipo (Malpaux, 2006).

2.3.2.2. VASCULARIZACIÓN

La glándula pineal está fuertemente vascularizada por una densa red arterio-venal, siendo muy difícil de ver debido a su pequeño diámetro como se muestra en la figura 9 (Duvernoy *et al.*, 2000). El flujo sanguíneo a ese nivel está estimado en 4 ml/min/g, en segundo lugar después del de los riñones (Arendt, 1995). La sangre es llevada a la glándula pineal por las arterias del plexo coroideo (arterias coroideas posteriores), las cuales provienen de las arterias posteriores conocidas como arterias pineales laterales o rostrales, pasa a través de una red de capilares de la glándula para luego unirse a una red de venas cerebrales internas que se unen en el vértice de la glándula pineal antes de llegar a la vena de Galeno o vena magna cerebral (Duvernoy *et al.*, 2000).

Figura 9. Drenaje venoso de la glándula pineal de la rata en el microscopio electrónico de barrido. VMC: Vena magna cerebral o vena de Galeno (Arendt, 1995).



Este sistema constituye un complejo venoso profundo que drena a las venas del cerebro y del cerebelo. El drenaje venoso pineal se efectúa por las venas pineales laterales (derecha e izquierda), actuando en la superficie de la glándula y lanza una vena pineal mediana que drena dicho complejo venoso en la vena magna cerebral (Duvernoy *et al.*, 2000). Esta fuerte densidad de capilares de la pineal, y alrededor de la misma, explica el hecho de que los cambios de actividad secretora de la glándula a lo largo del día se reflejen tan rápidamente en la circulación periférica.

2.3.3. TRANSMISIÓN DE LA SEÑAL FOTOPERIÓDICA

2.3.3.1. DEL OJO A LA GLÁNDULA PINEAL

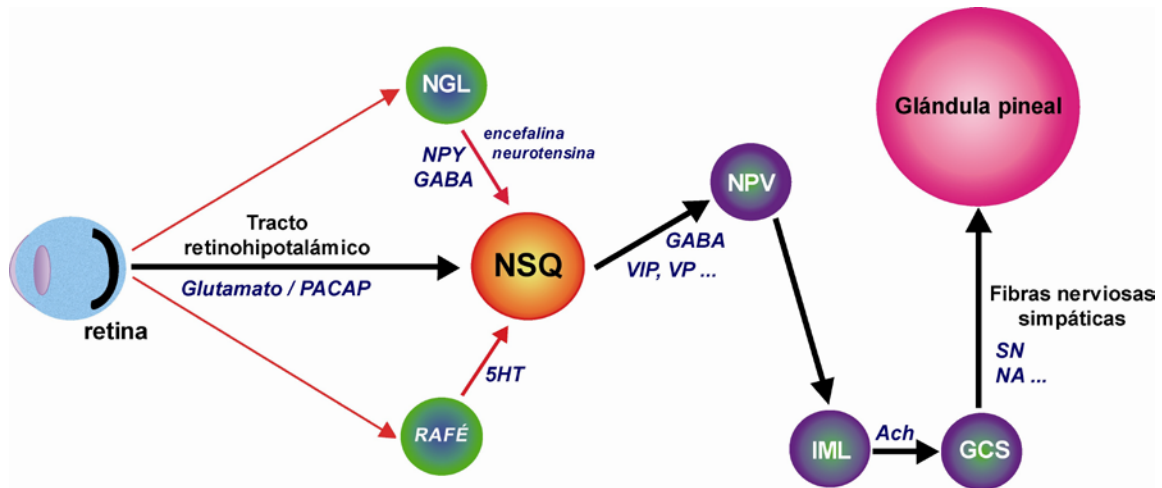
La información fotoperiódica que regula la síntesis de melatonina se transmite desde la retina hasta la glándula pineal mediante una vía multisináptica que incluye el reloj interno (los núcleos supraquiasmáticos, NSQ). A partir de la retina, la información es transmitida a los NSQ vía el tracto retinohipotalámico. Posteriormente, esta señal pasa a los núcleos paraventriculares (NPV), y mediante unas células que se localizan en la médula espinal torácica, la señal nerviosa llega finalmente al ganglio cervical superior (GCS), para terminar en la glándula pineal (Tamarkin *et al.*, 1985) (Figura 10). Una vez allí, la información se traduce en una respuesta hormonal, a través de un ritmo de secreción de melatonina de 24 horas, con niveles elevados durante la noche y basales durante el día (Chemineau *et al.*, 1992b).

- TRACTO RETINO-HIPOTALÁMICO

El tracto retino-hipotalámico proviene de un subconjunto de células ganglionares de la retina y se proyecta directamente a los NSQ (Moore y Lenn, 1972; Moore, 1995). Es una vía monosináptica, anatómica y funcionalmente diferente a la utilizada por la visión, en la cual la información luminosa es captada y transmitida al cerebro no visual a través del nervio óptico hasta llegar a los NSQ. Se han realizado experimentos en donde una lesión global del nervio óptico puede conducir a la ceguera total y a un estado de desincronización (*free running*) de los ritmos circadianos (Morin y Cummings, 1981), mientras que una lesión selectiva en el tracto retino-hipotalámico

conduce a una “ceguera circadiana” en parte de la visión (Johnson *et al.*, 1988). En los últimos años se ha identificado a la melanopsina, una molécula que forma parte de los fotopigmentos, y que podría estar involucrada en las reacciones celulares iniciales de percepción inicial de la luz y que continúan con el proceso de transmisión de la información fotoperiódica (Provencio *et al.*, 2000).

Figura 10. Representación esquemática simplificada de las vías nerviosas entre el ojo y la glándula pineal. 5HT: serotonina; Ach: acetilcolina; GABA: ácido γ -aminobutírico; GCS: ganglio cervical superior; IML: columna intermediolateral de la espina dorsal; NA: noradrenalina; NGL: núcleo geniculado lateral; NPY: neuropéptido Y; NPV: núcleo paraventricular; NSQ: núcleo supraquiasmático; PACAP: polipéptido activador de la adenilato ciclasa; RAFÉ: núcleo del rafé; SN: secretoneurina; VIP: péptido vasopresor intestinal; VP: vasopresina (adaptado de Simonneaux y Ribelayga, 2003).



Dentro de esta importante red de transmisión en el tracto retinal-hipotalámico de la glándula pineal, en los mamíferos existe una compleja red de innervación siendo dos vías las más importantes a considerar (Arendt, 1995): la *innervación periférica simpática*, es la principal vía nerviosa que determina la producción de melatonina. Las fibras nerviosas que innervan la glándula pineal provienen del GCS y están controladas por los NSQ. El GCS constituye el último eslabón nervioso de la información luminosa percibida por los mamíferos. Estas fibras nerviosas ejercen el principal control de la síntesis de melatonina y si se cortan dichas fibras o se realiza una ganglionectomía se elimina el control día/noche de la síntesis de dicha hormona (Arendt, 1995). En segundo lugar, la *innervación central* funciona como complemento a la innervación simpática periférica en la recepción de las aferentes nerviosas provenientes de diferentes regiones

cerebrales. El NPV actúa como un interruptor en la transmisión simpática de la información fotoperiódica, proyectando las fibras nerviosas directamente en la glándula pineal (Arendt, 1995). Independientemente de la vía retinohipotalámica que sirve de enlace entre la retina y los NSQ, existe también un enlace nervioso directo entre la retina y la glándula pineal, siendo el responsable de recibir la información sensorial de las células ganglionares de la retina y del mantenimiento del reflejo pupilar a la luz (Arendt, 1995).

- NÚCLEOS SUPRAQUIASMÁTICOS

Los NSQ están localizados en la parte anteroventral del hipotálamo y son “el sitio cerebral del reloj interno circadiano de los mamíferos”. Una lesión a nivel de los NSQ conduce a la desaparición de la mayoría de los ritmos circadianos (Tessonnaud *et al.*, 1995), mientras que el trasplante de un órgano donante restaura el ritmo circadiano de actividad, utilizando el periodo endógeno del animal donante (Turek *et al.*, 1984; Ralph *et al.*, 1990; Silver *et al.*, 1996; LeSauter y Silver, 1998). Esto vendría a indicar que los NSQ intervienen en la funcionalidad de la glándula pineal, y la recuperación parcial de la secreción del ritmo de melatonina demostraría que existen otras estructuras involucradas en esta función rítmica.

El ritmo circadiano producido por los NSQ se sincroniza con un ritmo día/noche, que se corresponde a 24 horas, gracias a la información luminosa procedente de los nervios ópticos. Los NSQ transmiten la información luminosa y/o el ritmo endógeno, provenientes de sus osciladores espontáneos, a través de las numerosas conexiones a las estructuras cerebrales de la glándula pineal, y están formados por numerosas neuronas que tienen un ritmo eléctrico individual, según observaciones de muestras de estas neuronas dispersadas *in vitro*. De esta forma, cada neurona es un oscilador cuya sincronización en los NSQ causa un ritmo global único, cuyo periodo es la media del tiempo de vida de cada neurona (Welsh *et al.*, 1995).

2.3.3.2. LOS GENES RELOJ (*CLOCK GENES*)

El ritmo circadiano depende de una serie de factores ambientales, pero no solamente de ellos, sino también de aquellos que se encuentran bajo un fuerte control

genético. Los genes reloj o genes *clock* (*clock genes*) constituyen una parte importante del ritmo circadiano y el estudio de estos ritmos internos han demostrado que su expresión rítmica es general para varias familias de genes, tanto en plantas como en animales (Ripperger y Schibler, 2001). A partir de técnicas de laboratorio, la identificación de los genes reloj parte de la asociación de la pérdida de un ritmo circadiano y una mutación natural o provocada (Chang y Reppert, 2001). Estos genes se expresan de forma cíclica y su número, así como su tiempo de inducción y estabilidad, son los que regulan el tiempo necesario para que se produzca la expresión de un ciclo del gen, que ajustado a un ritmo circadiano, sería de 24 horas (Ko y Takahashi, 2006).

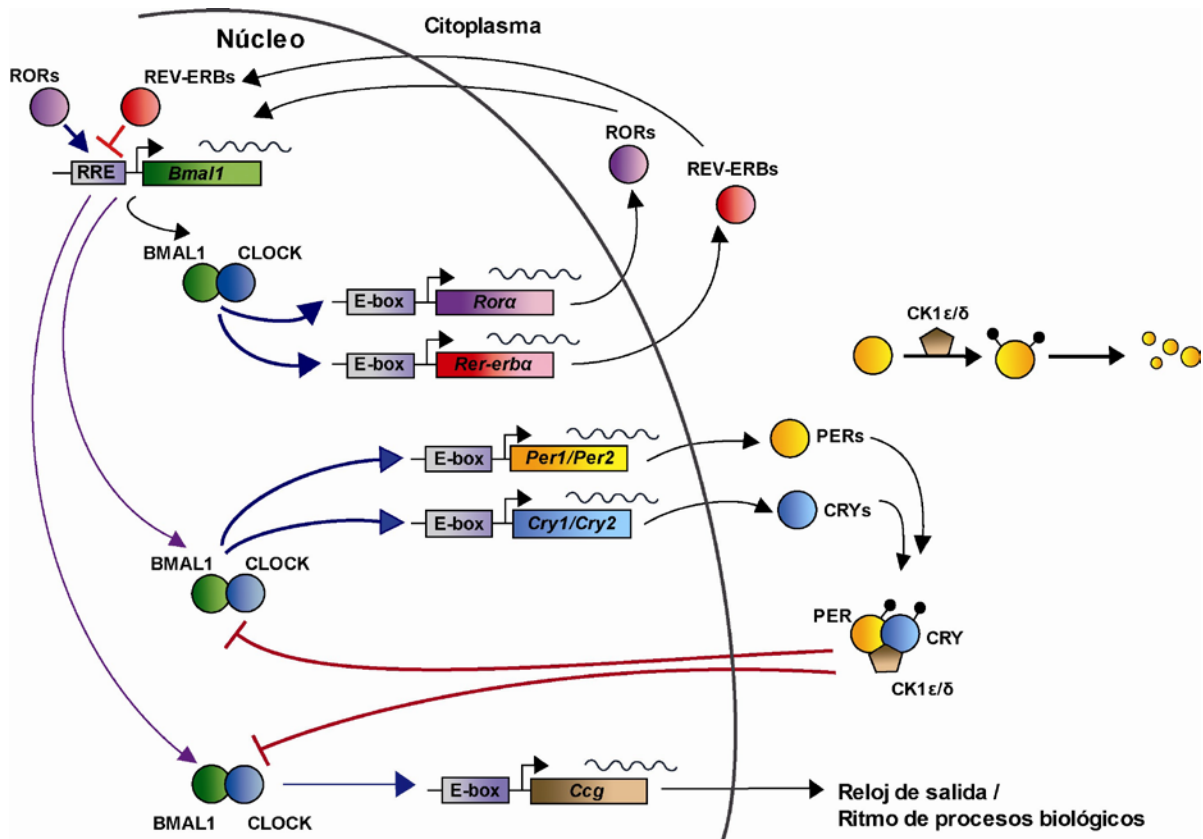
Los primeros genes reloj en ser identificados y clonados fueron el gen *Period* (Per) en la mosca *Drosophila*, y el *Frequency* (Frq) en el hongo *Neurospora* (Reddy *et al.*, 1984; McClung *et al.*, 1989). Su identificación en los mamíferos podría decirse que ocurrió de forma fortuita, a partir de observaciones realizadas en hámsteres, en donde se descubrió la presencia de un periodo endógeno, temperatura corporal y actividad motriz mucho más corto de los que se había observado hasta el momento (Ralph y Menaker, 1988). Al llevarlo a una situación de homocigosis, este periodo endógeno resultó ser de 20 horas en lugar de 24 horas. Trabajos posteriores con este gen, en ratones, demostraron que era posible alargar el periodo circadiano, dándosele el nombre de gen *clock*.

Posteriormente, trabajos realizados en ratones, descubrieron la existencia de otros genes que podrían estar involucrados en la regulación de los ritmos circadianos. Así, en los NSQ del ratón, se han logrado identificar los siguientes genes: *Bmall*, *Periodo* o *PER* (que son tres genes: *Per1*, *Per2* y *Per3*) y *Criptocromo* o *CRY* (dos genes: *Cry1* y *Cry2*), que muestran una relación muy estrecha con el gen *Clock*. La proteína *Clock* interactúa con *Bmall*, y juntos regulan a las proteínas *Per* y *Cry*, lo cual ha permitido la identificación de otros genes, hasta ahora alrededor de 12 genes han sido identificados (Lincoln *et al.*, 2003). Estas interacciones, que ocurren a nivel de los NSQ de los mamíferos, las podemos observar en la figura 11.

La generación de este ritmo involucra dos bucles o *feedback* de control, que son del tipo hélice-bucle-hélice, constituyendo un factor de transcripción de señales. El primer bucle de retrocontrol implica a los elementos activadores que son las proteínas *Clock* y *Bmall* y que forman un heterodímero llamado *Clock/Bmall*. Una vez formado, este heterodímero inicia la transcripción de los genes *Period* (*Per1*, *Per2* y *Per3*) y

Cryptocromo (*Cry1* y *Cry2*), los cuales envían una señal *feedback* negativa que detiene la acción de *Clock/Bmal1* para completar el ciclo circadiano (Shearman *et al.*, 2000; Borjigin *et al.*, 2012).

Figura 11. *Feedback* de autorregulación negativa del reloj circadiano de los mamíferos (Ko y Takahashi, 2006).



El segundo bucle de regulación es inducido igualmente por el heterodímero *Clock/Bmal1* que va a activar la transcripción de los receptores nucleares relacionados con el ácido retinoico *Rev-erba* y *Rora*. Estos receptores entran en competición para unirse con el elemento de respuesta relacionado con el ácido retinoico, *ROREs*, que se encuentra en el promotor *Bmal1*. Ha sido demostrado que los componentes de la familia de receptores *ROR* (α , β y γ) y *REV-ERB* α (α y β) son capaces de regular *Bmal1* a través del elemento de respuesta *ROREs*. Los receptores *RORs* activan la transcripción de *Bmal1* mientras que *REV-ERB* α detiene el proceso de transcripción. La duración de estos *feedbacks* de autorregulación es de aproximadamente 24 horas y constituye el reloj molecular circadiano. Este reloj circadiano está dirigido por modificaciones post-

transcripcionales, como son las fosforilaciones (fosforilación oxidativa) y la ubiquitinaciones (la ubiquitina es una pequeña proteína que dirige el reciclaje de proteínas puesto que las marca para su destrucción o reciclaje). Por otro lado, la *Caseína kinasa 1 epsilon (CK1ε)* y *Caseína kinasa 1 delta (CK1δ)* son factores críticos que van a regular la regeneración de las proteínas del reloj (Ko y Takahashi, 2006).

Está totalmente aceptado que muchos tipos de células poseen su propio ritmo y reloj circadiano, ya que células aisladas en placas *petri* de diferentes tipos celulares mostraron oscilaciones de los genes *Clock*, incluyendo a *Per1* (Shinomura *et al.*, 2010; Welsh *et al.*, 2010). Ciertamente, la glándula pineal no es la excepción ya que la expresión de los genes *Clock* a nivel de los NSQ es más fuerte debido a su funcionamiento en red (Yoshikawa *et al.*, 2005; Maronde y Stehle, 2007). *In vivo*, los ritmos pineales son abolidos en ausencia del controlador de entradas en el NSQ, sugiriendo que los genes *Clock* locales no son suficientes para el funcionamiento normal de los ritmos pineales de melatonina y que es necesario algo más que ese gen *Clock* local para el control central del NSQ. Por otro lado, a pesar de que los NSQ son reconocidos como el sitio principal del reloj interno, estos genes reloj también se expresan rítmicamente en los tejidos periféricos y en las estructuras centrales diferenciadas (por ejemplo: *pars tuberalis*), indicando que estos sitios son susceptibles de contener sus propios osciladores del reloj interno. Estudios realizados en la oveja han descubierto que la expresión del gen *Per1*, en los NSQ y en la *pars tuberalis* de la hipófisis, tiene relación en cuanto a la producción de melatonina; así, la amplitud y el momento en que se observan las concentraciones más elevadas del ARNm de *Per1*, coinciden con las menores concentraciones de melatonina (Morgan *et al.*, 1998).

2.3.4. SÍNTESIS Y CATABOLISMO DE MELATONINA

2.3.4.1. SÍNTESIS POR LA GLÁNDULA PINEAL

A partir de la captación activa del aminoácido triptófano por la glándula pineal, la melatonina es sintetizada a través de cuatro secuencias enzimáticas que se pueden observar en la figura 12: (1) hidroxilación y descarboxilación del aminoácido triptófano en 5-hidroxitriptófano (5-HTP) por acción de la triptófano-5-hidroxilasa (TPOH); (2) síntesis de la 5-hidroxitriptamina (5-HT o también llamada serotonina) por acción de la 5-hidroxitriptófano decarboxilasa (5-HTPD); (3) formación de la N-acetil-serotonina

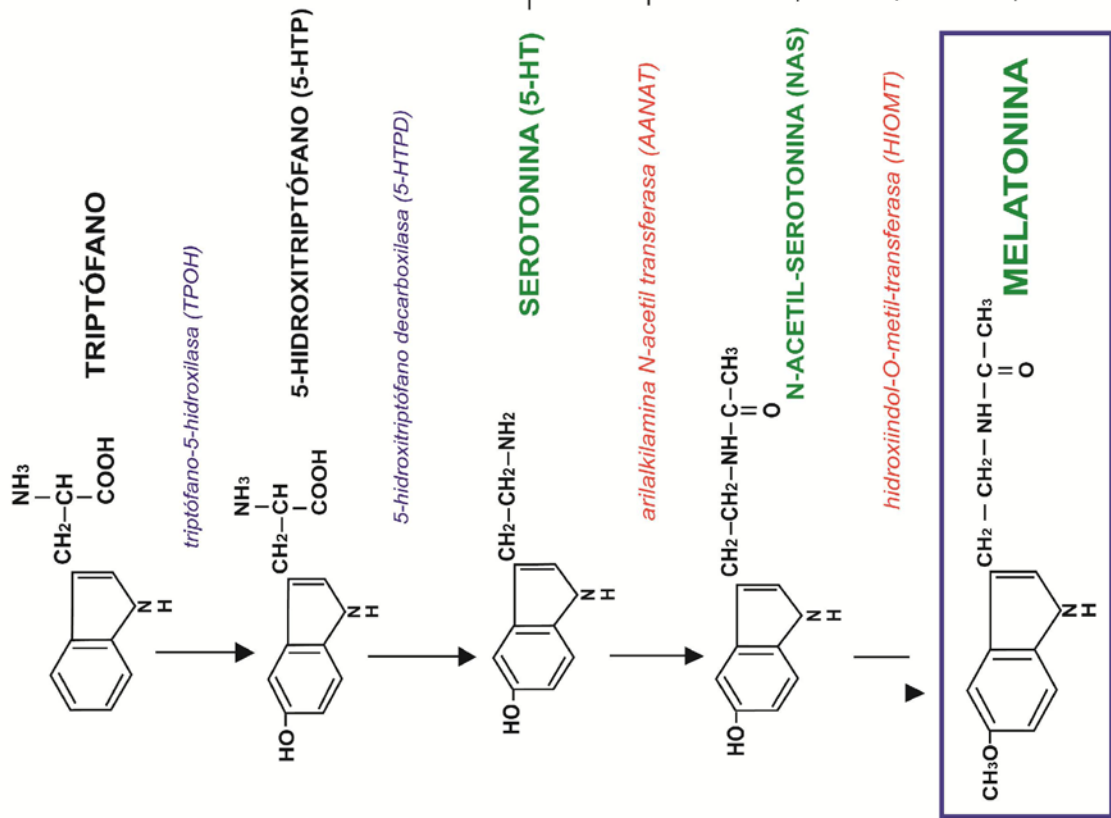
(NAS) por acción de la arilalkilamina N-acetil-transferasa (AANAT o también llamada serotonina N-acetiltransferasa); y finalmente (4) termina en la producción de melatonina por acción de la catalización de la enzima hidroxiindol-O-metil-transferasa (HIOMT) que también es conocida como N-acetilserotonina metiltransferasa (ASMT) (Borjigin *et al.*, 1999). Todas estas reacciones enzimáticas derivadas del triptófano despliegan unos ritmos circadianos de liberación, siendo sus niveles más altos durante la noche. A diferencia de la NAS y la melatonina, que apenas son detectados durante las horas del día, la serotonina y 5-HTP se encuentran en niveles altos durante el día y bajan con la llegada de la noche (Malpoux, 2001).

El triptófano, captado activamente de la circulación sanguínea, es transformado en el intermediario 5-hidroxitriptófano (5-HTP) por una enzima mitocondrial, la triptófano-5-hidroxilasa (TPOH), siendo esta enzima considerada como limitante en la síntesis de serotonina (Boadle-Biber, 1993). Posteriormente, el 5-HTP se convierte en serotonina por acción de una descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos, llamada 5-hidroxitriptófano descarboxilasa (5-HTPD). Esta enzima, que no es específica de la glándula pineal, está presente en gran cantidad en la fracción acuosa del citoplasma de los pinealocitos (Snyder y Axelrod, 1964), constituyendo un factor limitante para la síntesis de serotonina (Simonneaux y Ribelayga, 2003).

La AANAT es la enzima que cataliza la N-acetilación de la serotonina en NAS. Esta enzima se caracteriza por sus marcadas variaciones diurnas/nocturnas y su actividad está caracterizada por aumentos de más de 100 veces durante las horas de oscuridad (Klein y Weller, 1970). Es por eso que su actividad enzimática es considerada limitante para la síntesis de melatonina por la glándula pineal. La actividad de la AANAT es controlada por la noradrenalina, que es el principal neurotransmisor contenido en las fibras nerviosas simpáticas que inervan la pineal. La noradrenalina, proveniente del GCS, se une a los receptores α_1 y β de la membrana del pinealocito, que al activarse desencadenan una reacción intracelular que culmina con la expresión del ARNm para la síntesis de la AANAT. La regulación de la actividad de la AANAT difiere entre las especies (Stehle *et al.*, 2001). Estudios realizados en el ovino han mostrado que el aumento de la melatonina se puede producir sin un incremento en la actividad de la AANAT. En la rata, la estimulación noradrenérgica provoca un incremento de la actividad AANAT de 30 a 50 veces; sin embargo, en ovino y vacuno, esta actividad aumenta solamente de 3 a 5 veces. El posible mecanismo que regularía

Figura 12. Vía de síntesis de la melatonina en la glándula pineal [(adaptado de Kopin *et al.* (1961) y Malpaux (2001)], así como el ritmo de actividad de la AANAT (en rojo), y variaciones en la tasa de serotonina (5-HT), de N-acetil-serotonina (NAS) y melatonina (MEL) (en verde) durante las horas de oscuridad (área sombreada) (adaptado de Klein, 1979).

SÍNTESIS EN LA GLÁNDULA PINEAL



su secreción sería dependiente del calcio o podría deberse también a una disminución de su degradación. Si bien en la oveja la actividad nocturna de la AANAT no parece estar muy clara, en trabajos realizados por Coon *et al.* (1999), tanto en animales sacrificados durante el día como durante la noche, se ha demostrado la existencia de diferencias altamente significativas entre los niveles diurnos y nocturnos de la AANAT, ya sea en actividad o contenido. Diversos trabajos (Simonneaux y Ribelayga, 2003) sugieren que el rol principal de la AANAT es la de generar el “ritmo” diario de secreción de melatonina, más que cumplir un papel limitante.

La NAS, considerada intermediaria de síntesis entre la serotonina y la melatonina, es secretada por la glándula pineal, al igual que la melatonina siguiendo un ritmo nictemeral. Durante la noche, los niveles de NAS son mayores que los de la melatonina en la circulación, tal como muestran estudios realizados en ratas (Chattoraj *et al.*, 2009) y en humanos (Attanasio *et al.*, 1986).

La HIOMT se encarga de catalizar la transformación de la NAS en melatonina, a partir de una metilación con la S-adenosil metionina (SAM), que transfiere los grupos metilo para este caso (Pardridge y Mietus, 1980; Klein, 1999). A diferencia de la AANAT, que se caracteriza por presentar cambios rápidos en su actividad diurna/nocturna a lo largo de 24 horas, la HIOMT parece regular a largo plazo la síntesis nocturna de melatonina (Simonneaux y Ribelayga, 2003). La actividad de la HIOMT, en la oveja, no sufre oscilaciones a lo largo del periodo luz/oscuridad, si bien podría ser la enzima que controle el nivel de producción de melatonina (Figura 12) (Coon *et al.*, 1999). Su secreción, al igual que la melatonina, tiene un ritmo circadiano debido al fotoperiodo, pero de manera inversa a ella, es decir, con concentraciones elevadas durante el día y bajas en la noche, según observaciones realizadas en el ovino (Vivien-Roels *et al.*, 1999). El motivo de esta diferencia podría ser debido a que durante la noche el incremento en la síntesis de melatonina, debido a la acetilación que se produce por la acción de la AANAT de la serotonina, disminuye la disponibilidad de ésta y en consecuencia se dispone de menos serotonina para ser oxidada y transformarse en el 5-metoxitriptofol.

2.3.4.2. OTRAS FUENTES DE SÍNTESIS DE MELATONINA

A pesar de que la fuente más importante de secreción de melatonina es la glándula pineal, en los vertebrados existen otras estructuras de secreción que pueden

hacerlo por contar con los medios enzimáticos necesarios, siendo sus concentraciones muy diversas entre un órgano y otro. Entre ellos, podemos mencionar a la retina, la glándula de Harder, el tracto gastrointestinal, la glándula lacrimal y los leucocitos de la sangre (Pang *et al.*, 1993).

En la retina, la síntesis local de melatonina presenta todas las características circadianas al igual que ocurre en la glándula pineal (Cardinali y Rosner, 1971; Tosini y Menaker, 1998). Se han realizado estudios en ovinos sobre la síntesis de melatonina en la retina, siendo su secreción igualmente elevada durante la noche como ocurre en la glándula pineal (Wiechmann, 1986); incluso, una vez que dicha glándula ha sido extirpada, la retina continúa secretando melatonina e incluso se observa un efecto compensatorio en la secreción, lo que se puede entender como un posible efecto negativo de la glándula pineal sobre la síntesis de melatonina en la retina (Yu *et al.*, 1981). Esta secreción sigue un ritmo endógeno, incluso manteniendo a los animales en constante oscuridad éstos eran capaces de liberarla, aunque con un ritmo diferente al de 24 horas (Ebling, 2010).

A nivel del tracto gastrointestinal, ha sido demostrada la síntesis local de melatonina por las células de su epitelio (llamadas enterocromafines), debido a que contienen más del 90% de la serotonina del cuerpo (Raikhlín *et al.*, 1975; Raikhlín y Kvetnoy, 1976). Además, el tamaño del tracto gastrointestinal y las concentraciones de melatonina medidas sugieren que la cantidad total de melatonina producida es unas 400 veces superior a la producida por la glándula pineal (Huether, 1993).

Es importante recalcar que mientras que la síntesis en la retina y en la glándula pineal es regulada por la alternancia día/noche, la síntesis en el tracto digestivo no sigue este patrón, siendo regulada por la periodicidad de la ingestión de alimentos (Bubenik, 2002).

Las enzimas implicadas en la síntesis de melatonina también se han identificado en los linfocitos humanos y su síntesis local está probablemente implicada en la regulación del sistema inmunitario (Carrillo-Vico *et al.*, 2004). También se especula que es consumida localmente por los tejidos, cumpliendo una función protectora contra el estrés oxidativo (Tan *et al.*, 2003). Además de consumirse, una parte probablemente también se une a proteínas para su almacenamiento (Lahiri *et al.*, 1999). Otras síntesis locales, por la presencia de ARNm de las enzimas de síntesis, se han evidenciado a nivel de la piel (Slominski *et al.*, 2002; Fischer *et al.*, 2006), en el timo de fetos de rata

(Jiménez-Jorge *et al.*, 2005), las gónadas (Tijmes *et al.*, 1996) o las plaquetas (Champier *et al.*, 1997).

2.3.4.3. DEGRADACIÓN DE LA MELATONINA.

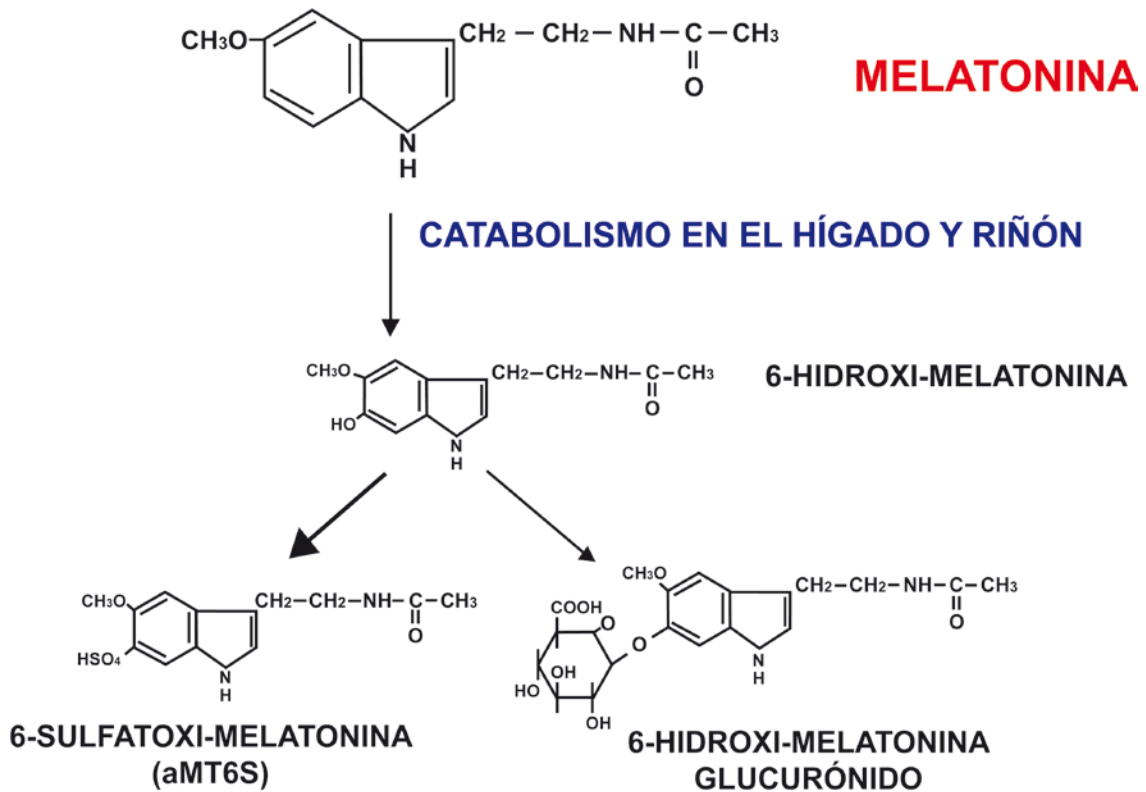
Diversos estudios cinéticos han demostrado que la melatonina sanguínea, administrada ya sea por vía intravenosa o subcutánea, es eliminada progresivamente, con una vida media variable en humanos (44 minutos), macaco *rhesus* (30-35 minutos) (Yeleswaram *et al.*, 1997; Yu y Reiter, 1993), rata y perro (20-24 minutos) (Gibbs y Vriend, 1981), hámster y conejo (13-14 minutos) (Bechgaard *et al.*, 1999) y oveja (17,8 minutos) (Zarazaga *et al.*, 1998a, b).

La principal vía de catabolismo de la melatonina sanguínea, tanto en roedores (Kopin *et al.*, 1961) como en humanos (Jones *et al.*, 1969) y en ovino (English *et al.*, 1987) es la hidroxilación a nivel hepático y renal (Arendt, 1995). Por lo tanto, los niveles de melatonina que en realidad llegan al cerebro, es decir, por las arterias carótidas son realmente muy inferiores a los niveles que son medidos en la periferia.

En el hígado, la melatonina en primer lugar es hidroxilada en 6-hidroxi-melatonina, para excretarse por la orina en forma conjugada sulfatada o glucosilada, llamada 6-sulfatoxi-melatonina (aMT6S) (Figura 13), que representa el 90 % de la cantidad eliminada; mientras que su eliminación conjugada como glucurónido resulta ser minoritaria, al menos en estudios realizados en los humanos (Claustrat *et al.*, 2005). La aMT6S urinaria es utilizada en clínica humana para estudiar la actividad de la glándula pineal, existiendo una correlación entre la síntesis de melatonina y la producción de aMT6S en la orina (Arendt, 1995; Paakkonen *et al.*, 2006; Masruha *et al.*, 2008). Otros estudios han demostrado, en roedores y humanos (Leone y Silman, 1984; Young *et al.*, 1985), que la misma NAS, precursora de la melatonina, también puede ser un metabolito de la misma.

Otras formas de eliminación pueden ser a través de los tejidos neuronales, tales como la retina y la glándula pineal. En estos tejidos la melatonina es desacetilada a 5-metoxitriptamina por la melatonina-deacetilasa, que es una enzima específica de la melatonina, o también por la aril-acilamidasa, que es menos específica (Hardeland *et al.*, 1993).

Figura 13. Catabolismo de la melatonina por las vías hepática y renal [(adaptado de Kopin *et al.* (1961) y Malpaux *et al.* (2001)].



En el cerebro, alrededor del 30% de la melatonina es degradada en kynuramina (metabolito del aminoácido L-triptófano), por la división del anillo de pirrol que es una amina aromática (Ferry *et al.*, 2005). Los dos metabolitos así formados son la N-acetil-N-formil-5-metoxikynuramina (AFMK) y la N-acetil-5-metoxikynuramina (AMK). Estos dos metabolitos son importantes al ser responsables de las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de la melatonina, en particular el AFMK. Esta propiedad antioxidante se debe a la acción de numerosas enzimas, pseudoenzimas y de reacciones fotocatalíticas sobre los radicales libres (Burkhardt *et al.*, 2001; Hardeland, 2005).

2.3.5. SECRECIÓN DE LA MELATONINA

2.3.5.1. RITMO DE SECRECIÓN

La producción de melatonina sigue un ritmo circadiano de secreción con concentraciones elevadas durante la noche y basales durante el día. En la especie caprina, las concentraciones plasmáticas diurnas son bajas (<5pg/ml), mientras que los niveles nocturnos son elevados, variando desde 20 hasta 135 pg/ml (Zarazaga *et al.*, 2010). En ovino, utilizando ovejas canuladas, en donde la recogida puede hacerse a intervalos más frecuentes, se mostró que la secreción es pulsátil, aunque no se ha encontrado su importancia fisiológica (English *et al.*, 1987). También se ha indicado que este modelo de secreción sufre variaciones a lo largo del año, con unos bajos niveles en verano y mayores, pero posiblemente de menor amplitud, en el invierno (Arendt *et al.*, 1981; Chemineau *et al.*, 1992b; Malpoux *et al.*, 1996; Chemineau *et al.*, 2010; Zarazaga *et al.*, 2011). Por lo tanto, la información fotoperiódica también es un reflejo de los cambios a lo largo del año, y el animal lo interpreta a través de la señal de la melatonina.

La definición de la duración del patrón de secreción de melatonina no es absoluta, ya que depende de la historia fotoperiódica del animal. La duración del periodo de secreción de melatonina refleja la duración de la noche, proporcionando al organismo la información necesaria para regular las funciones fisiológicas, no sólo las reproductivas, sino también las de la muda (Lincoln *et al.*, 1980), variaciones en el peso corporal (Plotka *et al.*, 1982), sistema inmune (Maestroni y Conti, 1993), actividad de la glándula tiroides (Vriend, 1983), el crecimiento neoplásico (Blask, 1993), actividad locomotriz (Dollins *et al.*, 1994) y los ritmos circadianos (Armstrong y Redman, 1993). Este ritmo circadiano es endógeno y está circunscrito a un periodo de 24 horas, siguiendo el ciclo luz/oscuridad, y en efecto, si los animales son mantenidos en oscuridad constante, la secreción de melatonina sigue siendo rítmica pero el periodo del ciclo es diferente a 24 horas y no está sincronizado entre individuos (Ebling *et al.*, 1988; Kumar y Lincoln, 1995).

La respuesta de este ritmo endógeno a los cambios en la duración del día, requiere un complejo conjunto de mecanismos que permita detectar tres tipos de modificaciones en la secreción de melatonina: (1) detección de la presencia de melatonina por encima de un umbral mínimo (día vs. noche); (2) detección de la

duración de la presencia de melatonina por encima de ese umbral mínimo (días largos vs. días cortos); y (3) detección de cambios en la duración de la presencia de melatonina en relación a la exposición de melatonina anterior (días decreciente vs. días crecientes).

Karsch *et al.* (1985) y Malpaux *et al.* (1988) han mostrado que los niveles plasmáticos de melatonina se elevan a los 10 minutos de desaparecer el estímulo luminoso, tanto en animales en fotoperiodo natural como en artificial. En otro estudio, realizado por Ravault y Chesneau (1999), se mostró la existencia de variaciones sobre el comienzo de secreción de melatonina tras el comienzo del periodo de oscuridad en función del fotoperiodo. Así, en animales sometidos a días largos, la secreción de melatonina empezó antes (a los 11 minutos) que cuando los animales estuvieron sometidos a días cortos (la secreción empezó a los 20 minutos.). En la oveja (Malpaux *et al.*, 1988) y en la cabra (Delgadillo *et al.*, 2001), la secreción de melatonina se caracteriza por aumentar rápidamente apenas se apagan las luces, en animales sometidos a fotoperiodo artificial, y poco después del atardecer, en animales que están en fotoperiodo natural. Cabe resaltar que también la duración de las horas de oscuridad afecta el momento de finalización de la secreción de melatonina, ya que en el caso de los días cortos, los niveles de melatonina descienden a valores basales poco antes de terminar la noche, mientras que durante los días largos, las concentraciones disminuyen incluso después del inicio de las primeras horas de luz del día (Zarazaga *et al.*, 2000; Chemineau *et al.*, 2010).

La característica principal del ritmo de secreción de melatonina, que transmite la información fotoperiódica, parece ser el tiempo y la duración de la secreción (elevados niveles a lo largo del tiempo). Así, inyectando a ovejas pinealectomizadas con infusiones de melatonina, en diferentes momentos del ciclo nocturno, la respuesta varía sólo en la duración de la infusión, y no en el momento del día (Bartness *et al.*, 1993). El rol crítico de la duración está relacionado con el hecho de que la duración de la secreción se correlaciona en forma positiva con la duración de la noche en todas las especies, sin tener en cuenta exactamente el perfil de melatonina.

También parece ser que, más que la duración de todo el fotoperiodo, un cambio en cierto momento es más importante para determinar una respuesta fisiológica. Así, al someter a los animales a un flash de luz durante la noche se inhibe la secreción de melatonina y ésta sólo se restablece cuando el flash se produce al comienzo o a mitad del periodo de oscuridad, pero no lo hace si se produce al final. Por lo tanto, estos impulsos de luz nocturnos pueden modificar la curva de secreción de melatonina, y

como consecuencia, alterar la interpretación del fotoperiodo (Kumar y Lincoln, 1995). Esto indica que la luz dirige el ritmo circadiano de secreción influenciando el comienzo y el final de la secreción de melatonina, y controlando la duración de su secreción.

Tras el aumento inicial de las concentraciones plasmáticas de melatonina, éstas varían ampliamente a lo largo de la noche con valores medios que pueden oscilar entre 50 y 1.000 pg/ml en la oveja (Malpaux *et al.*, 1987; Zarazaga *et al.*, 1998b) y de 20 hasta 135 pg/ml en las cabras (Zarazaga *et al.*, 2010). A pesar de esta enorme variabilidad en las concentraciones plasmáticas de melatonina en ambas especies, la repetibilidad en la amplitud de su secreción, así como en la duración de secreción para cada individuo son muy elevadas (0,7 y 0,5, respectivamente) (Chemineau *et al.*, 1996). Esto indica que la secreción de esta hormona se encuentra bajo un fuerte control genético como así lo demuestra la heredabilidad del carácter ($0,45 \pm 0,07$), observado en ovino (Zarazaga *et al.*, 1998b), pudiendo estar relacionado con el tamaño de la glándula pineal y el número de pinealocitos contenidos en ella (Coon *et al.*, 1999; Gómez-Brunet *et al.*, 2002). Según Zarazaga *et al.* (1998a), trabajando con ovejas que presentaban diferencias en cuanto a concentraciones de melatonina, el origen de estas diferencias se debían más a la tasa de síntesis y en consecuencia al tamaño de la glándula pineal que a la cinética del catabolismo de la hormona tales como la vida media o la velocidad de desaparición en la sangre. Parece probable que esta diferencia en el tamaño de la glándula pineal viene desde el nacimiento (Gómez-Brunet *et al.*, 2002). Esto nos sugiere que los genes o alelos que afectan al tamaño de la pineal y, en consecuencia, a sus concentraciones plasmáticas, probablemente actúan incluso desde el desarrollo embrionario (Gómez-Brunet *et al.*, 2000).

Por otra parte, en diferentes experimentos realizados por Zarazaga *et al.* (1997; 1999; 2010), en ovino y caprino, se ha comprobado que las concentraciones de melatonina varían muchísimo en un mismo animal entre cada una de las venas yugulares que es muestreada. Sin embargo, la media de las concentraciones plasmáticas de melatonina diurnas o nocturnas aparentemente no varió en la población en general. Las diferencias de concentraciones de melatonina entre ambas venas pueden deberse a factores como: diámetro de la vena, flujo de sangre o la conexión con las venas de donde procede la melatonina liberada por la glándula pineal, sin embargo esto no ocurre con otras hormonas secretadas por la hipófisis como la prolactina y la oxitocina (Zarazaga *et al.*, 2010).

La explicación más plausible sería la forma de paso de la melatonina hacia las venas yugulares. Las hormonas secretadas por la pituitaria son liberadas a la circulación sanguínea en paralelo, desembocando sucesivamente en las venas pituitarias laterales, senos petrosos, senos cavernosos y los senos sigmoideos, antes de alcanzar la vena interna yugular (Page, 2006). En el caso de la melatonina, esta liberación no es pareada hacia la vena de Galeno, es decir, al alcanzar el seno sagital superior, se divide en dos ramas en los senos transversos conectadas con los senos sigmoideos, para finalmente alcanzar las venas yugulares internas. Los resultados de Tricoire (2002) sugieren que la distribución de la sangre en el seno sagital, que transporta la melatonina, no es igual entre los dos senos transversos lo que podría explicar las diferencias de las concentraciones entre ambas venas yugulares. Estas diferencias pueden significar un problema en cuanto a la metodología a usar en el muestreo, sobre todo en trabajos en los que se buscara estudiar y determinar las concentraciones de melatonina y correlacionarlas con algún parámetro reproductivo, siendo entonces necesario tomar muestras de ambas venas y mezclarlas para obtener un valor más homogéneo en las concentraciones (Zarazaga *et al.*, 2010). También, en cuanto a la amplitud del ritmo de secreción de melatonina, van a existir variaciones importantes entre los individuos de una misma población, aunque si se toma en cuenta un solo individuo, son bastante estables en el tiempo (Chemineau *et al.*, 1996).

Respecto al inicio de la secreción de melatonina, se han realizado estudios, tanto en ovino como en caprino, que demuestran que la glándula pineal del feto es capaz de sintetizar melatonina incluso antes del nacimiento y cuyas secreciones aumentan a medida que lo hace la misma glándula pineal (Kennaway *et al.*, 1977; McMillen *et al.*, 1989; Gómez-Brunet *et al.*, 2000). Sin embargo, es posible que estas secreciones sean debidas a que la melatonina secretada sea un reflejo de la secreción pineal de la madre que atraviesa la barrera placentaria por vía sanguínea (Yellon y Longo, 1988; Zemdegs *et al.*, 1988). Eso ha podido confirmarse mediante trabajos de pinealectomía en ovejas gestantes, en las que los ritmos de secreción desaparecieron (Zemdegs *et al.*, 1988). Sin embargo, esta señal es importante, puesto que los tratamientos fotoperiódicos pueden afectar a la vida reproductora posterior de la cría. En este sentido, en caprino, Devenson *et al.* (1992) demostraron que cuando a las hembras que iban a parir en otoño, se les sometió a un fotoperiodo artificial de días largos en los 2 meses previos al parto, las chivas nacidas iniciaron su actividad reproductiva mucho más tarde que aquellas que no habían sido sometidas a tratamiento fotoperiódico, lo que parece indicar que el feto es

capaz de detectar el fotoperiodo antes del nacimiento, posiblemente debido a la señal de la melatonina materna. Después del nacimiento, las crías comienzan a generar su propio ritmo de secreción, si bien la relación entre las concentraciones de melatonina y el fotoperiodo prevalente no se establece hasta las 3-4 semanas de vida, por lo que las concentraciones que se puedan detectar antes de ese tiempo, es muy probable que sean debido a la melatonina presente en la leche materna (Malpaux *et al.*, 1993; Gómez-Brunet *et al.*, 1999; Santiago-Moreno *et al.*, 2003).

2.3.5.2. VÍAS DE SECRECIÓN

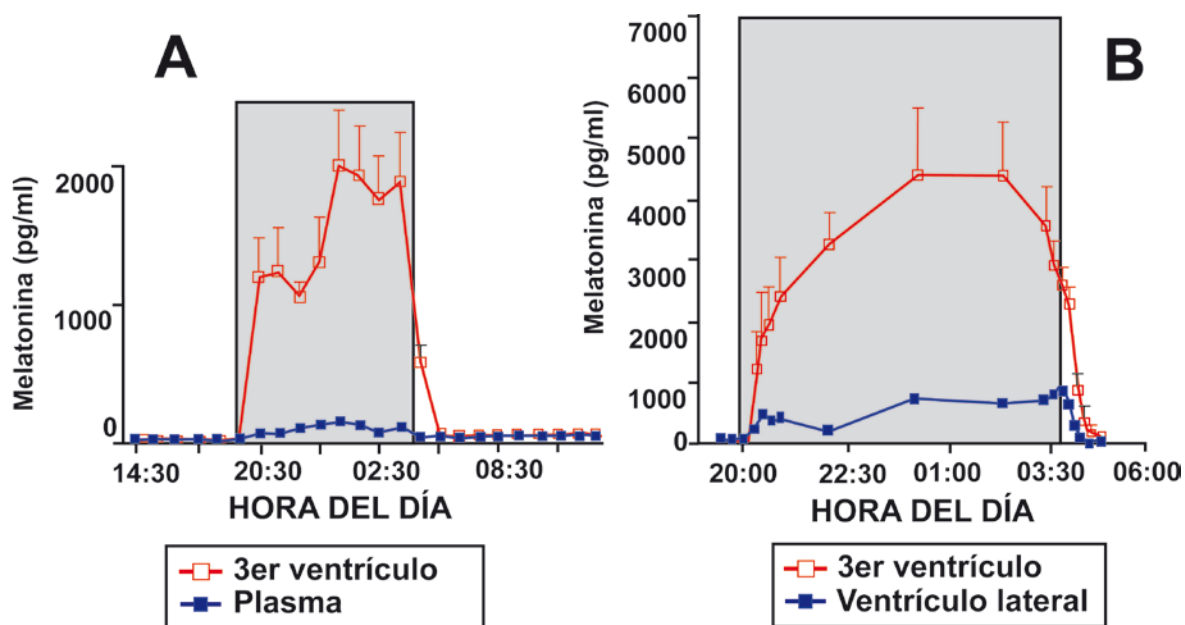
Una vez sintetizada, a diferencia de otras hormonas que son almacenadas, la melatonina se libera directamente a la circulación. Esto significa que las concentraciones plasmáticas de melatonina son un indicativo de su tasa de síntesis y por lo tanto un reflejo de la actividad fisiológica de la glándula pineal. Así, cualquier factor que limite la síntesis de melatonina en la glándula, conllevará niveles más bajos en sangre.

La melatonina puede usar dos posibles rutas para alcanzar sus sitios de acción: la primera es por la circulación general, a través del circuito de redes periféricas (pineal - yugular - carótidas - órgano diana) a partir de la vena de Galeno. La melatonina que va por la sangre venosa, finalmente, es transportada al cerebro mediante las arterias carótidas y se supone que son éstas concentraciones de melatonina las encargadas de actuar a nivel de los receptores de esta hormona en el SNC y controlar, la actividad reproductora. La segunda vía de secreción de la melatonina está en relación con el líquido cefalorraquídeo (LCR) a nivel de los ventrículos laterales, donde la melatonina accede al hipotálamo más concretamente a través del 3^{er}V siguiendo su propio circuito (pineal - 3^{er}V - órgano diana), en donde se han detectado concentraciones más altas que las observadas a nivel periférico (Shaw *et al.*, 1989; Tricoire *et al.*, 2002), además mostrando un ritmo diario a la par que el observado en la vena yugular (Rollag *et al.*, 1978; Tricoire *et al.*, 2002).

Existen evidencias que apuntan a favor de esta última hipótesis, ya que la localización de los sitios de acción de la melatonina se localizan en el hipotálamo pre-mamilar (HPM) que está adyacente al 3^{er}V, lo que permite la difusión de esta hormona del LCR hacia los puntos de acción (Malpaux *et al.*, 1998); y otra razón es que los niveles de melatonina son más altos en el LCR que en la sangre. Sin embargo, la

cantidad total de melatonina que hay en el LCR es muy pequeña, representando sólo el 0,1% de la que se libera en la sangre sintetizada por la pineal (Shaw *et al.*, 1989; Tricoire *et al.*, 2002). De todos modos, Skinner y Malpaux (1999), trabajando con ovejas, revelaron por primera vez que las concentraciones de melatonina en la base del 3^{er}V, cerca del hipotálamo pre-mamilar, son 7 veces más elevadas que las de los ventrículos laterales, entre 5 y 18 veces más que los encontrados en la vena yugular y 100 veces más altas que las que están en la sangre de la carótida (Figura 14). Esto indicaría que la mayor parte de la melatonina que se encuentra en el LCR proviene de la glándula pineal, y no por un flujo retrógrado desde la vena de Galeno al plexo coroideo y de allí a los ventrículos cerebrales. Todo ello, llevaría a pensar que la cantidad presente en dichos ventrículos sería muy superior al 0,1% propuesta anteriormente sobre la cantidad total sintetizada por la glándula pineal.

Figura 14. Concentraciones de melatonina en el líquido cefalorraquídeo (LCR) del 3er ventrículo y en el plasma sanguíneo (Izquierda, A), y en el LCR del ventrículo lateral (Derecha, B). La duración de la noche representa el área gris (adaptado de Skinner y Malpaux, 1999).



La melatonina alcanza el LCR del 3^{er}V a través del receso pineal (RP), y de él difunde hacia todo el 3^{er}V. Este hecho se ha demostrado ya que se ha visto que las concentraciones de melatonina son mucho mayores en el receso pineal que en el 3^{er}V, a pesar de la corta distancia entre ambos sitios (10 mm). Además, la extracción de LCR en el RP provoca una disminución de las concentraciones de melatonina en el 3^{er}V,

dependiente de la tasa de extracción de LCR y, finalmente, el cierre quirúrgico del receso pineal provoca una disminución de las concentraciones nocturnas de melatonina en el LCR de casi un 80% (Tricoire *et al.*, 2002).

Además, como ya se ha mencionado, el aumento de las concentraciones de melatonina en el crepúsculo y su disminución al amanecer son igual de claras tanto en el LCR como en la sangre, por lo tanto las concentraciones en el LCR reflejan también la duración del número de horas de luz, un prerequisite crítico si lo que se quiere es jugar un rol en la transmisión de la información fotoperiódica (Skinner y Malpoux, 1999).

2.3.5.3. FACTORES HORMONALES QUE AFECTAN SU SECRECIÓN

Distintos trabajos han mostrado que además del fotoperiodo, o ciclo día/noche, los esteroides gonadales serían uno de los principales factores hormonales que afectan la síntesis o secreción de la melatonina, aunque con resultados muy variables. Así, algunos resultados han mostrado que los esteroides ováricos inhiben la secreción de melatonina (Arendt *et al.*, 1983); otros autores han observado la reducción de la actividad enzimática de la pineal (Alexander *et al.*, 1970) o en caso contrario, incrementos en la actividad enzimática pineal (Daya y Potgieter, 1982). Igualmente se ha observado, respecto a la influencia del ciclo sexual sobre la secreción de melatonina, que no existen diferencias significativas en los distintos momentos del ciclo sexual (Rollag *et al.*, 1978); si bien, en esos experimentos, los animales estudiados eran diferentes, lo que podía provocar esa ausencia de diferencias debido a la anteriormente mencionada variabilidad entre individuos de la misma especie en las concentraciones de melatonina. Sin embargo, los resultados obtenidos en la especie ovina, trabajando siempre con los mismos animales, son escasos y parecen demostrar que no existe efecto sobre la secreción de melatonina ni por parte de los esteroides ováricos, ni por el momento del ciclo sexual, ni por el momento de la gestación (Zarazaga *et al.*, 1996a, b; 1997; 2010).

2.3.6. LUGAR Y MODO DE ACCIÓN DE LA MELATONINA

La variación de la duración de la presencia de la melatonina es procesada neuralmente, y esa señal regula la secreción de GnRH. La melatonina no actúa

directamente sobre las neuronas GnRH hipotalámicas, sino más bien su acción tiene lugar de forma indirecta a través de rutas de interneuronas que terminan por conectar con las neuronas GnRH y que retardan la respuesta a los días largos o cortos y que en consecuencia no es inmediata (Malpaux *et al.*, 1999). Por ejemplo, los días cortos estimularon la secreción de GnRH en ovejas (Malpaux *et al.*, 1997), pero este incremento en la secreción se observó a los 40-60 días de haberse iniciado los días cortos. Igualmente, el tratamiento con días largos provoca la inhibición de la secreción de LH a los 30 días de haberse iniciado, como ya se ha indicado en el capítulo 1 (Legan y Karsch, 1980).

La melatonina interviene en una gran cantidad de funciones fisiológicas (Arendt, 1995), planteando dos posibilidades de explicación: bien la melatonina actúa en una parte determinada del cerebro o de la hipófisis implicada en la regulación de varias funciones; o actúa directamente sobre otros tejidos del cuerpo (Bittman y Weaver, 1990; Stankov *et al.*, 1991; Morgan *et al.*, 1994). Esta dificultad aumenta por la localización de sitios con receptores de melatonina de gran afinidad en diferentes tejidos del cuerpo (Bittman, 1993). Los primeros trabajos acerca del modo de acción de la melatonina fueron realizados con ratones usando pequeños pellets de cera de abeja impregnados de melatonina (Glass y Lynch, 1981). Posteriormente, usando también ratones, se pudo definir un lugar en el cerebro que tenía un patrón de ritmo intracerebral de secreción de melatonina (Dowell y Lynch, 1987), pero estos estudios no pudieron definir un sitio de acción preciso en el cerebro.

Para determinar la presencia de receptores a la melatonina generalmente se han usado técnicas como la autorradiografía *in vitro* u otras técnicas en las que se usa como ligando la ¹²⁵I-iodomelatonina (I-MEL) que se une a los receptores de la hormona (Dubocovich y Takahashi, 1987; Vaněček *et al.*, 1987). Aunque los lugares de unión han sido hallados en diferentes áreas del cerebro, ha sido en la *pars tuberalis* de la hipófisis y en el NSQ del hipotálamo donde se han concentrado la mayor cantidad de sitios de unión de melatonina, una característica que es compartida entre las diferentes especies animales estudiadas hasta la fecha. Pero también se han encontrado receptores para la melatonina en otros tejidos como en el POA, en donde su presencia representa un 60% de los cuerpos celulares, en la región pre-mamilar, con un 15% de los cuerpos celulares (Caldani *et al.*, 1988; Lincoln, 1992) y también en el hipotálamo anterior, núcleo ventromedial y dorsomedial del hipotálamo, el núcleo paraventricular, la *pars distalis* de la hipófisis, córtex cerebral y en la retina. Otros experimentos han dado una

ubicación más precisa de los receptores de melatonina que controlan la secreción de GnRH/LH, concretamente en la región pre-mamilar mediobasal posterior (Duncan *et al.*, 1989; Weaver *et al.*, 1989; Blazynsky y Dubocovich, 1991; D'Occhio y Suttie, 1992; Helliwell y Williams, 1992; Lincoln, 1992; Malpaux *et al.*, 1993; 1996).

Estudios realizados en ovejas y roedores, han llevado a la conclusión de que la *pars tuberalis* no es la encargada de mediar la acción de la melatonina en el eje reproductivo neuroendocrino, en realidad, la melatonina que llega a la *pars tuberalis* parece no modificar la secreción de LH. Así, si se inserta un microimplante de melatonina en la cara anterior de la *pars tuberalis* no ocurre cambio alguno (Malpaux *et al.*, 1997), ni tampoco si estos microimplantes se insertan en la *pars distalis* (Lincoln y Maeda, 1992). En contraste a esto, usando microimplantes de melatonina, a nivel del hipotálamo medio basal o en el 3^{er}V, se observó una estimulación en la liberación de LH (Malpaux *et al.*, 1993; Malpaux *et al.*, 1997). Estos estudios evidencian en definitiva que es el hipotálamo y no la *pars tuberalis* el punto de acción de la melatonina para traducir sus efectos en el eje reproductivo. Sin embargo, en otros estudios (Lincoln y Clarke, 1994; Malpaux *et al.*, 1995), se ha encontrado que la *pars tuberalis* controla, al menos en cierta parte, la acción de la melatonina en la secreción de prolactina.

La melatonina modifica la liberación pulsátil de la GnRH, sin embargo existen evidencias que indican que la melatonina no actúa directamente en las neuronas GnRH. Aparentemente existen tres razones: en primer lugar, la inmunoreactividad de la GnRH no coincide con los sitios de acción de la melatonina (Lehman *et al.*, 1997; Malpaux *et al.*, 1998); en segundo lugar, el retraso entre el inicio del tratamiento con melatonina y la respuesta en la liberación de la GnRH/LH, sugiere que habría un mecanismo más complejo de regulación; y tercero, y la más importante, varios sistemas neurotransmisores han demostrado estar implicados en la regulación de la secreción de LH por la melatonina, tales como el sistema dopaminérgico, serotoninérgico y los aminoácidos excitatorios, de los que se hablará más adelante en el siguiente capítulo (Caldani *et al.*, 1988; Malpaux *et al.*, 1996).

2.4. PLASTICIDAD NEURONAL EN LA ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA

La plasticidad neuronal está definida como la “habilidad” del sistema nervioso, en animales adultos, para adaptarse a los cambios estructurales y funcionales relacionados con influencias endógenas o exógenas, que ocurren a lo largo de la vida del individuo; siendo la capacidad del cerebro, aunque sólo sea de forma parcial, mayor en los primeros años de vida que en la etapa adulta. A nivel del hipotálamo, la plasticidad está representada a través de los cambios en la longitud y tamaño de las dendritas y neuronas, así como los cambios en sus conexiones de entrada y salida de señales, conocidas como sinapsis, en respuesta a los cambios endógenos y ambientales ocurridos durante el crecimiento y la vida adulta (Plant y Shahab, 2002; Tasker *et al.*, 2002; Theodosis *et al.*, 2004; Naftolin *et al.*, 2007; Prevot *et al.*, 2010). El sistema neuroendocrino reproductivo resulta sólo un ejemplo de esta plasticidad, ya que en ciertos momentos clave puede, de manera reversible, iniciarse o detenerse, como ocurre durante la lactación o la preñez (Smith, 1978; McNeilly *et al.*, 1994), bajo condiciones de restricción nutricional (Warren *et al.*, 1999; Meczekalski *et al.*, 2008), y como en muchas especies de animales, en respuesta a un determinado momento del año (Goodman *et al.*, 1982; Malpaux *et al.*, 1988; Karsch *et al.*, 1993; Lehman *et al.*, 1997).

El antecedente más importante acerca de la plasticidad neuronal se remonta al estudio realizado por Hubel y Wiesel en 1959, en donde se logró explicar la presencia de diferentes tipos de células e interconexiones de gran complejidad con zonas excitatorias e inhibitorias en el córtex cerebral a nivel del ganglio retinal, y que puede ser tanto inhibida como estimulada por acciones externas, lo que permitió aumentar lo que en aquel momento se conocía como el procesamiento sensorial. Estos investigadores usando microelectrodos en la corteza visual primaria de gatos anestesiados y sometidos a patrones de luz y oscuridad, encontraron que algunas neuronas se activaron rápidamente frente a estos estímulos y otras respondían de forma distinta a estos patrones. Estas neuronas fueron llamadas en aquel entonces “células simples” y las células que respondían igual a la luz y a la oscuridad, fueron llamadas “células complejas”. En otro experimento, Hubel y Wiesel (1962), privando a gatos del uso de un solo ojo, demostraron que las columnas de la corteza visual primaria que reciben contribuciones del otro ojo se hacían cargo de las áreas que normalmente reciben información del ojo cegado. Esto tiene implicaciones importantes para la

comprensión de la ambliopía por privación, un tipo de pérdida visual debido a la privación visual unilateral durante el llamado "período crítico o sensible", importante para adquirir información y/o desarrollar ciertos aprendizajes. Estos gatitos tampoco desarrollaron las zonas que reciben las aportaciones de los dos ojos, una característica necesaria para la visión binocular. Sin embargo, cuando esta privación se realizó en animales adultos durante un año, observaron que la respuesta de las células del ojo cubierto fue igual a la del ojo normal, mostrando que la privación de la visión no afecta a las células del córtex visual, a menos que esta privación de la visión ocurriera durante los primeros tres meses de vida del animal. Los experimentos de Hubel y Wiesel mostraron que la dominancia ocular se desarrolla de manera irreversible en el desarrollo infantil temprano (así como ocurre con otros aspectos del desarrollo humano).

La reproducción estacional representa un ejemplo natural de la plasticidad funcional en el cerebro adulto, ya que refleja los cambios en las vías de control neuroendocrino de la GnRH, y en particular, la capacidad de respuesta de estas mismas neuronas al *feedback* negativo del estradiol. Esto incluye cambios en las entradas sinápticas en las neuronas GnRH, así como en las neuronas dopaminérgicas en el grupo celular A15, un núcleo que juega un rol clave en el *feedback* negativo del estradiol en el ganado ovino (Adams *et al.*, 2006; Goodman *et al.*, 2010; Lehman *et al.*, 2010). El mecanismo responsable de controlar estos cambios reproductivos estacionales se encuentra principalmente a nivel del cerebro, representando un buen ejemplo de la plasticidad funcional que ocurre en el sistema nervioso central adulto (Karsch *et al.*, 1984; Barrel *et al.*, 1992). En la oveja, el circuito neuronal que controla la estacionalidad de la reproducción se encuentra compuesto por una red multisináptica localizada en el POA y en el hipotálamo que afecta la liberación de las neuronas GnRH (Lehman *et al.*, 2002; Goodman *et al.*, 2010), siendo éstas el componente neuroendocrino final para el control de la reproducción. A pesar de los conocimientos que se tienen sobre este sistema, los cambios que permiten que sea funcional en un momento determinado de año y no en otro aún permanecen desconocidos.

El circuito núcleo supraquiasmático-pineal es uno de los circuitos neuronales cerebrales mejor estudiados a nivel del papel de la plasticidad neuronal, ya que la producción de melatonina está regulada por determinadas actividades neuronales que pueden ser suprimidas por un simple flash de luz (Borjigin *et al.*, 2012). Así, la ruptura parcial de la innervación de la glándula pineal procedente de los GCS ha demostrado que esta glándula recupera su actividad a los dos días de haber perdido el 50% de las

entradas adrenérgicas procedentes de los GCS (Zigmond *et al.*, 1981; Kuchel y Zigmond, 1991), pero no se produce recuperación de la actividad pineal si se produce una denervación completa de uno de los dos GCS (Zigmond *et al.*, 1985).

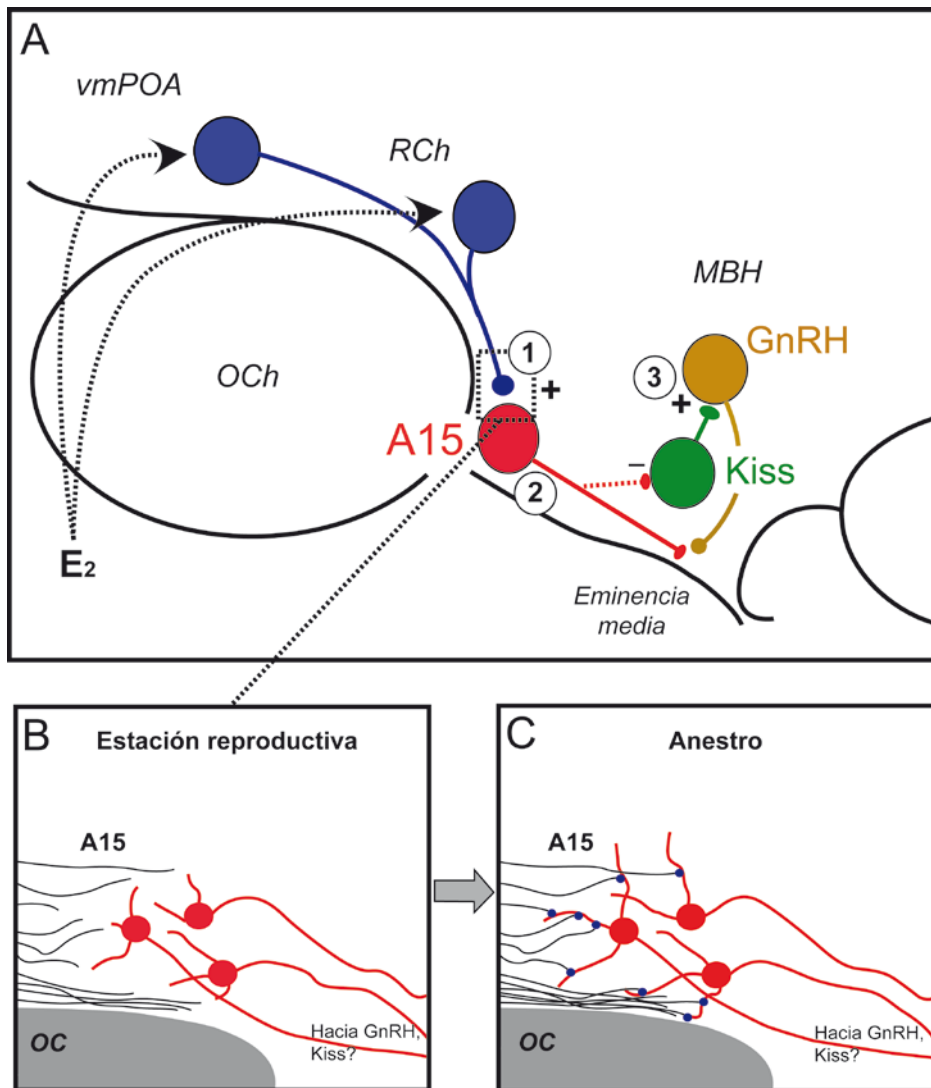
Como ya se describió anteriormente, la información fotoperiódica se transmite al sistema neuroendocrino reproductivo a través de la vía retino-hipotalámica, que también parece regular el ritmo nocturno de la secreción de melatonina que sirve como señal indicadora de la duración del día (Bittman *et al.*, 1983; Karsch *et al.*, 1984; Malpaux *et al.*, 1997). La melatonina parece actuar a nivel de la región pre-mamilar del hipotálamo caudal (Malpaux *et al.*, 1995), pero la forma como la información sobre la duración del día se transmite hasta las eferentes del circuito neuroendocrino responsable de los cambios estacionales todavía permanece desconocido, cabiendo la posibilidad de la existencia de alguna plasticidad que transmita la información de la melatonina hasta los receptores de esta hormona que se localizan en el hipotálamo pre-mamilar o en algún otro sitio (Lehman *et al.*, 2010).

A modo de resumen de todo lo descrito y en función del conocimiento que se tiene sobre la plasticidad reproductiva, Lehman *et al.* (2010) plantearon una representación esquemática del circuito neural en el hipotálamo (Figura 15), en donde se muestra la regulación del control estacional del *feedback* negativo del estradiol, y los sitios en donde la plasticidad morfológica podría contribuir en las transiciones estacionales. En este gráfico, el estradiol actúa sobre la proteína estrogénica receptora- α (RE- α) contenida en las células del área preóptica ventromedial (vmPOA) y en el área retroquiasmática (RCh). Estas neuronas, por su parte, contactan con las células dopaminérgicas del núcleo A15, que se proyectan caudalmente hacia el hipotálamo mediobasal (MBH), que contiene las células secretoras de GnRH y actuando sobre ellas directamente a nivel de los terminales de la eminencia media y/o vía las células kisspeptina (Kiss) del núcleo arcuato (ARC).

De acuerdo a las investigaciones realizadas, se han encontrado evidencias sobre la existencia de plasticidad neuronal en tres sitios del circuito hipotalámico que controlan la estacionalidad reproductiva en la oveja, ubicándose estos cambios estacionales: (1) a nivel de los contactos sinápticos en las neuronas dopaminérgicas A15, específicamente en las terminales glutamatérgicas; (2) en la morfología de las dendritas de las neuronas A15; y (3) en las entradas conteniendo kisspeptinas para las neuronas GnRH en el MBH. Esto junto a la existencia de una plasticidad a nivel de los cuerpos celulares de las neuronas kisspeptinas y sus entradas. Esto puede observarse en

las figuras 15B y 15C, en donde se resaltan los cambios en la plasticidad neuronal que ocurre en las transiciones estacionales reproductivas en la oveja, representados por cambios en la morfología de las dendritas A15 (en rojo) y el número de contactos sinápticos glutamatérgicos (puntos azules) en ellos, lo cual ocurre en la transición de la estación reproductiva al anestro estacionario. Lo que podría decirse es que estos cambios podrían ser resultado de una “reconexión” funcional en este circuito, lo que destaca la habilidad del estradiol para inhibir la secreción de GnRH en este momento del año y que podría ser producto de una mediación, ya sea de forma directa, a través de las proyecciones de las células A15 sobre las neuronas GnRH o de manera indirecta por medio de las células kisspeptinas del ARC (Lehman *et al.*, 2010).

Figura 15. Representación esquemática del circuito neural en el hipotálamo que regula el control estacional del *feedback* negativo del estradiol (adaptado de Lehman *et al.*, 2010) (ver explicación en el texto).



Aunque la mayoría de los datos sobre el papel de la plasticidad neuronal en la estacionalidad reproductiva provienen de un modelo desarrollado en el ovino, se puede considerar que los componentes y principios pueden tener relevancia en la reproducción de la mayoría de los vertebrados, incluyendo el hombre (Lehman *et al.*, 2010).

3. IMPLICACIÓN DE LOS SISTEMAS NEURONALES EN EL CONTROL DE LA REPRODUCCIÓN

3.1. INTRODUCCIÓN

En pequeños rumiantes, y principalmente en la oveja, se han desarrollado numerosos estudios que han investigado los mecanismos neuronales que participan en la regulación de la actividad reproductiva, si bien aún no está del todo claro cómo actúan en el animal. Es aceptado que el fotoperiodo ejerce un fuerte efecto sobre la actividad reproductiva y que es mediado por redes neuronales hipotalámicas que afectan a las neuronas GnRH (Brooks *et al.*, 1986; Kao *et al.*, 1992; Tortonese, 1999).

Los cambios estacionales en la secreción de GnRH/LH se relacionan con sus respectivos cambios en las concentraciones y la sensibilidad al estradiol (Legan y Karsch, 1980). Éste provoca una clara reducción de la secreción de gonadotropinas durante el anestro estacional (Legan *et al.*, 1977; Karsch *et al.*, 1984; Henniawati *et al.*, 1995), reflejándose en la secreción de GnRH (Karsch *et al.*, 1984). Para asegurar unas concentraciones constantes a lo largo del año de estradiol, en general, se utilizan hembras OVX+E₂ que proporcionan un modelo experimental muy utilizado en la investigación de la estacionalidad reproductiva al reflejar los cambios en la sensibilidad del eje hipotálamo-hipofisario al estradiol (Legan *et al.*, 1977; Karsch *et al.*, 1984; Henniawati *et al.*, 1995).

A los neuromediadores se les podría describir como sustancias sintetizadas, almacenadas y secretadas por las neuronas (Dubois, 1993), y que dentro del campo de la reproducción intervienen en la transmisión de la información a lo largo del eje hipotálamo-hipofisario, modificando la secreción de LH en respuesta al estradiol (Meyer y Goodman, 1985; Le Corre y Chemineau, 1993). En función de su modo de acción, se pueden dividir en tres grupos: neurohormonas, neurotransmisores y neuromoduladores, siendo posible que una misma sustancia sea capaz de realizar cualquiera de las tres funciones. La neurohormona es producida en células neurosecretoras y liberada a la circulación, actuando lejos del lugar de su secreción, por ejemplo la GnRH. El neurotransmisor, por el contrario, actúa localmente a nivel del espacio sináptico entre dos neuronas, permitiendo el paso de los impulsos de una célula a otra al activar a sus receptores de la membrana. Finalmente, los neuromoduladores se

encargan de controlar la actividad neuronal, o dicho de otro modo, la sensibilidad a un determinado neurotransmisor (Zúñiga, 2002).

Es importante conocer el mecanismo de actuación de estas sustancias en el control de la liberación de las GnRH/LH y si su papel a lo largo del ciclo fotoperiódico es dependiente de otros factores (Bittman y Karsch, 1984; Lincoln, 1992).

3.2. OPIOIDEOS ENDÓGENOS

Los opioideos endógenos o EOPs (*Endogenous Opioids Peptides*) son un grupo de péptidos producidos por el cerebro, que modulan diversas actividades orgánicas tanto metabólicas como de comportamiento, teniendo a su vez una actividad biológica similar a los agonistas opioides, como la morfina (Malven, 1993). Los opioideos endógenos fueron aislados por primera vez por Hughes *et al.* (1975) en el cerebro y sus acciones son, en la mayoría de casos, parecidas a las de los opiáceos e incluyen efectos sobre el control de la secreción gonadotrópica, que suelen ser de carácter inhibitorio (Sánchez, 2003). Las sustancias que intervienen en los receptores bloqueando su actividad se denominan antagonistas opioides (por ejemplo, la naloxona) y pueden ser endógenos o exógenos (Brooks *et al.*, 1986; Bairdj *et al.*, 1989; Goodman y Gilman, 1991).

Distintos estudios han mostrado que aparentemente la liberación de hormonas, a nivel de la adenohipófisis y neurohipofisis, pueden ser moduladas por los EOPs ya que éstos actúan en varios lugares (Illes, 1989); de hecho, se menciona que regulan diversas actividades a nivel del sistema nervioso central, en donde podrían actuar de manera endocrina, aún cuando estas actividades estén reducidas a la familia de las endorfinas (Malven, 1993). De acuerdo a la familia a la que pertenecen, los EOPs pueden localizarse en diferentes sitios del cerebro: (1) las encefalinas, cuyas neuronas se encuentran en el núcleo estriado, sistema límbico, médula espinal y zona ventral del hipotálamo; (2) las β -endorfinas, situadas en los lóbulos intermedio y anterior de la hipófisis, y a nivel del núcleo arcuato del hipotálamo mediobasal, desde donde envían sus proyecciones a la eminencia media, área preóptica y amígdala; y (3) las dinorfinas, cuya distribución es muy similar a las encefalinas e incluso pueden llegar a presentarse reacciones cruzadas provocando confusión en el momento de los análisis. De estas últimas, la β -endorfina ha sido relacionada con los procesos reproductivos, y más directamente con la inhibición de GnRH (Ebling *et al.*, 1987; Domanski *et al.*, 1991; Schall *et al.*, 1991).

En cuanto a su papel, los EOPs participan en varios procesos dentro del organismo, incluyendo algunas actividades reproductivas, en donde se ha demostrado que disminuyen la secreción de gonadotropinas a nivel del hipotálamo y de esta manera también modulan el patrón de secreción de la LH (Goldstein *et al.*, 1987; Mansour *et al.*, 1987; Curie y Rawlings, 1989; Gómez, 1992). Se ha observado que la secreción de LH puede disminuir por acción de los EOPs en ciertas situaciones, incluyendo aquellas relacionadas con la analgesia, la presión sanguínea, la sensibilidad a los estímulos del dolor (Holaday y Faden, 1981; Akil *et al.*, 1984; Dodman *et al.*, 1987; Gosnell, 1987; Haynes, 1989). Al parecer este efecto supresivo tiene lugar en el hipotálamo ya que a nivel hipofisario no se han observado alteraciones en la concentración o respuesta a GnRH. Debido a que es conocida la actividad de los opioideos en los procesos que involucran daño corporal y específicamente aquellos relacionados con el dolor a nivel central, se ha propuesto que el papel fisiológico de los EOPs podría ser suprimir la reproducción en los animales cuando las condiciones son inapropiadas para la fertilidad (Haynes, 1989).

La naloxona es un fármaco que es bien conocido por tener un amplio efecto antagonico sobre los opioideos tanto exógenos (morfina) como endógenos (β -endorfinas) (Sánchez, 2003) y que ha servido de modelo experimental para entender los mecanismos neurofisiológicos de la reproducción animal (Meyer *et al.*, 1984; Ruiz, 1994; Fuentes, 1995). También se conocen otros fármacos con actividad similar; sin embargo, algunas veces pueden tener efectos tanto agonistas como antagonistas. De hecho, la selectividad por los receptores EOPs o sus antagonistas no es absoluta ya que ésta depende de la dosis de la sustancia que ocupa los receptores (Goldstein y Naidu, 1989). En este sentido, se puede decir que la naloxona es única porque bloquea la actividad opioidea (Sánchez, 2003). Los EOPs tienen distintos tipos de receptores entre los que destacan los receptores β , μ , δ y γ ; y la naloxona puede actuar principalmente a nivel de los receptores β , μ y γ , observándose que cuanto mayor es la dosis de naloxona ésta puede antagonizar a más subtipos de receptores opioideos. Respecto a los efectos de la naloxona sobre la actividad hipotálamo-hipofisaria, se ha demostrado que al inhibir la actividad de los EOPs, se produce un incremento en la secreción de LH, presumiblemente debido a un aumento en la liberación de GnRH. Este hecho se ha observado tanto durante el anestro estacionario como durante la lactación y la retroalimentación gonadal producida por la progesterona, por lo tanto se presume que los EOPs inhiben la secreción de GnRH y LH durante estos estados (Malven, 1993).

También, incluso en estudios realizados en ovinos, se ha encontrado que la combinación de hembras sincronizadas y machos tratados con naloxona han demostrado incrementar la eficiencia reproductiva (Zavala *et al.*, 1998).

Así, existen diversos estudios en donde la naloxona ha demostrado su eficacia en la expresión del estro en cabras (Sánchez, 2003) y ovejas (Fuentes *et al.*, 1998b), en la secreción de los niveles de LH y testosterona en machos cabríos y un aumento en la libido durante el anestro estacionario (Fuentes *et al.*, 1997; Singh *et al.*, 2000). Asimismo, se ha observado un efecto favorable en el aumento de la tasa de ovulación y del número de crías (Fuentes *et al.*, 1990). Igualmente, distintos estudios farmacológicos han implicado a los EOPs en la regulación de la secreción de LH (a su vez reflejo de la secreción de GnRH) durante el periodo de anestro y también durante el periodo prepuberal, ya que el bloqueo de estos receptores con el uso de la naloxona provoca un aumento en la frecuencia de los pulsos de LH (Lincoln, 1988; Ebling *et al.*, 1989; Forcada *et al.*, 2000). De esta forma, la naloxona, de acuerdo con estudios realizados en ovejas (Forcada *et al.*, 1997), es capaz de aumentar de forma significativa la frecuencia de pulsos de LH tanto al principio como al final del periodo de anestro estacionario.

No obstante, la respuesta a la naloxona en revertir la secreción de LH se reduce bastante en el primer anestro postpuberal, siendo prácticamente nula en el segundo año (Schall *et al.*, 1991). De hecho, en la bibliografía existen multitud de referencias que indican que el tratamiento de ovejas enteras u ovejas OVX+E₂ usando antagonistas opioideos durante la temporada de anestro estacionario no pudo ser capaz de obtener una respuesta positiva en términos de incrementar la secreción de LH (Brooks *et al.*, 1986; Yang *et al.*, 1988; Schall *et al.*, 1991). Estos resultados indican que si bien existe una respuesta positiva en términos de incrementar la secreción de LH durante el anestro estacionario, conforme tiene lugar el desarrollo del animal se produce un cambio progresivo, con una participación cada vez más fuerte de mecanismo neuronales no opioideos (entre ellos el sistema dopaminérgico del cual se hablará posteriormente) que hacen que la liberación de LH no pueda ser revertida por acción de la naloxona (Schall *et al.*, 1991). Sin embargo, cuando se evaluó el efecto inhibitorio de los EOPs en ovejas menos estacionales, como por ejemplo en ovejas OVX+E₂ de la raza Rasa Aragonesa, tanto al inicio como al final de anestro y en función del plano de alimentación previo durante 15 días (1,4 vs. 0,5 veces de mantenimiento), se observó un aumento significativo en la frecuencia de los pulsos de LH tras el tratamiento con naloxona,

independientemente del momento del anestro considerado o del nivel de alimentación (Forcada *et al.*, 1997). Los resultados de estos trabajos en ovinos aportan información de gran interés en dos niveles: (1) contrario a lo observado en razas más fuertemente estacionales, parece clara la implicación opioidea en la inhibición de la liberación de LH en ovinos mediterráneos, de forma que en estos animales los mecanismos no opioideos no serían tan potentes como para enmascarar la desinhibición de la frecuencia de pulsos de LH tras el tratamiento con naloxona; y (2) las vías opioideas no parecen ejercer una influencia inhibitoria significativa en la liberación de LH en una situación de subnutrición, ni en ovejas adultas ni tampoco en hembras pre-púberes (Recabarren *et al.*, 1990).

Un aspecto interesante a destacar está en relación con los estudios realizados con naloxona en cabras en época de actividad reproductiva. En el estudio realizado por Sánchez (2003), usando dosis de naloxona en cabras activas, se provocó un adelanto en el número de pulsos de LH y en el pico preovulatorio, ya que la naloxona interfiere con los receptores que controlan los pulsos de secreción de LH, algo que se ha observado también en las ovejas (Brooks *et al.*, 1986; Whisnant y Goodman, 1988; Currie *et al.*, 1991). Esto desde un punto de vista biológico es importante, ya que al conocer mejor el funcionamiento de los sistemas reproductivos en las especies se podría aumentar la eficacia de la reproducción en los animales domésticos.

3.3. SISTEMA DOPAMINÉRGICO

El sistema dopaminérgico (DA) es otro mecanismo neuronal que está involucrado en la supresión de la secreción de LH por el estradiol durante el anestro estacional en la oveja (Meyer y Goodman, 1985). Uno de los principales neurotransmisores del sistema dopaminérgico es la dopamina, una catecolamina que cumple diversas funciones a nivel reproductivo. La dopamina es un precursor de la norepinefrina (noradrenalina) que se transforma en epinefrina (adrenalina) y en su síntesis se utiliza como precursor a la tirosina (Thiéry *et al.*, 1995). La síntesis ocurre principalmente por la hidroxilación de los aminoácidos L-tirosina a L-3-4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) por acción de la enzima tiroxina-hidroxilasa, y después por la descarboxilación de la L-DOPA por acción del aminoácido aromático L-decarboxilasa. Una vez sintetizada en las neuronas, la dopamina es empaquetada en vesículas que a su vez son liberadas en la sinapsis en respuesta a la acción presináptica.

En el sistema nervioso, la dopamina cumple funciones de neurotransmisor, activando los cinco tipos de receptores de dopamina: D₁, D₂, D₃, D₄ y D₅, y sus variantes (Gayrard *et al.*, 1994).

Las neuronas dopaminérgicas se agrupan formando sistemas locales altamente específicos. Dos de estos sistemas se localizan en el hipotálamo, el sistema túbero-hipofisiario y el incerto-hipotalámico. El primero de ellos forma el núcleo A12 y constituye entre el 3 y 5% de los cuerpos celulares del núcleo arcuato; sus neuronas terminan principalmente en tres áreas: el lóbulo neural de la hipófisis, el lóbulo intermedio y la eminencia media-tallo hipofisiario, y parecen intervenir fundamentalmente en la regulación de la secreción de prolactina. En cuanto al sistema incerto-hipotalámico, es de destacar que sus neuronas componen los núcleos A13, A14 y A15, y se ha demostrado que algunas de ellas se proyectan hasta el área preóptica entrando en sinapsis con las neuronas GnRH (Caldani *et al.*, 1993).

El sistema dopaminérgico parece estar implicado en la inhibición de la liberación de LH controlada por el estradiol durante el anestro estacionario, dado que la inyección de pimozide (un antagonista dopaminérgico) es capaz de incrementar la frecuencia de pulsos de LH tanto en ovejas enteras (Meyer y Goodman, 1985) como en ovejas OVX+E₂ (Meyer y Goodman, 1986; Kao *et al.*, 1992; Le Corre y Chemineau, 1993; Forcada *et al.*, 1997). Sin embargo, se ha demostrado que el pimozide no tiene efecto alguno en ovejas OVX sin implante de estradiol (Meyer y Goodman, 1985; 1986).

La inhibición dopaminérgica de la GnRH podría ser presináptica y ocurre en los terminales nerviosos de la eminencia media a través del receptor D₂, que al ser estimulado, suprime la secreción de LH (Thiéry *et al.*, 1995). Es posible que la implicación del sistema dopaminérgico sea mayor al principio de la época de inactividad sexual (Le Corre y Chemineau, 1993), o bien, que al final del anestro coexistan los efectos de otros sistemas neuronales inhibitorios y que no pueden ser inactivados únicamente por la inyección de pimozide (Forcada *et al.*, 2000). También, se ha observado que la aplicación del pimozide en ovejas OVX+E₂, en estado de fotorrefractoriedad a los días cortos, incrementa la secreción de pulsos de LH (Kao *et al.*, 1992; Le Corre y Chemineau, 1993).

Estudios realizados por Forcada *et al.* (1997; 2002) han demostrado que existe relación entre el sistema dopaminérgico con la nutrición, y determinaron en qué medida es capaz de modificarla en genotipos de reducida estacionalidad reproductiva. De este

modo, cuando ovejas OVX+E₂ de raza Rasa Aragonesa recibieron una inyección de pimozide al inicio (Abril) y al final (Junio) del anestro estacionario, tras un tratamiento alimenticio previo de 21 días (1,4 vs. 0,5 veces las necesidades de mantenimiento) (Forcada *et al.*, 1997), se observó un incremento significativo de la frecuencia de pulsos de LH, siendo el efecto del pimozide superior al inicio que al final del anestro, al mismo tiempo observaron un mayor efecto en las ovejas que recibieron un mejor plano de alimentación. Igualmente, en otro estudio realizado por los mismos investigadores (Forcada *et al.*, 2002), se observó que el efecto del pimozide sobre la secreción de LH fue mayor en ovejas que recibieron niveles de alimentación más altos. Esto podría indicar que una sobrealimentación podría reducir la actividad de los sistemas neuronales adicionales en la inhibición de la secreción de LH en los periodos de transición entre anestro y estación reproductiva.

En cuanto a la relación del sistema dopaminérgico con la melatonina, Forcada *et al.* (2002) encontraron que ovejas OVX+E₂, que llevaban un implante de melatonina y sometidas a un periodo de subnutrición, restauraron sus niveles de LH al ser tratadas con el pimozide. La relación entre la melatonina y el sistema dopaminérgico ha quedado en evidencia a través de estudios realizados en roedores, al ser capaz de inhibir la síntesis de melatonina a nivel de la retina (Tosini y Dirden, 2000).

Otra hormona relacionada de algún modo con la dopamina es la prolactina, de manera que aquella podría ser considerada su principal factor inhibidor, como lo demuestran estudios realizados en ratas, al provocar un efecto negativo sobre la secreción de prolactina *in vitro* (Shaar y Clemens, 1974) e *in vivo* (Blake, 1976). Además, se han identificado receptores dopaminérgicos en los lactotrofos hipofisarios (Cronin *et al.*, 1978). En la especie ovina, tanto la dopamina (Deaver y Dailey, 1982) como su agonista más utilizado, la bromocriptina (Thomas *et al.*, 1986), han demostrado ser capaces de inhibir la secreción de prolactina. Thomas *et al.* (1989) encontraron una disminución, dependiente de la dosis utilizada, en las concentraciones plasmáticas de prolactina en respuesta a la infusión de dopamina, un efecto que fue bloqueado por la inyección de pimozide.

También se ha encontrado que las neuronas dopaminérgicas son consideradas una parte integral del sistema neuronal que regula el comportamiento sexual en el macho (Sachs y Meisel, 1988), como así lo aportan estudios realizados en ratas tratadas con dopamina (Tagliamonte *et al.*, 1973) y bromocriptina (Poggioli *et al.*, 1978), resultando en un incremento en el comportamiento sexual.

La acción *feedback* negativa que el estradiol ejerce sobre la secreción tónica de LH lleva consigo la activación de los sistemas neuronales catecolaminérgicos del área preóptica y del hipotálamo mediobasal; dentro de estas zonas, las estructuras más importantes parecen ser el área retroquiasmática del hipotálamo anterior, en donde se encuentra contenido el núcleo A15, y la eminencia media, que contiene los axones terminales de las neuronas GnRH responsables de controlar la secreción de ésta (Thiéry *et al.*, 1995). La función de este núcleo A15 podría considerarse como de “intermediario” para la activación de los sistemas neuronales dopaminérgicos, al incrementar las concentraciones extracelulares de metabolitos de dopamina en época de anestro en la oveja (Thiéry *et al.*, 2002) y también a nivel del núcleo A12, que es dependiente del fotoperiodo, y posiblemente independiente de la acción del estradiol (Malpaux *et al.*, 1996). A lo largo de la última década, se han realizado varios trabajos que han demostrado la importante implicación del núcleo dopaminérgico A15 sobre el control de la reproducción y en la secreción de la GnRH. Es posiblemente uno de los puntos claves en la red neuronal entre las células relacionadas con el estradiol y las neuronas GnRH del área preóptica ventral (Malpaux *et al.*, 1996).

Desde la realización de los primeros trabajos se ha generado una gran controversia, debido a la variabilidad de los resultados obtenidos en función a diversos factores, tales como la dosis de fármaco utilizada, la estación en que fue realizado el estudio o el estado fisiológico del animal en aquel momento. Przekop (1978) observó que en ovejas OVX+E₂ a las que se les provocó una lesión en el hipotálamo anterior, donde se encuentra el núcleo A15, estimuló la secreción de LH. Si bien, Przekop *et al.* (1975) no obtuvieron respuesta tras la infusión intraventricular de dopamina en hembras ovinas enteras en anestro. De forma similar, Deaver y Dailey (1982) aplicaron una infusión por vía intravenosa de dopamina y tampoco afectó la secreción tónica de LH durante el anestro estacional. Sin embargo, en el mismo trabajo sí obtuvieron respuesta al realizarlo con ovejas OVX, alterando la secreción de LH de un modo dependiente a la dosis administrada, de modo que usando una dosis normal de dopamina la LH se veía incrementada mientras que si la cantidad era demasiado alta el efecto era el contrario. Estos resultados obtenidos con animales OVX parecen evidenciar que el sistema dopaminérgico tiene una influencia importante sobre la secreción de LH, y que es posible también que las vías dopaminérgicas se encuentren funcionando al máximo de su capacidad en hembras enteras, por lo que una sobreestimulación en las vías post-sinápticas no causaría efecto alguno.

En otro estudio, Thiéry *et al.* (1989) aplicaron una neurotoxina dopaminérgica específica, la 6-hidroxidopamina, a nivel del núcleo A15 de ovejas OVX+E₂ y observaron que la destrucción del 20% de los cuerpos de las células dopaminérgicas aumentó la secreción pulsátil de LH. Los resultados sugirieron que el núcleo A15 es una de las áreas hipotalámicas clave involucradas en la inhibición de la secreción pulsátil de LH mediada por el estradiol durante la época de días largos (anestro estacional). En otro trabajo, Havern *et al.* (1991) colocaron implantes intracraneales de pimozide (antagonista dopaminérgico) en el área retroquiasmática y la eminencia media de ovejas en anestro, observándose un aumento en la secreción pulsátil de LH en los animales experimentales. Los resultados de estas lesiones nos llevan a pensar que las neuronas dopaminérgicas tienen tres propiedades importantes: inhiben la frecuencia de pulsos de GnRH, son estimuladas por el estradiol y son funcionales en anestro pero no en estación sexual (Goodman, 1996). Pero tal y como se ha indicado anteriormente, no sólo interviene el núcleo A15, ya que al lesionar el núcleo A14 dopaminérgico, localizado en la parte posteroventral del área preóptica, también puede conseguir inhibirse la secreción de LH durante el anestro estacional en la oveja (Havern *et al.*, 1994).

En ovejas OVX en anestro o sometidas a días largos constantes, al ser implantadas intracranealmente con estradiol a nivel del área preóptica media y lateral, el núcleo ventromedial, área retroquiasmática lateral y el hipotálamo paraventricular posterior, se observó la acción inhibitoria del estradiol sobre la secreción de LH de manera específica en el área retroquiasmática, específicamente a nivel del núcleo A15 (Gallegos-Sánchez *et al.*, 1997). Sin embargo, al identificar las neuronas que contienen los receptores α de estradiol (α -RE₂), éstas se han localizado principalmente en el área preóptica, hipotálamo anterior, *septum* ventrolateral, la base del núcleo de la estría *terminalis*, el núcleo ventromedial y el núcleo arcuato, pero no en el núcleo A15 (Lehman *et al.*, 1993; Kuiper *et al.*, 1997). Así, no se ha observado expresión del ARNm para los α -RE₂ en el núcleo A15, por lo que no es posible explicar el efecto inhibitor local de esta hormona esteroide en la secreción pulsátil de LH durante los días largos, sugiriendo que posiblemente los cambios en el fotoperiodo pueden modificar la distribución de estos α -RE₂ (Thiéry *et al.*, 2002).

3.4. SISTEMA SEROTONINÉRGICO

El sistema serotoninérgico es el tercer sistema neuronal que ha demostrado estar involucrado en la inhibición de la LH durante el anestro estacional en el ganado ovino. La serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) es una monoamina neurotransmisora sintetizada a partir del triptófano mediante una vía metabólica corta que involucra dos enzimas: triptófano-5-hidroxilasa (TPOH) y la 5-hidroxitriptófano decarboxilasa (5-HTPD). La reacción mediada por la TPOH es una etapa limitante en la vía de síntesis de la serotonina. La serotonina ingerida por vía oral no pasa al ciclo de síntesis de la serotonina porque no cruza la barrera hematoencefálica. Sin embargo, el triptófano y sus metabolitos 5-hidroxitriptófano (5-HTP), con los cuales la serotonina es sintetizada, pueden cruzar esa barrera hematoencefálica, siendo utilizados como agentes serotoninérgicos efectivos. Una vez sintetizada es liberada y ejerce su acción mediante su unión a los receptores 5-HT de los cuales se han descrito hasta 9 grupos de cuerpos celulares con algunos subtipos. Las neuronas serotoninérgicas se localizan principalmente en el núcleo del rafé del cerebro medio y sus axones se proyectan hacia el hipotálamo; el núcleo arcuato, concretamente, recibe una importante inervación serotoninérgica (Meyer y Goodman, 1985; Kao *et al.*, 1992; Dubois, 1993; Le Corre y Chemineau, 1993). Existe una gran similitud en la distribución de las neuronas que contienen la GnRH y las de serotonina, fundamentalmente, a nivel del área preóptica y la eminencia media y *organum vasculosum* de la *lamina terminalis* (Thiéry *et al.*, 2002).

El sistema serotoninérgico parece estar implicado claramente en la inhibición de la liberación de LH durante el anestro estacionario en el ganado ovino, mediante mecanismos tanto independientes (Meyer y Goodman, 1986) como dependientes del estradiol (Le Corre y Chemineau, 1993) y en la regulación del pico preovulatorio de LH (Johnson y Crowley, 1983; Caldani *et al.*, 1993). Tradicionalmente se pensaba que el papel de la serotonina en la regulación de la secreción de LH durante el anestro era mucho menos importante que el de la dopamina, pero trabajos realizados en ovinos han demostrado que la serotonina puede desempeñar un papel en la inhibición fotoperiódica de la secreción de LH (Whisnant y Goodman, 1990). Uno de los primeros ensayos realizados en esta especie mostró que la implicación del sistema serotoninérgico a través de la administración intraventricular de serotonina (o su infusión a nivel de hipotálamo mediobasal) produjo un retraso en el inicio de la descarga preovulatoria de LH (Domanski *et al.*, 1975). Sin embargo, cuando la serotonina se inyecta de forma

intravenosa en ovejas OVX sus efectos resultan directos o bifásicos, puesto que a dosis bajas se observa un descenso en las concentraciones plasmáticas de LH, mientras que a dosis más elevadas el efecto es el contrario (Deaver y Dailey, 1982).

En ovejas OVX+E₂ se observó que la acción estimuladora de los antagonistas de los receptores serotoninérgicos 5HT_{2A} (cyproheptadina o la ketanserina) sobre la secreción de LH fue mucho mayor al inicio del anestro, es decir, en una situación de fotorrefractoriedad a los días cortos (Le Corre y Chemineau, 1993; Thiéry *et al.*, 1995). Además, Le Corre y Chemineau (1993) observaron que, la aplicación de cyproheptadina o ketanserina, en ovejas OVX+E₂ expuestas a un fotoperiodo de días largos, incrementó los pulsos de LH a nivel del hipotálamo pre-mamilar de las ovejas, experimentando cambios neuroendocrinos en la secreción de GnRH/LH, y siendo esta área en donde además se han encontrado un gran número de receptores serotoninérgicos 5HT_{2A} (Pelletier *et al.*, 1999).

Aunque el papel de la serotonina en la inhibición de la secreción de LH a principios de la estación de anestro no ha sido descrito en las cabras Mediterráneas, se piensa que podría actuar de forma parecida a como ocurre en las ovejas (Forcada *et al.*, 2002). Sin embargo, no en todos los trabajos se ha utilizado el mismo antagonista ni la misma raza de animales, sobre todo más en el ovino ya que en caprino no existen estudios previos sobre la implicación del sistema serotoninérgico en la inhibición de la liberación de LH durante el anestro estacionario, por lo que no se pueden llegar a resultados concluyentes por el momento.

En cuanto a la relación del nivel de alimentación con el sistema serotoninérgico, en ratas, se ha observado que cuando las concentraciones de triptófano aumentan, como consecuencia de la inyección del mismo o de insulina, o por el consumo de carbohidratos, el triptófano cerebral y la serotonina aumentan; sin embargo, cuando el aumento del triptófano plasmático se debe a la ingestión de una dieta con elevado contenido proteico, el triptófano cerebral y la serotonina no cambian (Fernstrom y Wurtman, 1972), por lo que a través de la nutrición se podría potenciar o reducir directamente el efecto que tiene el sistema serotoninérgico sobre la reproducción. En un trabajo realizado por Forcada *et al.* (2002), en ovejas sometidas a dos niveles de alimentación distintos tras la aplicación de la cyproheptadina, observaron un incremento en la secreción de LH al comienzo del anestro estacionario y sin embargo no observaron efecto alguno al final del anestro.

3.5. SISTEMA NORADRENÉRGICO

La noradrenalina ha demostrado ser una de las sustancias responsables de la descarga preovulatoria de LH, tanto en ovino (Przekop, 1981) como en otras especies animales (Wilson, 1979). La noradrenalina es una monoamina de la familia de las catecolaminas, junto con la adrenalina y la dopamina. Los sistemas noradrenérgicos actúan generando AMPc como segundo mensajero, lo que da lugar a la cascada de fosforilación proteica intracelular. La noradrenalina, junto con la dopamina, actúa a través de sinapsis directas. La noradrenalina tiene un efecto estimulador por la vía de la adenilato-ciclasa mientras que la dopamina ejerce un efecto inhibitorio sobre la secreción de gonadotropinas (a través de GnRH) y prolactina (Speroff *et al.*, 2006). La mayoría de los cuerpos celulares que sintetizan noradrenalina se localizan en el mesencéfalo y en el pedúnculo cerebral inferior. Los axones que la transportan ascienden hasta el haz medio del cerebro anterior y se distribuyen por distintas áreas, entre ellas el hipotálamo (Speroff *et al.*, 2006). La noradrenalina se expresa fuertemente en el núcleo hipotalámico ventromedial, junto con las aminas dopamina e histamina (Beverly *et al.*, 2000). Profundizando algo más en el sistema de liberación noradrenérgico, hay que indicar que las vías ascendentes de los dos sistemas noradrenérgicos principales: el *locus ceruleus* (región anatómica en el tallo cerebral involucrada en la respuesta al pánico y al estrés) y el sistema noradrenérgico bulbar, se proyectan desde el tronco encefálico hacia las áreas hipotalámicas, donde se encuentran con las neuronas GnRH. No se han demostrado aún de forma segura conexiones sinápticas directas entre las terminales noradrenérgicas y las neuronas GnRH. En cambio, existen buenas pruebas de que las fibras noradrenérgicas ascendentes establecen contacto sináptico con las interneuronas del ácido γ -aminobutírico (también llamadas GABAérgicas, de las cuales se hablará posteriormente).

Estudios, como los de Domanski *et al.* (1991), han demostrado cómo la liberación de noradrenalina hacia el núcleo infundibular/eminencia media (NI/EM) puede ser uno de los desencadenantes de las descargas preovulatorias de GnRH/LH. Concretamente, se proponen una serie de acontecimientos que secuencialmente interaccionan entre sí para finalmente dar lugar al pico preovulatorio. De este modo, primero se produce un aumento en la secreción de β -endorfinas en el NI/EM que, al inhibir la liberación de GnRH, da lugar a un incremento en el almacén de GnRH en esa región del cerebro; más tarde, el día del celo, tiene lugar un descenso en la secreción de

las β -endorfinas permitiendo que se intensifique la actividad noradrenérgica, lo cual tiene un efecto claramente estimulador sobre la liberación de esa GnRH almacenada, desencadenando finalmente la descarga preovulatoria de LH. Los resultados obtenidos en diferentes estudios sugieren que la estimulación noradrenérgica de las neuronas GnRH está mediada por la inhibición de la liberación tónica de interneuronas GABAérgicas a través de receptores α -adrenérgicos, pero no β -adrenérgicos (Leranth *et al.*, 1988; Gitler y Barraclough, 1988). Trabajos realizados en primates no humanos han establecido el efecto estimulador del sistema α -adrenérgico sobre la secreción de GnRH. De manera que la actividad del generador de pulsos de GnRH es marcadamente suprimida por los bloqueantes α -adrenérgicos en monas OVX (Kaufman *et al.*, 1985).

Los trabajos realizados en ovino sobre este sistema no son muchos, pero al igual que en otras especies, interviene como sistema neuronal inhibitorio en el control fotoperiódico de la reproducción. De este modo, inyectando un antagonista de la noradrenalina como es la fenoxibenzamina a ovejas enteras anéstricas, se provoca un incremento momentáneo en la secreción hipofisiaria de LH (Meyer y Goodman, 1985; 1986). Por otro lado, en ovejas OVX sin implante de estradiol, se ha propuesto un modelo en el que la noradrenalina y la adrenalina pueden estimular la secreción gonadotropa (Scott *et al.*, 1991). Sin embargo, cuando se trabaja con animales OVX+E₂ se obtiene un ligero descenso de dicha secreción con la noradrenalina en la época reproductiva, pero en el anestro estacionario, el estradiol es capaz de hacer desaparecer ese posible efecto inhibitorio del sistema noradrenérgico, dando lugar a un profundo descenso de la liberación de GnRH/LH.

Así pues, parece haber quedado bastante clara la existencia de diferentes sistemas noradrenérgicos moduladores de la liberación de LH: por un lado, un sistema estimulador que es dependiente del estradiol, y por otro lado, un sistema inhibitorio que es dependiente de este mismo esteroide. De hecho, trabajos realizados por Goodman *et al.* (1996) han comprobado la existencia de neuronas α_1 -adrenérgicas en el área preóptica que parecen responsables de la inhibición estradiol-dependiente de la amplitud de pulsos de LH en la época de actividad reproductiva. Del mismo modo, se ha comprobado cómo los implantes de fenoxibenzamina colocados localmente en el área preóptica son capaces de aumentar la secreción de LH tanto en fase folicular de animales cíclicos como en animales OVX+E₂, pero resultando ineficaces cuando se trata de animales sólo OVX. Por ello, es posible que las neuronas noradrenérgicas

jueguen cierto papel en el mecanismo del *feedback* negativo que ejerce el estradiol durante la estación sexual.

Ya ha quedado demostrado cómo los efectos negativos del sistema noradrenérgico sobre la secreción hipofisaria de LH tienen lugar a través de una serie de interacciones con otros sistemas neuronales. Así, Goodman (1989) demostró cómo la inhibición de la frecuencia de pulsos y de la concentración media de LH que se produce con la administración de un agonista de la noradrenalina queda anulada por acción de un antagonista dopaminérgico; por el contrario, el antagonista noradrenérgico no es capaz de modificar la acción del agonista dopaminérgico. Estos trabajos dieron lugar a la propuesta de un modelo, donde la frecuencia de pulsos de LH y su concentración media son reguladas por las catecolaminas, a través de una serie de reacciones “en cadena” en donde la noradrenalina es la responsable de estimular a las neuronas dopaminérgicas que directamente inhiben la secreción de la GnRH.

A pesar de estos planteamientos, aún no se ha descubierto como es que esta interacción regula los pulsos de LH, por lo que algunos autores han propuesto que la actividad de la glándula hipofisaria queda inhibida por acción de los agonistas de los sistemas noradrenérgicos y dopaminérgicos (Deaver y Dailey, 1982); sin embargo, aún no se han encontrado evidencias sobre en qué forma las catecolaminas endógenas son capaces de controlar la amplitud de los pulsos de LH durante el anestro estacionario (Meyer y Goodman, 1985; 1986)

3.6. AMINOÁCIDOS EXCITATORIOS

Numerosos trabajos parecen haber demostrado la implicación de algunos aminoácidos en la transmisión de la información aportada por la luz desde la retina hasta el núcleo supraquiasmático y la glándula pineal. Estos aminoácidos son conocidos de manera general como aminoácidos excitatorios (AAE) y cumplen la función de neurotransmisores. Dentro de los AAE los más estudiados han sido cuatro: L-aspartato, L-glutamato, los ácidos γ -aminobutírico (GABA) y la glicina. De todos ellos, nos centraremos únicamente en los tres primeros ya que han demostrado tener mayor implicación en la actividad reproductiva.

Debido a que los aminoácidos forman parte de diversas funciones metabólicas en las células, muchos autores se resisten a aceptar que éstos puedan funcionar como neurotransmisores específicos. Una teoría integradora se refiere a que el aminoácido

usado como neurotransmisor puede ser separado de aquél que es utilizado en el metabolismo general para ser incluido en las vesículas y posteriormente liberado en el espacio sináptico. (Miller *et al.*, 1977; Pinsky y Dhainaut, 1993; Hickey y Sloan, 1996).

Desde hace bastante tiempo se conoce que los AAE ejercen funciones de neurotransmisores en el SNC, si bien en el caso del L-aspartato no se han encontrado receptores específicos en neuronas postsinápticas (Mayer y Westbrook, 1987; Estienne *et al.*, 2000). Desde el punto de vista fisiológico, el L-glutamato es el neurotransmisor excitatorio del cerebro más importante y en humanos está involucrado en funciones cognitivas como la concentración, de manera que un desequilibrio en sus acciones puede desencadenar procesos neurodegenerativos. Se une a diferentes subtipos de receptores glutamatérgicos, los cuales se denominan según sus agonistas específicos: propionato de α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol (AMPA), kainato (Kainat) y N-metil-D,L-aspartato (NMDA). El receptor AMPA regula la entrada de Na^+ en la célula provocando la abertura del canal iónico asociado. Respecto al receptor Kainat es permeable a los iones de Na^+ y K^+ . Y finalmente, el receptor NMDA regula la entrada de Ca^{++} (Pelligrino, 1993).

La estimulación de los receptores NMDA produce un aumento en la secreción pulsátil de LH; dicho estímulo se ha observado tanto en ratas (Arslan *et al.*, 1988) como en la especie ovina (Bourguignon *et al.*, 1989) y parece estar ligado a los esteroides ováricos, puesto que no existe ningún efecto si los animales son sólo OVX, sin el aporte exógeno de estradiol (Estienne *et al.*, 1990; McDonald y Wilkinson, 1991). El uso del NMDA también ha demostrado tener efecto en corderas pre-púberes en la secreción de LH y, este efecto, no es afectado por una restricción nutricional durante el crecimiento o por un fotoperiodo inhibitorio (Ebling *et al.*, 1990). Igualmente, se ha demostrado que el inicio de la pubertad viene asociado con el incremento de los neurotransmisores L-aspartato y L-glutamato con la respectiva generación de pulsos de GnRH (Lincoln y Wu, 1991).

Estudios realizados en ovejas mostraron que el NMDA provoca un aumento en la secreción de LH y su acción es independiente del fotoperiodo (Viguié *et al.*, 1995), aunque otros estudios indican que la estimulación de la secreción de LH por acción del NMDA fue mayor durante la época de anestro que durante la estación reproductiva (Lincoln y Wu, 1991). Es importante resaltar que parecen existir distintos grados de estimulación de la secreción de LH por parte del NMDA como puede ser, en función de la situación fotoperiódica del animal; así, Lincoln y Wu (1991), en trabajos realizados

con moruecos, demostraron como dicha estimulación era mayor en el caso en que se encontraran bajo un fotoperiodo de fotoinhibición que durante la fotoestimulación.

Estas modificaciones en la respuesta de la secreción LH por acción del NMDA surgen por modificaciones en la liberación de la GnRH, y no por los cambios de la respuesta hipofisaria a la GnRH, sugiriendo que el NMDA actúa posiblemente a un nivel hipotalámico (Viguié *et al.*, 1995). En este mismo trabajo, comprobaron cómo la secreción de LH, inducida por el NMDA, era menor en ovejas en las que la LH se encontraba estimulada por un tratamiento con melatonina. Esto sugiere que los AAE pueden estar implicados en el control estacional de la reproducción que se ejerce a través de la melatonina, al provocar cambios en la sensibilidad frente al NMDA y la consecuente secreción de GnRH. Igualmente, en trabajos realizados con machos cabríos (Gazal *et al.*, 2002) se observó que el NMDA produjo un mayor incremento en la secreción de LH durante los días largos.

Varios estudios han demostrado que el NMDA estimula la liberación de GnRH tanto *in vitro* (Gay y Plant, 1982) como *in vivo* (Viguié *et al.*, 1995). Estos aminoácidos también pueden estimular otras vías neuromoduladoras, por ejemplo, la vía neuropéptida (Bonavera *et al.*, 1993) o la catecolaminérgica (Saitoh *et al.*, 1991). Los resultados de estos trabajos recomiendan la necesidad de realizar nuevos estudios que impliquen una mayor exposición frente a fotoperiodos inhibitorios para ver un rol más claro de los AAE en la regulación de la secreción de LH durante la época de anestro estacionario (Gazal *et al.*, 2002).

Otro de los aminoácidos que parece tener bastante importancia en el campo de la reproducción es el GABA, siendo el principal neurotransmisor inhibitorio cerebral y que deriva del ácido glutámico mediante un proceso de decarboxilación realizado por la glutamato-decarboxilasa. El sistema secretor del GABA es uno de los muchos que se encargan de modular la GnRH y la LH y es secretado por las células GABAérgicas de la médula espinal, también llamadas interneuronas; así mismo, existe presencia de neuronas GABAérgicas en el cerebelo, los ganglios basales y muchas áreas de la corteza cerebral. Numerosos estudios han demostrado que la administración de GABA, o análogos a GABA, intravenosamente (Masotto y Negro-Vilar, 1987; Mogilevsky *et al.*, 1991) o directamente a nivel del tercer ventrículo (Vijayan y McCann, 1978; Kang *et al.*, 1995; Leonhardt *et al.*, 1995), o aplicando estos análogos sobre cortes hipotalámicos o fragmentos de tejido (Masotto *et al.*, 1989; Feleder *et al.*, 1996) puede inhibir o activar la liberación de GnRH/LH.

Uno de los sitios de acción del GABA es en el área preóptica (POA), donde se encuentran la mayor parte de los cuerpos celulares secretores de GnRH, y además se encuentran neuronas secretoras de GABA y concentraciones elevadas de estradiol (Leranth *et al.*, 1985a; Herbison *et al.*, 1993). En este área estas neuronas secretoras de GABA sinaptan directamente o están muy próximas a las células secretoras de GnRH, en ratas o en ovejas, respectivamente (Leranth *et al.*, 1985b; Herbison *et al.*, 1993), lo que indicaría su implicación en la regulación de la secreción de GnRH. En cuanto a la acción del GABA, a nivel del hipotálamo mediobasal (MBH), en la regulación de la GnRH, no existe una clara evidencia de su papel, pero el descubrimiento de plexos densos de neuronas GABAérgicas (Vincent *et al.*, 1982), una alta afinidad de sitios para el GABA (Tappaz *et al.*, 1980), presencia de ARNm que codifica para múltiples subunidades del receptor GABA tipo A (GABA_A) (Araki *et al.*, 1992) y autorreceptores GABA tipo B (GABA_B) en la eminencia media (Anderson y Mitchell, 1985) son consistentes con la evidencia de que el GABA también podría actuar a éste nivel. Este supuesto sería respaldado por trabajos en los que la colocación de implantes GABA en el núcleo arcuato de ratas ovariectomizadas suprimía ligeramente la secreción de LH (Nishihara and Kimura, 1987).

Otras aproximaciones para demostrar el papel del GABA en la regulación de la secreción de GnRH/LH han sido mediante la utilización de una microinyección o infusión de drogas con acción GABA en el cerebro. Así, la aplicación de un antagonista GABA_A (bicucullina) y un agonista (muscimol) en el POA de hembras castradas y en el POA o MBH de machos, suprimía la secreción de LH (Scott y Clarke, 1993a, b; Ferreira *et al.*, 1996). La excepción a este resultado, se produjo cuando en algunas hembras OVX a las que se les trató con suficiente cantidad de estradiol para suprimir la secreción de LH durante el anestro estacionario, tanto la bicucullina como el muscimol incrementaron la secreción de LH (Scott y Clarke, 1993b). En otro trabajo en ovejas OVX, se ha observado como la aplicación de muscimol a nivel del POA produjo un descenso en la liberación de LH, resultado que no se obtuvo al utilizar un agonista de los receptores GABA_B (llamado baclofeno) (Scott y Clarke, 1993a), que, en cambio, sí ha demostrado provocar una prolongada supresión en la liberación de GnRH (Favit *et al.*, 1993; Martínez de la Escalera *et al.*, 1994). En otro trabajo realizado por Meyer y Goodman (1985), se encontró que una aplicación sistémica de una sola dosis de bicucullina, en ovejas, no tuvo efecto en la secreción de LH. Adicionalmente, mediciones de la salida de GABA, usando microdiálisis, en el MBH de la oveja durante

un celo inducido usando estradiol, no reveló una relación consistente entre la liberación de GABA y la liberación de LH o comportamiento de celo (Fabre-Nys *et al.*, 1994). Sin embargo, es importante resaltar que la localización de las pruebas de microdiálisis fueron altamente variables en ese estudio. Todos estos resultados nos indican que cambios en la liberación de GABA en el POA podrían modular la secreción de LH en la oveja, es decir, altas concentraciones de GABA suprimen la secreción de LH, siendo esto coincidente con los resultados obtenidos en hembras de rata (Herbison *et al.*, 1991).

Otro trabajo realizado en ovejas OVX mostró que la introducción de implantes subcutáneos de estradiol durante los días largos produjo un incremento en las concentraciones de GABA en el MBH a las 24-48 horas de la implantación (Gallegos-Sánchez *et al.*, 1996). Estos resultados conducen a los autores a pensar que tanto los receptores GABA_A y GABA_B tienen un rol importante en la regulación de la secreción de LH en la oveja. Otros trabajos han observado que la aplicación del agonista GABA_B ya sea en el POA o MBH revierte rápidamente el efecto *feedback* negativo del estradiol o testosterona sobre la LH (Jackson y Kuehl, 2002).

Además de su participación en el control de la LH, se ha observado también que, al parecer, determinadas poblaciones de neuronas GABA del POA y del hipotálamo ventromedial (HMV) están implicadas en la regulación de la secreción de prolactina, aunque es posible que intervengan en dicha regulación distintos tipos de receptores. Así, en trabajos realizados por Ferreira *et al.* (1998), en carneros, comprobaron como la infusión de agonistas y antagonistas de los receptores GABA_B en el POA alteró la liberación de prolactina, mientras que los agonistas y antagonistas de los receptores tipo A no tuvieron efecto; en cambio, si la inyección era a nivel del HMV, tanto los agonistas A y B como los antagonistas de los receptores tipo A fueron capaces de alterar la secreción de prolactina.

Al igual que se ha explicado en el caso del L-glutamato y el L-aspartato, también se ha puesto en evidencia la intervención del sistema neuronal GABAérgico en el control de la secreción circadiana de melatonina a nivel del hipotálamo dorsomedial, ya que la infusión de muscimol en esa zona del cerebro de ratas bloqueó por completo el aumento nocturno de los niveles de melatonina (Kalsbeek *et al.*, 1996). También se ha podido comprobar cómo si se suprime la actividad GABAérgica en el núcleo paraventricular del hipotálamo se consigue un incremento en los niveles de melatonina en la glándula pineal (Kalsbeek *et al.*, 2000). En la regulación de la biosíntesis de melatonina en la glándula pineal de la especie ovina parece que puede también tomar

parte el GABA, y probablemente sea un efecto ejercido sobre la actividad de la enzima arilalkilamina N-acetil-transferasa (AANAT) (Foldes *et al.*, 1984). Esto lleva a pensar que aparentemente existe un control estacional, e incluso del fotoperiodo, en la oveja sobre el sistema de los receptores GABA_A que regula la melatonina.

Por otra parte, también se han observado variaciones estacionales en el efecto del GABA sobre el control de la reproducción, indicando que en ovejas el fotoperiodo o el estradiol pueden modificar la función predominante de los receptores GABA_A en la regulación de la secreción de LH. En este aspecto, resultados obtenidos de otros sistemas están de acuerdo con la idea de que los sistemas GABAérgicos no son estáticos. Por ejemplo, a nivel del núcleo supraquiasmático, el efecto del GABA parece ser inhibitorio durante las horas de oscuridad y estimulador durante las horas de luz (Wagner *et al.*, 1997), e igualmente el efecto del GABA sobre los cambios neuronales que se producen en las células GnRH durante desarrollo prenatal se modifica, pasando de estimulador a inhibitorio a lo largo del mismo (Perrot-Sinal *et al.*, 2001).

Todas estas observaciones demuestran que el poder realizar un esquema de cuál es el rol del GABA sobre la secreción de GnRH/LH es muy complejo por diferentes motivos: en primer lugar, la complejidad intrínseca del sistema; en segundo lugar, las posibles diferencias en los diseños experimentales y finalmente los efectos de edad, fotoperiodo y situación esteroidea previa. Sin embargo, hay algunos puntos que son aceptados: (1) la alteración de la secreción de GABA modifica la secreción de GnRH/LH tanto en machos como en hembras; (2) los sistemas GABA_A y GABA_B están involucrados en estos procesos; (3) la regulación GABA es ejercida a diferentes niveles como el área preóptica, hipotálamo mediobasal y posiblemente en las propias neuronas GnRH; (4) el efecto más claro del GABA es la inhibición de la secreción de GnRH; y (5) la activación de los receptores GABA_B tanto en el área preóptica de las ovejas o en el hipotálamo mediobasal de los carneros pueden estimular la liberación de GnRH (Jackson y Kuehl, 2002).

3.7. NEUROPEPTIDO Y

Es bien sabido que un estado nutricional adecuado es indispensable para el mantenimiento de las funciones reproductivas normales en los pequeños rumiantes (Wade *et al.*, 1996). Los fallos a nivel reproductivo debido a una restricción nutricional se traducen en un descenso en la secreción hipofisaria de LH en respuesta a la

inhibición de la secreción hipotalámica de GnRH (McShane y Keisler, 1991). Uno de los mecanismos por los que parecen estar mediados esos efectos inhibitorios de la subnutrición es por la acción del neuropéptido Y (NPY), que ha sido asociado con varios procesos fisiológicos cerebrales, incluyendo la regulación del balance energético y la regulación del apetito (Okamura y Ohkura, 2007).

El NPY es un péptido neurotransmisor de 36 aminoácidos, descubierto por primera vez en la mucosa gástrica, siendo clasificado al inicio dentro del grupo de péptidos gastrointestinales, pero del que se han encontrado gran cantidad de neuronas secretoras en el hipotálamo. El NPY se sintetiza fundamentalmente en el núcleo arcuato, desde donde se proyecta al núcleo paraventricular, y es considerado un factor claro de la vía anabólica efectora (Dubois, 1993; Kalra *et al.*, 1999). La administración intracerebral de NPY induce un balance energético positivo al aumentar el almacenamiento de grasa, actuando fundamentalmente en el núcleo paraventricular y en el área perifornical adyacente donde abundan los receptores de NPY (Y_1 e Y_2).

El NPY está incluido dentro del grupo de neurotransmisores que controlan los efectos negativos de la subnutrición sobre la actividad reproductiva, ya que se han demostrado efectos inhibitorios sobre la secreción de LH en ovejas al mismo tiempo que se ha encontrado un aumento de la concentración de NPY en el SNC de corderas con niveles bajos de nutrición (Recabarren *et al.*, 1990; McShane *et al.*, 1992). Igualmente, en ratas (Kalra *et al.*, 1991), se ha demostrado que los niveles de NPY se incrementaron en el núcleo paraventricular cuando los animales fueron sometidos a ayuno, situación que fue revertida al volver a alimentarlos. Además, estudios morfológicos han evidenciado la existencia de sinapsis entre las neuronas NPY y las neuronas GnRH a nivel del área preóptica media (Norgren y Lehman, 1989; Tsuruo *et al.*, 1990). Igualmente, se ha demostrado que reduce el estímulo del sistema nervioso simpático al tejido adiposo pardo con el consiguiente descenso del gasto energético y el aumento de la lipogénesis en el tejido adiposo blanco (Zarjevski *et al.*, 1993).

En estudios realizados en caprino, las neuronas secretoras de NPY incrementan su actividad durante el ayuno, mientras que la actividad del pulso generador de GnRH disminuye (Ichimaru *et al.*, 2001). En otro trabajo realizado en cabras Shiba (Mogi *et al.*, 2003), en donde se estudió la correlación entre los niveles del NPY, la somatostatina en el LCR y la alimentación *ad libitum*, se observó que la liberación del NPY en el hipotálamo se realizaba de manera episódica, aproximadamente cada 2 horas y media, lo que posiblemente provocó el comportamiento de alimentación, a modo de señal

fisiológica. Las observaciones de este experimento respaldan la hipótesis formulada por Kalra *et al.* (1999), en donde afirman que el NPY es una señal fisiológica para la inducción del apetito. Igualmente, en el caprino, la expresión del NPY en el núcleo arcuato se incrementa marcadamente durante situaciones de ayuno (Stanley y Leibowitz, 1985). En cuanto al ovino, se ha observado que una restricción en la alimentación incrementa la expresión del gen NPY y las concentraciones del mismo a nivel del líquido cefalorraquídeo (LCR) (McShane *et al.*, 1992; Adam *et al.*, 1997).

En cuanto a la relación del NPY con la reproducción, la actividad biosintética de las neuronas NPY parece aumentar durante un periodo de restricción alimenticia, por lo que parece bastante claro suponer que las neuronas NPY son un vínculo neuromodulador importante entre el estado nutricional y la actividad de las neuronas GnRH (McShane *et al.*, 1993). Estos mismos autores sugieren la posibilidad de que exista una relación entre los péptidos opioideos endógenos y el NPY, de modo que en situaciones de subnutrición se produzca una supresión de la secreción opioidea a través de un incremento en la actividad de las neuronas NPY. Es más, los tratamientos con naloxona en las ratas parecen aumentar las concentraciones de NPY en el núcleo arcuato, eminencia media y área preóptica medial (Sahu *et al.*, 1990; Kalra *et al.*, 1991). En otro estudio, la administración intraventricular de NPY, en conejas enteras y ratas, produjo una importante inhibición de la secreción de LH, mientras que en las hembras OVX+E₂ el efecto fue del tipo estimulador (Kalra y Crowley, 1984; Khorram *et al.*, 1987). Por el contrario, cuando se realizó esta experiencia en ovinos OVX, el efecto del NPY sobre la secreción de LH no pudo ser revertido por la administración de estrógenos (McShane *et al.*, 1992), por lo que en cuanto al lugar de acción del NPY parecen existir diferencias entre especies.

En ovejas parece que el control de la secreción pulsátil de LH por parte del NPY es ejercida a nivel del MBH más que sobre los cuerpos celulares GnRH del área preóptica, llevándose esto a cabo a través de los receptores NPY tipo Y₂ (Barker-Gibb *et al.*, 1995). Concretamente, se sugiere que el NPY actúa a nivel de los terminales de las neuronas GnRH de la eminencia media, en la que se reciben un 50% de los terminales de estas neuronas del área preóptica (Caldani *et al.*, 1988). Además, existen ciertas evidencias acerca de una mayor actividad de los receptores tipo Y₂ durante la época reproductiva. En un estudio realizado por Clarke *et al.* (2000) se concluye que, en ovejas OVX, la expresión de los genes que codifican en NPY se encuentra disminuida durante la época del año en la que la ingestión voluntaria de alimento es menor, pero

aún no se ha conseguido establecer la relación entre el NPY y los cambios estacionales en la reproducción.

3.8. COROLARIO

A modo de resumen, ha quedado clara la complejidad de los sistemas neuronales que regulan la reproducción a través del control de la GnRH/LH, y se podría sintetizar de la siguiente manera:

- Los **opioideos endógenos** participan en la disminución de la secreción de gonadotropinas a nivel del hipotálamo, modulando la LH, y actuando cuando las situaciones son inadecuadas para la reproducción. La naloxona, antagonista opioideo, demuestra una fuerte acción para inhibir a los EOPs, tanto en caprino como ovino, lo que estimula la secreción de LH; si bien, en razas ovinas menos estacionales parece no ocurrir lo mismo, posiblemente debido a que otros mecanismos neuronales estén involucrados. Su acción más importante en el aumento de frecuencia de pulsos de LH se ha observado tanto al principio como al final del anestro estacionario, siendo esta acción independiente del nivel de alimentación, como lo muestran los resultados encontrados en ovejas.

En cuanto al efecto de la naloxona, en el control de la estacionalidad en el caprino, se han encontrado distintos resultados, tanto durante el anestro estacionario como en la estación reproductiva; también se ha descrito un efecto mayor en la estimulación de la secreción de LH cuando se han utilizado dosis pequeñas que cuando se han usado dosis elevadas, hecho observado en machos y en hembras. Además, a diferencia del ovino, sí se observó una respuesta positiva en animales sometidos a un mejor nivel de alimentación. Sin embargo, al ser aplicada en pleno anestro estacionario, la naloxona no ha mostrado efecto sobre la secreción de LH. Adicionalmente, la efectividad de la naloxona ha sido estudiada en tratamientos de sincronización de celo en las hembras y en la mejora de la fertilidad y líbido de los machos mostrando resultados positivos.

- El **sistema dopaminérgico** también tiene una participación importante en la supresión de la secreción de LH por el estradiol durante el anestro estacionario. Estos hechos se han observado por que una inyección de su antagonista, el pimozide, es capaz de incrementar la frecuencia de pulsos de LH tanto en hembras enteras como en OVX+E₂ durante el anestro, siendo más fuerte la estimulación de la LH al inicio del

anestro estacionario y en estados de fotorrefractoriedad a los días cortos. Su escasa actividad al final del anestro no está muy clara y puede ser por la implicación de otros sistemas neuronales. En cuanto a su relación con la nutrición, la acción del pimozide fue más efectiva en ovejas bien alimentadas, por lo que se sospecha que altos niveles de alimentación podrían reducir la actividad de este sistema neuronal, sobre todo en los periodos de transición del anestro a la estación reproductiva. También existe cierto nivel de implicación con otras hormonas como la melatonina y la prolactina. En cuanto a su implicación en el control de la estacionalidad reproductiva caprina no se han desarrollado trabajos que la hayan estudiado.

Ha quedado demostrado que el núcleo dopaminérgico A15 es posiblemente un punto clave en el efecto *feedback* negativo que el estradiol ejerce sobre la secreción tónica de LH.

- El **sistema serotoninérgico** ha mostrado tener una acción inhibitoria sobre la liberación de LH durante el anestro estacionario en mecanismos tanto dependientes como independientes del estradiol. La cyproheptadina, antagonista serotoninérgico, estimula la secreción pulsátil de LH, actúa sobre la descarga preovulatoria de LH y también en el momento del pico de LH. Su actividad es mayor al inicio del anestro, sin observarse mayores cambios al final del mismo. También actúa frente a situaciones de fotorrefractoriedad a los días cortos y su dosis parece ser más efectiva en cantidades bajas. Se necesitan realizar estudios en caprino para ver su efecto durante el periodo de anestro estacionario.

- El **sistema noradrenérgico** ha manifestado tener un papel importante sobre la descarga preovulatoria de LH. La acción de la noradrenalina se realiza mediante sinapsis directas entre las neuronas, estando mediada por las neuronas GABAérgicas. El uso de su antagonista, la fenoxienzamina, puede provocar un incremento momentáneo en la secreción de LH en hembras enteras. En ovejas OVX+E₂ no parece tener mucho efecto, ya que es posible que sea inhibida por acción del estradiol.

- Los **aminoácidos excitatorios** han demostrado tener una importante función neurotransmisora, en especial el L-glutamato y los GABA. El NMDA, un agonista de este tipo de receptores, aumenta la secreción pulsátil de LH y es dependiente de los esteroides ováricos, ya que no existe ningún efecto en animales OVX sin el aporte exógeno de estradiol. Su efecto es independiente del nivel de alimentación sobre todo en animales prepúberes y, en otros trabajos, se ha observado una acción más fuerte bajo fotoperiodos de fotoinhibición que durante la fotoestimulación. La acción del NMDA a

nivel hipotalámico resultó ser mejor en animales implantados con melatonina, por lo que los AAE podrían estar implicados en el control estacional de la reproducción a través de dicha hormona.

Por otra parte, los GABA modulan la secreción de GnRH/LH a nivel cerebral (área preóptica, hipotálamo mediobasal y núcleo arcuato). Estudios utilizando antagonistas (bicucullina) y agonistas (muscimol) han mostrado acción a nivel de las áreas cerebrales mencionadas, siendo su acción más fuerte en el área preóptica, en donde altas concentraciones de GABA suprimen la secreción de LH. El uso de implantes de estradiol durante los días largos provoca el incremento de GABA a nivel del hipotálamo mediobasal. El GABA también actúa en la regulación de la secreción de prolactina mediante los receptores de GABA en el hipotálamo ventromedial y de la melatonina a través de los receptores GABA en el hipotálamo dorsomedial y núcleo paraventricular del hipotálamo. También se piensa que los sistemas GABAérgicos no son estáticos pudiendo variar según la situación fotoperiódica en la que se encuentren.

- Y finalmente, el **neuropéptido Y** es secretado en el núcleo ARC y actúa a nivel del NPV. Se afecta por el nivel de alimentación del animal, de manera que una restricción nutricional provoca el descenso en la secreción hipofisiaria de LH, y a este nivel actúa en la regulación del apetito y control del balance energético. Sus niveles son indicativos del estado nutricional del animal, subiendo los niveles de NPY durante situaciones de ayuno lo que provoca la inducción del apetito. Es posible que el NPY esté relacionado con los EOPs, ya que situaciones de subnutrición han provocado una supresión de la secreción de los EOPs al aumentar el NPY.

4. INFLUENCIA DE LA NUTRICIÓN SOBRE EL CONTROL DE LA REPRODUCCIÓN

4.1. INTRODUCCIÓN

Es bien sabido que la nutrición afecta a muchos aspectos de la reproducción, que son comunes tanto al ganado caprino como al ovino así como a muchas otras especies de mamíferos, tales como la edad a la pubertad en ambos sexos, la tasa de ovulación, la supervivencia embrionaria, la fertilidad, el intervalo hasta la próxima estación reproductiva o el crecimiento testicular y la producción espermática (Smith, 1991; Clarke y Tilbrook, 1992; Rhind, 1992; Robinson, 1996; Delgadillo *et al.*, 1999; Zarazaga *et al.*, 2005; 2009b).

Lograr que las hembras se reproduzcan constituye la suma de una serie de hechos que precisan, entre otras cosas, de un nivel y composición nutritiva adecuada (Gunn, 1983). Así, en unas condiciones nutritivas fluctuantes a lo largo del año, la estrategia que conducirá a un mayor éxito en el manejo de los animales será aquella en la que las hembras dispongan de una mejor alimentación en los periodos críticos de su actividad reproductiva (Lindsay, 1996). Los pequeños rumiantes están adaptados a la alimentación en pastoreo y por lo tanto las condiciones de alimentación varían enormemente en función de factores como el clima, suelo o la vegetación existente.

A pesar de que existe unanimidad en la literatura a la hora de considerar el efecto positivo que la nutrición ejerce sobre la tasa de ovulación y la reproducción en general, distintos autores han demostrado que la actividad sexual es un parámetro menos modificable mediante la nutrición, debido a que, principalmente, está controlada por el fotoperiodo. Existen pocos trabajos en el caprino en relación al control de la estación reproductiva por acción de la nutrición y de qué manera influye sobre la presentación de ciclos sexuales (Zarazaga *et al.*, 2005). Estos autores observaron que las cabras mejor alimentadas presentaron una duración del periodo de actividad reproductiva más largo que las cabras que estaban peor alimentadas. Igualmente, también se ha indicado que una severa subnutrición puede prolongar la duración del anestro estacionario como consecuencia de una precoz finalización de la estación sexual (Knight *et al.*, 1983; Richards *et al.*, 1989). Por otro lado, la condición corporal, que es un predictor del estado de reservas corporales del animal y por extensión del nivel nutricional que está recibiendo, tiene una clara influencia sobre la duración del periodo de actividad

reproductiva. Así, en cabras de raza Payoya y en ovejas de la raza Rasa Aragonesa, una mejor condición corporal acortó la duración del anestro estacional, comparado con aquellas que tenían un menor estado corporal (Forcada *et al.*, 1992; Zarazaga *et al.*, 2005). Es conveniente destacar que la reducción del anestro estacionario se produce más como consecuencia de un retraso en el inicio del mismo que debido a un adelanto del comienzo de la estación reproductora, con lo que la nutrición parece actuar más eficazmente en situaciones de fotorrefractoriedad a los días cortos que en otras de sensibilización al efecto inhibitor de los días largos previos al solsticio de verano. Finalmente, en caprino también se ha observado que un menor estado corporal puede provocar que la frecuencia de ciclos estrales largos y cortos sea más elevada que en hembras con mejor condición corporal (Rondina *et al.*, 2005).

Tanto en caprino (Henniawati y Fletcher, 1986; Mani *et al.*, 1992) como en ovino (Forcada *et al.*, 1992; Rhind y McNeilly, 1998; Scaramuzzi *et al.*, 2006) se ha observado que la nutrición y el nivel de reservas corporales afectan a la tasa de ovulación y fertilidad, de manera que, en general, la tasa de ovulación es mejor cuando se mejora el nivel de alimentación o el estado de condición corporal. También, los resultados reproductivos en los pequeños rumiantes están correlacionados con cambios en el peso vivo. Así por ejemplo, en la cabra Boer, se observó que el peso vivo medio y el inicio de la pubertad variaron en función del nivel energético de la dieta (Greyling, 1988); incluso, en vacuno de carne, importantes pérdidas en el peso provocan inactividad reproductiva (Richards *et al.*, 1989).

Por otro lado, las deficiencias nutricionales pueden mostrar sus efectos en un corto, medio o largo plazo. Así, mientras muchos estudios muestran que una pérdida de peso corporal no afecta en gran medida el rendimiento reproductivo, las pérdidas acumuladas durante varias estaciones reproductivas pueden propiciar estados de esterilidad en los animales (Robinson, 1981). Si bien se conocen los principios generales de la respuesta a estos resultados, todavía es necesario desvelar un buen número de mecanismos endocrinos implicados, ya que las condiciones concretas en las que se han realizado la mayoría de los estudios y las diferencias entre las razas utilizadas (Gunn, 1983) hacen que los resultados sean difícilmente comparables.

Por lo descrito anteriormente, a la hora de intentar analizar los efectos de la nutrición sobre la reproducción, es necesario aportar información concreta, como en qué momento (época o momento del ciclo reproductivo) una mejora de la nutrición tiene un mayor efecto sobre la reproducción o bien intentar realizar alguna predicción del

aumento de los rendimientos reproductivos en función de la magnitud y duración del tratamiento alimenticio llevado a cabo.

4.2. EFECTOS DE LA NUTRICIÓN A LARGO PLAZO

Cuando hablamos de los efectos a largo plazo nos referimos a la influencia que ejerce la nutrición sobre los parámetros reproductivos de la futura hembra adulta, desde el estadio fetal hasta el momento en el que se alcanza la madurez sexual (Gunn, 1983).

Estudios realizados en ovejas han mostrado que una subalimentación severa durante el final de la gestación produce un descenso en el peso del cordero al nacimiento y en su vigor para obtener leche de la madre (Peart, 1967), aunque existe poca información acerca de las consecuencias que puede tener una subnutrición al final de la gestación y durante la lactación sobre los rendimientos reproductivos de las hijas. De igual manera, en otro trabajo también realizado en ovinos, Allden (1979) sugiere que la alimentación durante la lactancia (los dos primeros meses de vida) es especialmente crítica, de modo que una carencia importante puede ser que posteriormente no pueda llegar a ser subsanada con una buena alimentación a lo largo de su futura vida productiva.

Fisiológicamente, los efectos de la nutrición a largo plazo pueden explicarse a partir del *pool* de folículos primordiales de los que serán reclutados todos los folículos a lo largo de la vida del animal, y que queda establecido ya en el momento del nacimiento en la mayoría de las especies animales entre las que se incluyen las especies caprina y ovina (Greenwald y Terranova, 1988). Trabajos realizados en ovejas muestran que los efectos de la nutrición a largo plazo se ve reflejada en la fisiología de la población de los folículos primordiales (Rhind, 1992). También se ha observado cómo una subnutrición en las madres de las futuras hembras de reposición, tanto durante la gestación como en la lactación, pueden afectar de forma importante a su vida reproductiva posterior, presentando una menor tasa de prolificidad como consecuencia de un mayor porcentaje de pérdidas embrionarias (Gunn *et al.*, 1995).

Los efectos de la nutrición a largo plazo no se han descrito sólo en corderas sino que también se ha visto que una fuerte subnutrición en hembras adultas tuvo consecuencias, entre 6 y 12 meses después, en una tasa de ovulación significativamente inferior a otras ovejas alimentadas adecuadamente, a pesar de que el peso vivo de ambos lotes era el mismo un mes antes del control de la tasa de ovulación (Fletcher,

1974). Las consecuencias de la aplicación de un tratamiento de subalimentación a lo largo de la gestación van a depender mucho del momento en que tenga lugar el tratamiento. Un periodo que parece crítico en el desarrollo fetal de las hembras ovinas, es aquel en el que tiene lugar el final del crecimiento folicular en el feto en desarrollo (aproximadamente a los 110 días de gestación; Mauleón, 1973), a partir del cual el número de folículos ováricos ya no puede ser modificado.

De acuerdo a lo encontrado en la especie ovina los sistemas neuronales GnRH se establecen aproximadamente entre los 35 y 85 días de la gestación y, a partir de ese momento ya son muy similares a los del animal adulto (Caldani *et al.*, 1995), por lo que es posible que la influencia del estado nutricional durante la gestación ejerza un efecto directo a nivel gonadal más que sobre el eje hipotálamo-hipófisis (Rhind *et al.*, 2001). Cada una de las etapas del desarrollo gonadal normal se asocia con un ambiente hormonal concreto y si se retrasa ese desarrollo o se altera el medio hormonal lo que ocurrirá es un problema de asincronía cuyas consecuencias exactas aún resultan desconocidas, pero que posiblemente podrían contribuir a que estados de subnutrición severos afecten de manera negativa el desarrollo fetal (Rhind *et al.*, 2001). No existe hasta el momento información exacta acerca de los efectos que la subnutrición ejerce sobre el sistema neuronal GnRH, aunque estudios realizados en humanos han establecido que sus efectos negativos antes del nacimiento son capaces de modificar determinados genes, dando lugar a alteraciones, no solo en el feto, sino también su descendencia y futuras generaciones (Lumey, 1992).

Por otro lado, y en relación a los efectos del plano de alimentación sobre el periodo pre-puberal y el inicio de la pubertad, hay que tener en cuenta que la hembra debe alcanzar un peso vivo mínimo en el momento adecuado y con un fotoperiodo decreciente. Esto quiere decir que una restricción alimentaria puede retardar el momento en el que la hembra alcanza ese peso vivo mínimo, y por tanto producir un retraso en la aparición de la pubertad que puede quedar aplazada incluso hasta la siguiente estación reproductiva; un hecho que muchas veces no puede llegar a evitarse ni con una sobrealimentación, especialmente, en el caso del ovino, si se trabaja con razas que presentan un anestro estacional muy marcado (Foster *et al.*, 1985; Dyrmondsson, 1987).

Está ampliamente admitido que la hembra caprina joven debe cubrirse cuando alcanza por lo menos un 50% del peso vivo adulto y la edad puede variar dependiendo del tipo de dieta recibido; así por ejemplo, en cabras jóvenes en condiciones de pastoreo empezaron a ser cíclicas a los 219 días con un peso vivo de unos 10 kg (Fasanya *et al.*,

1992). En este mismo trabajo, chivas suplementadas con un pienso proteico iniciaron su ciclicidad a los 191 días y con el mismo peso que las no suplementadas, y aquellas que fueron alimentadas solamente con maíz iniciaron sus ciclos a los 260 días, con un peso vivo de 9 kg. En otro experimento (Wolde-Michael *et al.*, 1989), chivas Cashmere, nacidas en primavera y suplementadas con pienso proteico, presentaron su primer celo a los 172 días frente a los 202 días de aquellas que no fueron suplementadas, pero teniendo el mismo peso ambos grupos experimentales. En cuanto a razas caprinas Mediterráneas como la Payoya, se encontró en chivas nacidas en distintas épocas del año (otoño e invierno) y divididas a su vez en dos grupos experimentales en función del nivel de alimentación (chivas que recibían 1,5 y 1 vez las necesidades de mantenimiento) que ni el nivel de alimentación ni la época de nacimiento modificaron el inicio de la pubertad, que se produjo, en ambos casos, en su primera época de actividad reproductiva (Zarazaga *et al.*, 2009c). Estos autores también observaron que las chivas de mayor peso vivo tuvieron una mayor tasa de ovulación a la pubertad y sin embargo la nutrición no afectó dicho parámetro. Estos hechos vienen a confirmar lo descrito por Keane (1974), en el sentido de que el efecto del nivel de alimentación sobre la tasa de ovulación en hembras nacidas fuera de la estación reproductiva no es importante. Y también vienen a corroborar el hecho de la reducida influencia que tiene la nutrición sobre la tasa de ovulación en animales con una elevada tasa de ovulación como es, en general, el caso de la especie caprina (Gunn, 1983). En el caso de corderas, se ha observado también que aquellas nacidas en una época favorable, el hecho de llegar al momento esperado de inicio de la pubertad con un peso inferior (50% frente a un 70% del peso vivo adulto) no produjo modificaciones en cuanto a la aparición del primer celo pero sí que redujo la duración de la primera estación sexual y, además, empeoró la tasa de ovulación media, aunque después existiera una alimentación adecuada (Bizelis *et al.*, 1990).

Además, el inicio de la pubertad en chivas está asociado con una alta incidencia de actividades reproductivas anormales (celos anovulatorios, ovulaciones silentes, ciclos cortos, etc.). Los resultados obtenidos por Delgadillo *et al.* (1997) y Zarazaga *et al.*, (2009c) mostraron cómo entorno al 50% de los primeros celos puberales en chivas eran anovulatorios, y que un 36% de las primeras actividades luteales no se acompañaron de comportamiento de celo. Estos resultados son también coincidentes con los descritos en razas caprinas tropicales, con un 44% (Freitas *et al.*, 2004) y en Mediterráneas con hasta

un 60% (Chentouf *et al.*, 2011) de actividades reproductivas irregulares antes de detectar el primer celo.

Durante los periodos de exposición a una nutrición inadecuada o un fotoperiodo inhibitorio, el fracaso para alcanzar la pubertad surge porque se mantiene una elevada sensibilidad del generador de pulsos de GnRH frente al *feedback* negativo del estradiol. Trabajos realizados en corderas han mostrado que, en presencia de una señal de fotoperiodo favorable, una mejoría en la alimentación viene acompañada con una menor sensibilidad al *feedback* negativo del estradiol y el inicio rápido de los pulsos de LH que desencadenan el inicio de la pubertad (Foster *et al.*, 1986). De hecho, en corderas OVX+E₂, sometidas a una alimentación que restringía su crecimiento, Foster *et al.* (1985) encontraron que un aumento en la ingestión de alimento fue capaz de provocar un incremento en la frecuencia de pulsos de LH. Esto puede afectar incluso durante el desarrollo neuroendocrino del feto, ya que la restricción alimenticia puede afectar el desarrollo del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas y, por ende, alterar negativamente el inicio de la pubertad en la cordera (Da Silva *et al.*, 1998), así como su desarrollo reproductivo posterior.

En cuanto al uso de tratamientos de sincronización de celo usados en cabras, cuando los niveles bajos de alimentación son mantenidos por largos periodos después de la cubrición, la mortalidad embrionaria se incrementa (Mani *et al.*, 1992) mientras que una realimentación anula estos efectos (Bocquier *et al.*, 1998). Estos trabajos nos muestran que, a pesar de tener condiciones nutricionales deficientes, es posible inducir celo y ovulación con un tratamiento adecuado de sincronización, pero no todos los animales van a responder igual a estos tratamientos. La glucosa, junto a otros metabolitos como ácidos grasos no esterificados y el β -hidroxibutirato, son indicadores del estado nutricional, observándose que cuando se modifica el nivel nutricional se producen cambios en los metabolitos sanguíneos (Chilliard *et al.*, 1998). Sin embargo, los tratamientos hormonales modifican profundamente los parámetros sanguíneos y ya no resultan ser un reflejo del estado nutricional de los animales. Esto podría explicar el por qué las hembras caprinas responden a los tratamientos hormonales, aun estando en condiciones de alimentación deficientes (Walkden-Brown y Bocquier, 2000).

4.3. EFECTOS DE LA NUTRICIÓN A MEDIO PLAZO

Los efectos a medio plazo se refieren a las consecuencias que tienen las fluctuaciones alimentarias durante los meses que preceden a la cubrición. Estas fluctuaciones se traducen en un depósito o movilización de las reservas corporales y, por tanto, en modificaciones del peso vivo y la condición corporal de las hembras, tanto ovinas como caprinas. Estos parámetros van unidos y es muy difícil separarlos durante un experimento por lo que ambos afectan a la composición corporal de los animales y se utilizan para cuantificar los efectos de la nutrición a medio plazo sobre los parámetros reproductivos. La determinación de la condición corporal permite la realización de una evaluación rápida y relativamente fiable del estado de reservas grasas existentes en el animal, tanto en ovinos (Russel *et al.*, 1969) como en caprinos (Hervieu *et al.*, 1989). Este efecto a medio plazo es lo que se conoce, clásicamente, como “efecto estático” del peso (Coop, 1966). Los efectos estáticos están referidos a estos conceptos de peso vivo y condición corporal y los “efectos dinámicos” están relacionados con el balance del estado nutricional en términos de energía, aminoácidos, etc. (Smith y Stewart, 1990); y de qué forma éstos se relacionan con los cambios en la tasa de ovulación y la fertilidad (Rattray *et al.*, 1980). La razón por la cual la nutrición afecta a los parámetros reproductivos es que se ha demostrado que una fuerte restricción en los niveles de alimentación, tiene efecto a nivel endocrino, incluyendo cambios en el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, en la actividad del sistema nervioso simpático, en la función tiroidea y en la adrenal, alterando también la regulación de la hormona del crecimiento y la prolactina (Scaramuzzi y Martin, 2008).

Uno de los parámetros que más se puede alterar a medio plazo es la estacionalidad sexual, es decir, la duración del anestro, sobre todo en razas de mayor estacionalidad. Trabajos realizados en cabras adultas de la raza Payoya (Zarazaga *et al.*, 2005) han encontrado que esta raza muestra una clara estacionalidad, presentándose el inicio de la actividad sexual de agosto-septiembre hasta enero, y que aquellas cabras mejor alimentadas tuvieron un anestro estacional 32 días más corto que aquellas que estaban en mantenimiento, siendo estos resultados semejantes a lo encontrado en otros estudios en caprinos (Mellado *et al.*, 1991; Walkden-Brown *et al.*, 1994a).

En cabras sometidas a dietas normales de alimentación durante la época reproductiva, su capacidad reproductiva (fertilidad y tasa de ovulación) fue dependiente del estado corporal (Walkden-Brown y Bocquier, 2000). Sin embargo, no se ha

encontrado efecto negativo de un estado de sobreengrasamiento sobre los parámetros reproductivos en caprino, a diferencia de la oveja.

Aparentemente la salida en celo en la cabra es menos dependiente de la nutrición a diferencia de lo que ocurre con la tasa de ovulación, por ejemplo en cabras Saanen y Toggenburg, con una baja condición corporal y sometidas a una severa restricción alimenticia (menos del 25% de la energía necesaria para mantenimiento) durante 19 días antes de ser sincronizadas mediante esponjas vaginales, la salida en celo no se vio afectada significativamente, pero sí disminuyó la tasa de ovulación y se retrasó el momento de ovulación (Mani *et al.*, 1992). Igualmente, en cabras enanas prolíficas de Indonesia, con una ganancia diaria de peso de 30 g/día, la tasa de ovulación se mantuvo constante (1,8 cuerpos lúteos) cuando a los animales se les mantuvo su peso, pero se incrementó por encima de 2,5 cuerpos lúteos cuando el peso vivo se incrementó de 18 a 25 kg (Henniawati y Fletcher, 1986).

En otros trabajos realizados con cabras en zonas Mediterráneas (Córcega y Cerdeña), la actividad ovárica se ha observado que es dependiente de la estación y de la condición corporal de los animales (Branca *et al.*, 1997), no contándose, sin embargo, con documentación acerca de los factores que podrían influir en los resultados reproductivos de los caprinos en esas regiones Mediterráneas (Landau y Molle, 1997). En uno de los pocos trabajos en los que se ha estudiado el efecto de la nutrición-condición corporal en cabras Mediterráneas se ha observado que las cabras que se encontraban con un mejor estado de reservas corporales ($\geq 2,75$) presentaron una duración menor del periodo de anestro estacionario pero no se modificó la tasa de ovulación (Zarazaga *et al.*, 2005). En el caso del ovino, se ha observado algo similar en cuanto a la estacionalidad reproductiva, pero, además, se ha visto como las diferencias en la tasa de ovulación entre grupos de ovejas de Rasa Aragonesa con un nivel diferente de condición corporal ($\leq 2,50$ vs. $\geq 2,75$) se intensificaban al inicio de la época de actividad sexual. Podría ser que los animales más delgados no consiguen reactivar toda su actividad ovulatoria hasta bien empezada la estación reproductiva (Forcada *et al.*, 1992). En otros trabajos (Gunn *et al.*, 1991), la máxima fertilidad (86%) y tasa de ovulación (2,13) ocurrió con una óptima condición corporal (2,50-2,75), de modo que las ovejas muy gordas o muy delgadas mostraron la menor fertilidad (78%) y tasa de ovulación (1,82 y 2,03 corderos/parto, para condición corporal baja $\leq 2,25$ y alta $\geq 3,00$, respectivamente).

En un estudio realizado por Véliz *et al.* (2006) con cabras criollas de México, se encontró la existencia de una correlación positiva entre el peso vivo medio (grupos bajo: ≤ 33 kg; medio: 34-50kg; alto: ≥ 51 kg) y la respuesta de las cabras en anestro al ser expuestas a un efecto macho. Además, resulta interesante observar que la respuesta de las cabras de bajo peso tiene mucho que ver con la actividad sexual que presenten los machos al ser expuestas a éstos (Mellado *et al.*, 1994), situación que no ocurre en el caso de las ovejas (Wright *et al.*, 1990). También, el peso parece afectar a la tasa de ovulación, presentando unos mayores valores aquellas cabras que presentan un mayor peso vivo (>50 kg) (Zarazaga *et al.*, 2005).

Unos niveles de nutrición insuficientes en la cabra provocan una disminución de la foliculogénesis (Blache y Martin, 2009) y un alargamiento del periodo de anestro con la consecuente aparición de prolongados periodos anovulatorios, reducciones de fertilidad y prolificidad, y también puede provocar un aumento de la mortalidad de las crías en la primavera (Delgadillo *et al.*, 1997). Los mecanismos por los que la nutrición ejerce todos estos efectos a medio plazo llevan consigo variaciones en la secreción hipofisiaria de la LH, ya que, al menos en la oveja, un plano alto de alimentación implica un aumento en la concentración media y la frecuencia de liberación de pulsos de LH (Rhind *et al.*, 1991; Abecia *et al.*, 1995; Blache y Martin, 2009), efecto que también se ha observado en ovejas de reducida estacionalidad sexual (Forcada *et al.*, 1997).

En relación a la oveja, en un trabajo realizado para determinar cuál de los dos parámetros (peso vivo o condición corporal) estaba más relacionado con los índices reproductivos (Guerra *et al.*, 1972), se observó que aquellas hembras de mayor tamaño corporal tenían una tasa de ovulación superior a las más pequeñas, con una misma condición corporal; del mismo modo, también los animales con mayor nivel de condición corporal presentaban una mayor tasa de ovulación, en comparación con animales de menor condición corporal aunque con un peso similar. Parece que el tamaño y la condición corporal contribuyen de forma parecida sobre los cambios de peso vivo en la especie ovina (Knight y Hockey, 1982).

En los pequeños rumiantes, existen una serie de hormonas cuyo patrón de secreción puede modificarse en función del estado nutricional, contándose entre ellas a la insulina (Bassett, 1974), la IGF-1 y la hormona tiroidea T₃ (Rhind *et al.*, 1998) y la leptina (Hardie *et al.*, 1996). Estas hormonas endocrinas están ligadas a las reservas energéticas y cumplen una serie de funciones como reguladores endocrinos, contando entre éstas a la reproducción. Es bien conocido como tanto la insulina como la IGF-I

actúan directamente sobre las gónadas (Gong *et al.*, 1991). Lo mismo sucede con la leptina (Clarke y Henry, 1999; Banks *et al.*, 1996) y la hormona tiroidea T₃ (Shi y Barrell, 1992; Morrelae de Escobar *et al.*, 1993). Por ello, todas ellas pueden mediar los efectos ejercidos por la nutrición sobre la reproducción.

Igualmente, los metabolitos sanguíneos tales como la glucosa, los ácidos grasos no esterificados y el β -hidroxibutirato son considerados factores limitantes en animales subnutridos y pueden servir de señal tanto a nivel gonadal como central en la regulación de la reproducción (Chillard *et al.*, 1998). De este modo, y de acuerdo a estudios realizados con cabras, parece ser que la glucosa e insulina actúan modulando la secreción de GnRH/LH (Tanaka *et al.*, 2002; Ohkura *et al.*, 2004), si bien su papel no parece estar del todo claro porque los resultados son contradictorios. En general, los nutrientes tienen influencia en la secreción de GnRH en situaciones de deficiencia extrema, pero sólo a nivel experimental, ya que en condiciones de pastoreo natural, no se llegan a esos extremos (Blache y Martin, 2009). Estudios realizados en cabras respecto al papel de las grasas, mostraron que una severa privación de lípidos a nivel celular no reduce la actividad de las neuronas de GnRH (Ohkura *et al.*, 2004), mientras que en carneros, suplementados con ácidos grasos, incrementaron la secreción de GnRH (Blache *et al.*, 2000).

Como ya se ha comentado antes, otra de las hormonas relacionadas con el nivel de alimentación y que es secretada por el tejido adiposo es la **leptina**. Esta hormona juega un papel importante, ya que es un reflejo del estado de reservas energéticas del animal, de modo que, bajo condiciones inadecuadas de alimentación, sus niveles se reducen y actúa como una señal metabólica que provoca la inhibición de la actividad del eje reproductivo-neuroendocrino, tanto en machos como en hembras caprinas (Ahima, 2005) y ovinas (Cunningham *et al.*, 1999). La expresión y liberación de la leptina resulta ser alterada por cambios en el estado metabólico, actuando a nivel de la reproducción debido a la sensibilidad de los tejidos gonadales y cerebrales hacia esta hormona. Concretamente, en los pequeños rumiantes, se ha demostrado cómo los niveles de leptina se alteran en respuesta a una restricción alimentaria, y cómo la concentración de dicha hormona tiene la capacidad de regular multitud de procesos fisiológicos entre los que se incluyen la ingestión de alimentos y la secreción de la hormona del crecimiento (Morrison *et al.*, 2001). De igual forma, otros estudios han propuesto que la leptina actúa como facilitador del desarrollo reproductivo con la llegada de la pubertad (Smith y Clarke, 2010).

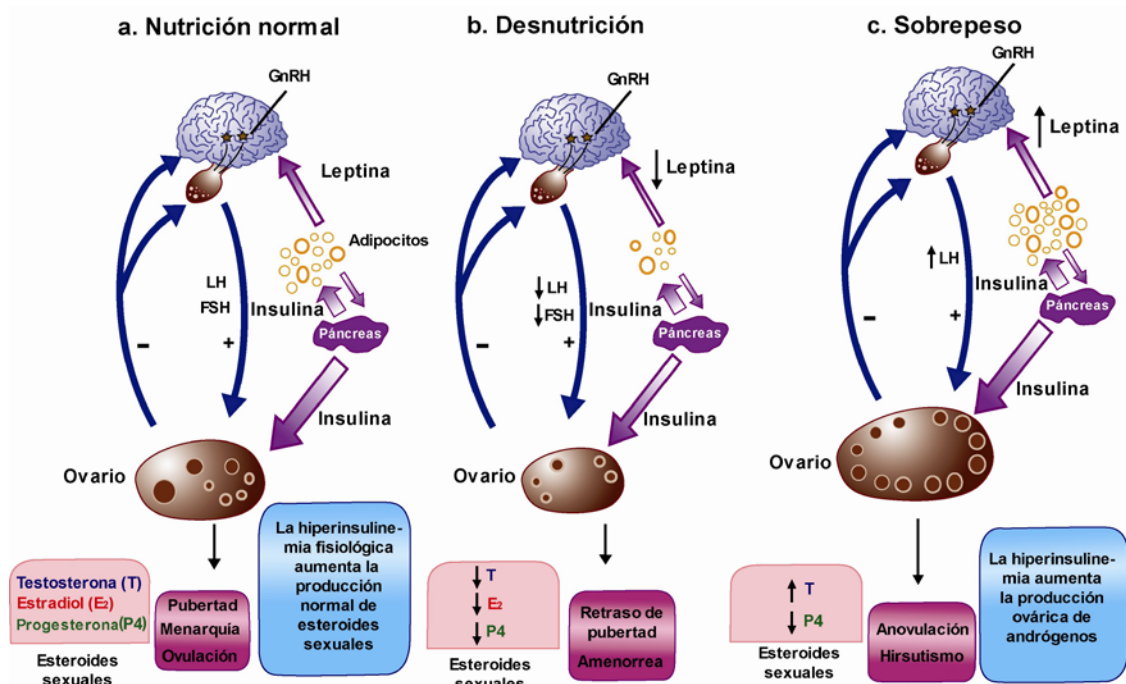
Diferentes estudios han mostrado su capacidad para afectar a los sistemas neuroendocrinos que controlan la actividad del eje reproductivo (Adam *et al.*, 2003; Chilliard *et al.*, 2005; Blache y Martin, 2009), ya que se han encontrado receptores de leptina en la glándula pineal y en el sistema nervioso central de especies rumiantes; aunque el lugar exacto no está del todo claro, pero se sugiere que existe una interacción con el fotoperiodo y la secreción de melatonina (Chelikani *et al.*, 2003). Estudios realizados por Henry *et al.* (2001) en ovejas mostraron que la leptina era capaz de restaurar parcialmente la secreción de LH en animales sometidos a restricciones crónicas de alimento. Si bien se conoce su efecto sobre la pulsatilidad de la LH, su papel al final del anestro en la oveja no está aún del todo claro ni tampoco de qué manera actúa sobre la secreción de melatonina (Zieba *et al.*, 2007). Algo que concuerda en la literatura es que el rol de la leptina, desde un punto de vista reproductivo, es más permisivo que desencadenante (Blache *et al.*, 2007). Otra importante observación, es que en ovejas OVX, al ser sometidas a una restricción alimenticia durante casi un año, la frecuencia de pulsos de LH aumentó como respuesta a una elevación en el nivel de alimentación antes que se incrementaran las concentraciones de leptina (Szymanski *et al.*, 2007), sugiriendo que la leptina no está envuelta en la rápida respuesta de la GnRH frente a un súbito incremento en la disponibilidad de energía (Blache y Martin, 2009).

Otros estudios en ovinos han demostrado que el uso exógeno de leptina puede prevenir la supresión de los pulsos de LH como consecuencia de un ayuno de corta duración (Nagatani *et al.*, 2000). El ayuno ejerce un conocido efecto inhibitorio de la secreción de gonadotropinas y la ovulación, aunque paradójicamente la expresión de GnRH en el hipotálamo no se reduce durante el ayuno (Bergendahl *et al.*, 1992). Estas observaciones demuestran que el mantenimiento artificial de las concentraciones de leptina plasmática, en niveles iguales o superiores a las que se produce en animales bien alimentados, pueden evitar fallos en el aparato reproductor comúnmente observados en animales con signos de desnutrición. Por lo tanto, parecería que el eje reproductivo interpreta los altos niveles circulantes de leptina para indicar que el estado metabólico del animal es propicio para el éxito reproductivo.

En la figura 16 se muestran los cambios que ocurren en la hembra en diferentes estados nutricionales, y su conexión con la leptina y la insulina. En situaciones de desnutrición, la producción de leptina disminuye, se reduce la producción de GnRH y por lo tanto de la FSH y LH, deteniendo la actividad reproductiva. Del mismo modo,

cuando existe sobrepeso, el aumento de adipocitos provoca un aumento de los niveles de leptina e insulina y el aumento periférico de la LH. Como resultado se provoca un desarrollo parcial de los folículos que llegan a secretar testosterona de forma supranormal (Sharpe y Franks, 2002).

Figura 16. Esquema que muestra la regulación de la función ovárica por la nutrición, y el modo de acción de la leptina e insulina en situación de nutrición normal (a), desnutrición (b) y sobrepeso (c) (adaptado de Sharpe y Franks, 2002).



4.4. EFECTOS DE LA NUTRICIÓN A CORTO PLAZO

Estos efectos llamados a corto plazo se centran en las semanas o días que preceden a la cubrición; la mejora del nivel de alimentación durante estos días se conoce con el nombre de sobrealimentación o *flushing* y ha demostrado ser un método con efectos beneficiosos tanto sobre la fertilidad como sobre la tasa de ovulación (Robinson *et al.*, 2006). Además, si la sobrealimentación se mantiene un cierto tiempo tras la fecundación, también se obtienen mejoras en la prolificidad, a través de un descenso en la mortalidad embrionaria. La nutrición tiene un efecto profundo en la actividad ovárica y estados de subnutrición detienen los mecanismos que controlan la ovulación en el hipotálamo, afectando la secreción hipotalámica de GnRH, y la consecuente secreción hipofisiaria de LH, lo que provoca un mal funcionamiento de las gónadas.

En la cabra existen pocos estudios realizados y en general no se han encontrado diferencias respecto a que el uso del *flushing* pueda mejorar la tasa de ovulación u otros factores como peso vivo, condición corporal y número de crías nacidas durante la estación reproductiva de razas caprinas de carne (Acero-Camelo *et al.*, 2008). De Santiago-Miramontes *et al.* (2011), usando *flushing* en cabras en anestro y además exponiéndolas a hembras estrogenizadas, obtuvieron buenos resultados en cuanto a la prolificidad, mientras que el *flushing* por sí solo no tuvo mayor efecto. Sin embargo, en otro estudio realizado por Daghigh *et al.* (2011), el uso de *flushing*, combinado con inyecciones de GnRH y eCG, produjo un aumento en la fertilidad y la tasa de ovulación.

En cabras, a las que se les ha realizado un efecto macho, se ha demostrado que un *flushing* de 7 días, antes de la introducción de los machos, incrementa la respuesta ovulatoria (De Santiago-Miramontes *et al.*, 2008). El incremento en la tasa de ovulación, tras la introducción de los machos, se debió principalmente al efecto de la nutrición, que propició el crecimiento de un mayor número de folículos y disminución de la atresia folicular en aquellas hembras mejor alimentadas, resultado que ha sido observado igualmente en ovejas al inicio de sus ciclos sexuales (Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2002). Todo ello, permite que un buen número de folículos sobrevivan a la atresia y ovulen en el siguiente ciclo sexual, incrementando la tasa de ovulación (Viñoles *et al.*, 2005). Este efecto positivo sobre la tasa de ovulación, de la suplementación alimenticia, no se mantiene indefinidamente y sólo es válido para el primer ciclo en el que se va a realizar la cubrición. Esto es probablemente debido a que, en las hembras suplementadas, el efecto de la nutrición, al ser a corto plazo, no se mantiene en el tiempo porque se establece un *feedback* negativo que rápidamente restaura la homeostasis y la foliculogénesis ovárica al estadio inicial previo a la sobrealimentación (Viñoles *et al.*, 2005; Scaramuzzi *et al.*, 2006).

Estudios realizados en ovino han mostrado que una subnutrición, en las semanas previas a la cubrición, produce claros efectos negativos que incluyen el empeoramiento de la tasa de ovulación, el aumento de la mortalidad embrionaria y una peor fertilidad (Rhind *et al.*, 1989). De este modo, estos efectos negativos de la subnutrición pueden ser evitados mediante un incremento de la alimentación (*flushing*) durante los 10 días previos a la introducción de los machos, que permite lograr una mejora en la tasa de ovulación. Incluso se ha observado que puede llegar a ser de una duración inferior a 10 días (Robinson *et al.*, 2006). Así, Viñoles (2003) concluyen que el efecto beneficioso podría ser observado en un periodo más corto, entre el día 8 y día 4 antes de la

ovulación (que se corresponde con el día 10-14 del ciclo sexual). Esto se debe a que, este periodo, coincide con la emergencia de la oleada folicular. Esta determinación tan precisa ha podido ser obtenida mediante el uso de tratamientos artificiales de sincronización de celo, lo que permite manejar esta estrategia alimentaria mucho más fácilmente. Pero ya que los periodos de aparición del celo en las hembras son variables, por comodidad de manejo es preferible que la mejora de la alimentación sea 10 días antes del inicio de la cubrición (Robinson *et al.*, 2006). Este incremento en la alimentación hay que intentar mantenerlo tras la cubrición o al menos no disminuirlo de forma brusca, para evitar un efecto negativo sobre la supervivencia embrionaria, sobre todo en aquellas hembras con un menor estado de reservas (Girou *et al.*, 1971).

Un hecho a tener en cuenta sobre la aplicación del *flushing* es que su efectividad varía según el genotipo en el cual se use, de modo que en razas poco prolíficas se obtiene una mejor respuesta a la sobrealimentación, sobre todo en cuanto a la tasa de ovulación; así, los animales de mayor potencial ovulatorio parece que pueden ser capaces de producir crías de una forma más “consistente” en un ambiente nutricional variable antes de la fecundación, siempre dentro de unos límites razonables (Gunn, 1986). Lo que podría explicar la reducida o variable respuesta del *flushing* cuando es utilizado en la especie caprina.

Algunos trabajos han estudiado la influencia del peso vivo antes de realizar el *flushing* sobre la tasa de ovulación. Así, Rattray *et al.* (1980), en ovejas, realizaron un modelo de regresión logarítmica para calcular la probabilidad de presencia de ovulaciones múltiples en función del peso vivo de las ovejas. Estos autores obtuvieron lo siguiente: (1) si no existieran variaciones entre el peso inicial y el momento de la cubrición, los animales más pesados tendrán más probabilidad de ovular en forma múltiple, como reflejo de un efecto estático del peso; (2) el efecto del peso es dinámico, ya que la pérdida es perjudicial y la ganancia beneficiosa; y (3) los mejores resultados tras la sobrealimentación se obtienen cuando se parte de animales con un peso intermedio dentro de la raza, ni muy delgado ni muy engrasados; de modo que, las ovejas que se encuentran en rangos de peso inicial por debajo de la media también responden de forma muy positiva al *flushing*, pero no llegan a alcanzar nunca las probabilidades de las ovejas de mayor peso, debido a la influencia del efecto estático.

Por todo ello, y a nivel práctico, es importante tener en cuenta el efecto positivo de los cambios de peso moderados a lo largo de la vida productiva del animal, y que si presenta un peso demasiado bajo al inicio no podrá cumplir las expectativas que

queremos. Así, en la raza Rasa Aragonesa, se ha demostrado cómo un correcto peso vivo al momento del destete tiene una gran importancia para obtener una buena tasa de ovulación en los primeros celos tras el mismo (Abecia *et al.*, 1993a); teniendo una clara aplicación en sistemas reproductivos intensificados.

Finalmente, los efectos del *flushing* realizados al inicio de la estación reproductiva resultan bastante más efectivos en cuanto a la tasa de ovulación (Theriez, 1984). Esto se ha podido observar en ovejas Rasa Aragonesa destetadas a finales de abril y alimentadas con una dieta 1,5 veces sus necesidades de mantenimiento (Abecia *et al.*, 1993b), donde se encontró una mejora significativa de la tasa de ovulación a partir del tercer celo manifestado por las ovejas tras el destete, mientras que no hubo mejoría en el primer ciclo sexual.

Aún no están claros los mecanismos fisiológicos que se modifican en relación a lo efectos positivos que producen una sobrealimentación antes de la cubrición. Así, Haresign (1981), en ovejas sobrealimentadas durante un ciclo sexual, no observó diferencias en cuanto al número de folículos de diámetro inferior a 2 mm, pero sí en la población folicular de 2-3 mm de diámetro, de modo que las ovejas sobrealimentadas tuvieron una tasa superior de ovulación a diferencia de las testigo (2,6 vs. 1,8 cuerpos lúteos). Estos resultados nos indican que el *flushing* puede incrementar la tasa de ovulación, no actuando sobre el número de folículos potencialmente ovulatorios en el momento de la regresión luteal (efecto estático), sino a través de diferencias en la proporción de los mismos que van a ser inducidos a madurar y ovular, y disminuyendo la atresia de los folículos en las últimas etapas de su desarrollo (Zarazaga, 1994).

En otro trabajo realizado por Rhind y McNeilly (1998), ovejas sometidas a dos niveles de alimentación presentaron diferencias en cuanto al ratio estrógenos/progesterona, el cual resultó ser menor en ovejas subalimentadas, indicando una menor actividad aromatasa provocada por el estado de subnutrición.

En un estudio realizado por Abecia *et al.* (1995) en ovejas, y como consecuencia de un incremento en el nivel de alimentación, no se encontró diferencias en el diámetro medio de los tres folículos de mayor tamaño, ni en el porcentaje de folículos estrogénicos, ni tampoco en cuanto a la secreción *in vitro* de estradiol y testosterona; además, Rhind y McNeilly (1998) tampoco encontraron diferencias significativas en el número de receptores para la LH ni en las células de la granulosa ni en las de la teca. Todos estos estudios parecen indicar que el efecto del nivel de alimentación sobre la tasa de ovulación en la especie ovina se expresa a través de cambios en la composición

del líquido folicular, lo que a su vez puede ser una consecuencia de alteraciones en la secreción de gonadotropinas, hormonas metabólicas y factores de crecimiento (Zúñiga, 2002).

Otro factor importante a considerar en los tratamientos de alimentación a corto plazo es la **implicación del control hormonal**, la forma en que actúa y de qué manera se relaciona con los cambios de alimentación en diferentes momentos del año, y más importante durante el anestro estacionario, en donde el hipotálamo es más sensible frente al *feedback* negativo del estradiol. Es sabido que la aplicación de un plano alto de alimentación, en ovejas OVX+E₂ al inicio de la estación reproductiva (Rhind *et al.*, 1991), da como resultado un aumento en la frecuencia y amplitud de los pulsos de LH en la fase folicular del ciclo sexual, confirmando la afirmación de que adecuados niveles nutricionales provocan, de algún modo, una significativa reducción de la sensibilidad hipotalámica y de la actividad estrogénica debido al *feedback* negativo del estradiol (Adams *et al.*, 1994). En otros trabajos realizados con ovejas OVX+E₂ de la raza Rasa Aragonesa, después de un período de dos semanas de sobrealimentación, mostraron que, al inicio y al final de la época de anestro estacional, se modificaron las concentraciones plasmáticas de LH pero no hubo efecto en la frecuencia de pulsos de LH; posiblemente, debido al corto periodo de tiempo que los tratamientos nutricionales fueron administrados (Forcada *et al.*, 1997).

En cabras, Tanaka *et al.* (2002), demostraron que el ayuno provocaba una modificación en la frecuencia de pulsos de LH, siendo más marcado en las hembras con menor peso corporal que en las hembras que tenían un mayor peso, existiendo un nivel energético crítico que determina que un balance energético negativo afecta la secreción de LH. En trabajos realizados en cabras OVX+E₂, mantenidas en ayuno durante 4-5 días (Ichimaru *et al.*, 2001), se ha observado como respuesta una supresión gradual de la actividad del generador hipotalámico del pulsos de GnRH, así como una activación de regiones hipotalámicas que contenían neuronas del neuropéptido Y (NPY); reforzando las teorías que hablan del papel de este péptido como mediador entre la subnutrición y el generador hipotalámico de pulsos de GnRH.

En ovejas, la reducción de los niveles plasmáticos de progesterona, por una sobrealimentación, es debido al elevado metabolismo de los esteroides en el hígado, como el 17 β -estradiol que es convertido en 17 α -estradiol, siendo excretado por la orina y gran parte a través de las heces, por lo que en este estudio una restricción alimenticia

resultó estar asociada con bajos niveles de 17α -estradiol en las heces y altas en el plasma (Adams *et al.*, 1994).

4.5. MEDIADORES ENTRE LA NUTRICIÓN Y LA REPRODUCCIÓN

Es importante destacar que el último eslabón en la integración del estado nutricional es el **sistema nervioso central**, si bien, los mecanismos cerebrales involucrados en la interpretación del estatus metabólico y su relación con la actividad neuronal de la GnRH no están demasiado claros. El llamado “sensor metabólico” se piensa que está localizado en el ARC y en la eminencia media ya que los receptores de leptina e insulina se encuentran a este nivel (Blache *et al.*, 2002; Chilliard *et al.*, 2005). Algunos posibles vínculos, como las neuronas NPY, han sido identificados entre las células GnRH y las neuronas que contienen receptores de leptina, de la que ya se ha hablado previamente, e insulina.

La **kisspeptina** es otro de los neuropéptidos descubierto en los últimos años y que podría cumplir la función de “sensor metabólico”, integrando las señales periféricas y regulando la generación del pulsos de GnRH (Blache y Martin, 2009). Este neuropéptido, producto del gen Kiss1 y cuyos receptores han sido identificados en casi un 75% de las neuronas GnRH de las ratas, se piensa que es el que podría tener importancia sobre el control metabólico de las neuronas GnRH y la liberación de LH (Irwig *et al.*, 2004; Messenger *et al.*, 2005). Se ha estudiado ampliamente su función durante la pubertad en roedores y su relación con el estado metabólico, siendo su lugar de acción el núcleo ARC y el área antero- y periventricular (AVPV) del hipotálamo (Smith *et al.*, 2005) y en la especie ovina a nivel del POA (Estrada *et al.*, 2006). Estas kisspeptinas del núcleo ARC controlan los *feedback* positivos y negativos de los estrógenos (Smith *et al.*, 2008). El *feedback* positivo provoca un aumento de la LH preovulatoria y activa las kisspeptinas del núcleo ARC (Estrada *et al.*, 2006). Durante el anestro se produce el efecto contrario, reduciendo la expresión de estas kisspeptinas en el núcleo ARC. Estas kisspeptinas también se ha observado que varían en función del fotoperiodo al que son sometidos los animales. Así, en ovejas intactas sometidas a fotoperiodos de días cortos (8L:16O), las kisspeptinas fueron tres veces mayores que en aquellas ovejas sometidas a un fotoperiodo de días largos (16L:8O) (Wagner *et al.*, 2008).

Las kisspeptinas pueden actuar también en la integración de las señales periféricas del estatus metabólico para el control de la función reproductiva. Durante el anestro estacionario, estudios realizados han mostrado que el *feedback* negativo del estradiol es mediado por la kisspeptina y el sistema dopaminérgico. La expresión del RNAm del gen *Kiss1* se eleva al inicio de la estación reproductiva, y se mantiene principalmente activo a nivel del núcleo ARC en plena estación reproductiva, notándose más esta diferencia en ovejas enteras que en aquellas OVX+E₂ (Smith *et al.*, 2008; Smith y Clarke, 2010).

En cuanto a la relación de la **melatonina** con el nivel nutricional, un estudio preliminar (Menassol *et al.*, resultados no publicados) ha mostrado que una restricción alimenticia, además de modificar, como ya se ha indicado, la estacionalidad reproductiva, provoca unas concentraciones más bajas de melatonina. Recientemente, también estos mismos autores, especulan que la activación central de la cinasa activada por monofosfato de adenina (*AMP-activated protein kinase*, AMPK), que es un integrador del nivel energético a nivel celular y corporal, podría estar involucrada en la integración de los factores metabólicos que pudieran alterar el ritmo de secreción de melatonina (Menassol *et al.*, 2011). Además, también en ovino se ha puesto en evidencia una cierta interacción entre el tratamiento con melatonina y el plano nutricional/nivel de reservas sobre la tasa de ovulación, en el sentido de que las ovejas menos engrasadas o con menor peso, o sometidas a bajos niveles nutricionales, parecen tener una superior respuesta a los implantes de melatonina en cuanto a la tasa de ovulación/prolificidad que en aquellas con niveles adecuados de alimentación; así, incrementos en los niveles de alimentación pueden ayudar a elevar la secreción de LH en ovejas tratadas con melatonina al inicio del periodo de anestro (Forcada *et al.*, 2002). En estudios realizados en ovejas Salz (50% Romanov y 50% Rasa Aragonesa), paridas en marzo y sometidas a dos niveles de alimentación tras el destete (1,8 vs. 1,3 veces las necesidades de mantenimiento) e implantadas o no con melatonina a los 32 días tras el parto, Forcada *et al.* (1995) demostraron un efecto positivo y significativo de la melatonina sobre la tasa de ovulación en el segundo celo detectado tras el destete ($P < 0,05$), así como una interacción significativa plano de alimentación x tratamiento con melatonina sobre la tasa de ovulación ($P < 0,05$) en el mismo celo. De este modo, los implantes de melatonina fueron más efectivos en las ovejas sometidas a un inferior nivel alimenticio tras el destete.

Del mismo modo, Rondón *et al.* (1996) pusieron en evidencia que el efecto positivo de la melatonina sobre la tasa de ovulación a corto plazo parece ser más notorio en ovejas con una condición corporal moderadamente baja (en torno a 2,5) en relación a hembras con superior niveles de reservas corporales. Similares resultados obtuvieron Folch y Alabart (1999) en ovejas Rasa Aragonesa implantadas con melatonina. Las hembras tratadas tuvieron una prolificidad superior frente a las hembras testigo, pero además, en las primeras, aquellas que parieron dos corderos tuvieron un peso vivo significativamente inferior a las que tuvieron un parto simple. Los resultados obtenidos por Abecia *et al.* (1999) resultan ser bastante interesantes, ya que mostraron que la melatonina es capaz de reducir *in vitro* la secreción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ por parte del tejido endometrial el día 15 tras la cubrición, momento crítico a la hora de determinar la supervivencia embrionaria, pero sólo se observó en las ovejas subnutridas y no en las sobrealimentadas. Este hecho parece confirmar lo señalado con anterioridad y, además, puede aportar nuevas vías en la investigación de los mecanismos por los que la melatonina mejora los parámetros reproductivos.

Es también importante tener en cuenta la posibilidad de que determinados **neurotransmisores** ejerzan cierto papel como mediadores de los efectos de la alimentación sobre el eje hipotálamo-hipofisiario, si bien no existen trabajos realizados en la especie caprina. Así, en estudios realizados con ovejas Rasa Aragonesa, los opioideos endógenos participaron en la supresión de la liberación de LH durante el anestro, pero la alimentación no parece ser capaz de modular dichos efectos. En cambio, la inhibición que el sistema dopaminérgico ejerce sobre la LH al inicio del anestro sí parece ser modificada por la alimentación, de modo que la subnutrición incrementa dicha inhibición, sobre todo al comienzo del anestro; demostrando una menor sensibilidad hipotalámica al *feedback* negativo del estradiol en el grupo de ovejas sobrealimentadas (Forcada *et al.*, 1997). En otro trabajo, Forcada *et al.* (2002) sostienen que un tratamiento con implantes de melatonina en ovejas con bajas reservas de grasa puede modificar el grado de acción de los sistemas dopaminérgico y noradrenérgico en la regulación de la secreción de LH.

Las **hormonas tiroideas** juegan un importante papel en la estacionalidad de reproducción de diferentes especies, incluyendo las aves, roedores y los mamíferos, y resultan ser buenos indicadores del estatus metabólico, además de ser importantes durante las fases de transición en época reproductiva y de anestro (Todini *et al.*, 2007).

De forma general, hay muy pocas evidencias de la importancia de las hormonas tiroideas y su vínculo entre el balance energético y la reproducción en animales adultos. En cabras, las hormonas tiroideas parecen ser un buen indicador del estado metabólico del animal (Todini *et al.*, 2007). Sin embargo, en un estudio realizado en carneros adultos, se ha observado que las concentraciones de las hormonas tiroideas en el plasma y líquido cefalorraquídeo no fueron modificadas al recibir una suplementación nutricional que permitiera incrementar la frecuencia de pulsos de LH, sugiriendo que posiblemente no jueguen un papel importante en la rápida respuesta de las neuronas GnRH (Miller *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2004; 2005).

En esta revisión se ha visto la amplia documentación existente en relación a los distintos componentes, tanto en la cabra como en la oveja, que actúan a distintos niveles del eje neuroendocrino, controlando la ingesta de comida, la homeostasis energética, el metabolismo y la fertilidad; y que en conjunto actúan como integradores, estableciendo una estrecha conexión entre el balance energético y la función reproductora. De todos modos, la escasez de trabajos en la especie caprina invita a realizar más estudios con el fin de poder encontrar cuales son los factores por los cuales el nivel nutricional afecta a la reproducción en esta especie.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El **objetivo general** del presente trabajo fue determinar en cabras Mediterráneas si el fotoperiodo es capaz de controlar la secreción de LH y cuáles son los mecanismos neuronales involucrados en su regulación durante el ciclo fotoperiódico y después de la colocación de melatonina exógena, estudiando en todos los casos el posible efecto modulador del nivel de alimentación.

Partiendo de este punto, podemos desglosar los siguientes objetivos parciales:

1. Estudiar el control de la secreción de LH por el fotoperiodo y su modulación por el nivel de alimentación.
2. Determinar la implicación, en función del nivel de alimentación, de diferentes sistemas neuroendocrinos que pudieran estar involucrados en la regulación de la secreción de LH (opioideos endógenos, sistema dopaminérgico y serotoninérgico) en distintos momentos del ciclo fotoperiódico: durante la estimulación de la secreción de LH por los días cortos, durante el inicio de la inhibición de la secreción de LH por los días largos y durante la inhibición de la secreción de LH durante los días largos.
3. Examinar la implicación de diferentes sistemas neuroendocrinos (opioideos endógenos, sistema dopaminérgico, sistema serotoninérgico y aminoácidos excitatorios) que pudieran estar involucrados en la estimulación de la secreción de LH por la melatonina exógena, en función del nivel de alimentación.
4. Finalmente, determinar si las concentraciones de melatonina están relacionadas con las fechas de inicio y final del periodo de actividad reproductiva, y si existen diferencias en dichas concentraciones plasmáticas de melatonina entre ambas venas yugulares, en diferentes momentos del año (solsticio de verano e invierno y equinoccio de primavera y otoño).

ARTÍCULOS PUBLICADOS

ARTÍCULOS PUBLICADOS

Artículo 1. Se corresponde con el objetivo 1.

La respuesta de la secreción de LH al fotoperiodo es modificada por el nivel de nutrición en hembras caprinas Mediterráneas

The response of luteinizing hormone secretion to photoperiod is modified by the level of nutrition in Mediterranean female goats

Luis Ángel Zarazaga, Irma Celi, José Luis Guzmán, Benoît Malpaux

Animal Reproduction Science (2011) 126: 83-90.



Contents lists available at ScienceDirect

Animal Reproduction Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/anireprosci

The response of luteinizing hormone secretion to photoperiod is modified by the level of nutrition in female Mediterranean goats

L.A. Zarazaga^{a,*}, I. Celi^a, J.L. Guzmán^a, B. Malpoux^b^a Departamento de Ciencias Agroforestales, Universidad de Huelva, Carretera de Palos de la Frontera s/n, 21819 Palos de la Frontera, Huelva, Spain^b Physiologie de la Reproduction et des Comportements, UMR 6175 INRA-CNRS-Université de Tours-Haras Nationaux, Centre INRA de Tours, IFR 135, 37380 Nouzilly, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 November 2010
 Received in revised form 13 April 2011
 Accepted 26 April 2011
 Available online 5 May 2011

Keywords:

Goat
 Seasonality
 Photoperiod
 Nutrition
 LH
 Melatonin

ABSTRACT

This paper reports the influence of nutrition on the photoperiodic control of luteinizing hormone (LH) secretion in female Mediterranean goats (i.e., goats from the Mediterranean area in general). Ovariectomized, oestradiol-treated goats were subjected to two consecutive intervals of 3 months of long days followed by 3 months of short days (group LDSD, $N=20$), or *vice versa* (group SDLD, $N=20$). The LDSD and SDLD does were also randomly assigned to one of two nutrition groups that received either 1.1 (H group, $N=10$) or 0.7 (L group, $N=10$) times their maintenance requirements. Live weight and body condition score were determined weekly and LH concentrations twice per week. To establish the pulsatility of secretion of LH, three periods of intensive sampling were undertaken. Melatonin was determined after a period of 45 short or long days. All photoperiod/nutrition groups showed large variations in LH concentrations according to photoperiod, with nutrition having a significant effect ($P < 0.001$). The mean time between the shift from long to short days and the stimulation of LH secretion, and between the shift from short to long days and the inhibition of LH secretion, was different in each nutrition group (at least $P < 0.05$). No differences were seen in the frequency of LH pulses between the nutrition groups, but differences between sampling periods were observed ($P < 0.001$). Melatonin secretion was not affected by food supply. These results confirm: (1) that Mediterranean female goats are sensitive to photoperiod, (2) that this environmental cue may control the timing of pituitary activity under natural conditions, and (3) suggest that nutrition plays an important role in the effect of photoperiod on LH secretion.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Most breeds of goat from subtropical and temperate latitudes experience seasonal variation in their reproductive activity. In wild Spanish Ibex (Santiago-Moreno et al., 2000, 2003, 2006) and domesticated Mediterranean goats (i.e., goats from the Mediterranean area in general) (Gómez-Brunet et al., 2003, 2010; Zarazaga et al., 2005) maintained under the natural photoperiod, it has

been shown that the onset of breeding activity occurs in the late summer or autumn when day length is decreasing, while the breeding season stops in the late winter or beginning of spring with increasing day length. It is well established that, under experimental conditions, artificial long days inhibit, and artificial short days stimulate, the pituitary and reproductive activity of caprine species (Bissonnette, 1941; Chemineau et al., 1992b; Delgadillo et al., 2004; Zarazaga et al., 2011). Photoperiod, through its influence on pituitary responsiveness to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and the pattern of luteinizing hormone (LH) secretion (Lincoln and Short, 1980) is the principal cue governing reproductive activity. However,

* Corresponding author. Tel.: +34 959 21 7523; fax: +34 959 21 7304.
 E-mail address: zarazaga@uhu.es (L.A. Zarazaga).

other environmental stimuli, such as food availability and social interactions (Walkden-Brown et al., 1993; Mani et al., 1996) should not be disregarded as potential regulators of reproductive seasonality.

Nutrition is an important factor affecting reproductive function in domestic ruminants. Nutritional status influences the activity of the reproductive neuroendocrine axis via systemic nutritional feedback on GnRH neurons in the hypothalamus (l'Anson et al., 1991). These changes are manifested in the pulsatile secretion of LH from the pituitary gland, which can be readily measured in the circulation as a marker of GnRH (Clarke and Cummins, 1982). Nutritional deprivation, whether the result of an insufficient supply of energy in the diet or excessive energy demands, inhibits the release of hypothalamic GnRH, leading to the reduced secretion of pituitary LH and eventually to anovulation and anoestrus in both ewes (Tchamitchian et al., 1973; Restall and Starr, 1977; Tatman et al., 1990) and goat does (Zarazaga et al., 2011). Kouakou et al. (2008), working with dairy bucks, observed that neither sub-maintenance feeding nor the transition from this regime to *ad libitum* feeding affected LH concentrations. Similarly, Meza-Herrera et al. (2008) observed an increase in ovarian activity in goats in better body condition when supplemented with protein, although no changes in LH secretion were seen.

Most studies on the effects on reproduction of the interaction between photoperiod and nutrition have been performed in sheep (for a review see: Rhind, 1992; Forcada and Abecia, 2006). In Criollo goats maintained under the natural photoperiod, Urrutia-Morales et al. (2009) report high levels of nutrition to overcome the inhibitory effect of photoperiod for most of the non-reproductive season, and to increase reproductive activity during this period. However, to our knowledge, no studies have investigated the effects of nutrition and artificially controlled photoperiod on pituitary activity in Mediterranean goats. The working hypothesis of the present work was that the photoperiod is the main environmental factor controlling pituitary activity in female Mediterranean goats, but that its effect might be modulated by the level of nutrition. Daily melatonin patterns were also monitored to examine whether nutritional effects on pineal function might explain the responses seen.

2. Materials and methods

2.1. Preparation of experimental animals

All handling and experimental procedures were carried out in strict accordance with Spanish guidelines for the protection of experimental animals (RD 1201/2005), and by trained personnel, conforming to European Union Directive 86/609 regarding the protection of animals used in scientific experiments.

The present study was conducted at the University of Huelva experimental farm (latitude 37° 15'). Forty adult Mediterranean female goats (3–4 years old; 49.4 ± 1.6 kg; 2.41 ± 0.4 body condition score) were ovariectomized one month before the start of the experiment. On 7th June 2007 they all received a 3-cm long (i.d. = 3.3 mm; o.d. = 4.6 mm) subcutaneous silastic implant (Karsch et al., 1973) contain-

ing crystalline oestradiol (Sigma Chemical Co., St. Louis). All implants were soaked in physiological serum before insertion in order to prevent an initial peak of steroid release.

2.2. Photoperiod and nutritional treatments

On 15th June (end spring-onset summer) the goats were randomly assigned to one of two lightproof sheds and exposed to four alternations of either 3 months of long days (16 h of light/d; lights-on 07:00 h, lights-off 23:00 h) followed by 3 months of short days (8 h of light/d; lights-on 07:00 h, lights-off 15:00 h) (group LDSD, *N* = 20) or *vice versa* (group SDDL, *N* = 20).

The does of each group were then randomly assigned to one of two experimental nutrition groups. Members of the high nutrition group (H group: *N* = 10) were fed 700 g of concentrate and 500 g of barley straw per day, while members of the low-nutrition group (L group: *N* = 10) were fed 350 g of concentrate and 500 g of barley straw per day. These amounts correspond to a daily intake of 0.78 milk fodder units (UFL) and 100 g of digestible protein (H group), and 0.49 UFL and 50 g of digestible protein (L group) respectively. These quantities provide 1.1 and 0.7 times the energy maintenance requirements (MR) of a doe with a live weight (LW) of 50 kg, according to INRA standards (Morand-Fehr and Sauvant, 1988). All groups were balanced in terms of animal LW and body condition score (BCS) (Hervieu et al., 1991). Concentrate was distributed individually to the does once per day, whereas barley straw was provided communally to each group. The concentrate was a commercial mixture of maize (26.3%), beans (20.0%), oats (14.1%), cotton-seed (13.7%), peas (13.4%), lupin (7.3%), barley (0.2%), wheat (0.2%), sunflower seeds (0.2%) and a commercial mineral-vitamin complement (4.6%). All animals had free access to water and mineral blocks containing trace elements and vitamins.

2.3. Sampling and measurements

Blood samples were obtained twice weekly for the entire observation period; all samples were collected in vacuum tubes containing heparin following jugular venipuncture. Plasma was recovered by centrifuging these samples at 3000 × *g* for 30 min, and then stored at –20 °C until analysis for LH. The pulsatility of LH secretion was studied in five females of each experimental group: (1) at the onset of the inhibition of LH secretion by long days (after 27 d of long days), (2) during the inhibition of LH secretion by long days (after 86 d of long days), and (3) at the onset of stimulation of LH secretion by short days (after 55 d of short days) (Zarazaga et al., 2011). Blood samples for this part of the work were collected via jugular catheters at 10 min intervals over a period of 6 h (between 09:00 h and 15:00 h on each of the cited days). The time of onset and cessation of LH secretion were determined according to the criteria described below. The collected samples were then treated as above. The LW and BCS of all animals were recorded weekly.

The nocturnal and diurnal plasma melatonin concentrations of the does were assessed on day 45 in both the LDSD (under long days) and SDDL (under short days) groups

following the transition from the second to the third photoperiod interval (29th January 2008). Blood samples at the onset and at the end of the night cycle were taken at hourly intervals, starting and finishing 2 h before and after 'lights off' or 'lights on' respectively. Over the remaining nocturnal period, blood samples were taken by two operators at intervals of 2 h via jugular catheters in both jugular veins (thus ensuring simultaneous sampling from both veins) (Zarazaga et al., 2010a,b). The does were always sampled in the same order at each sampling time and under dim-red light (less than 1 lux at 20 cm), avoiding any direct illumination of the eyes. After collection, blood samples were treated as above.

2.4. Definitions of pituitary activity

Pituitary activity was determined by assessing the characteristics of the LH profile. The baseline level was defined as the average of the 19 samples with the lowest values for each animal between day 52 after the onset of long days until 24 days after the onset of short days. Elevated LH concentrations were defined as differing from this baseline when they did so by more than 3 standard deviations (Zarazaga et al., 2011). The onset and the end of pituitary activity were defined as the dates of the first and last samples in a sequence of three or more with LH concentrations above or below the baseline respectively.

2.5. Hormone assays

Plasma LH concentrations were determined using double antibody ELISA (Faure et al., 2005). The sensitivity of the assay was 0.1 ng/mL. The intra- and interassay coefficients of variation of the control were 4.0% and 2.1% respectively.

Plasma melatonin concentrations were measured by radioimmunoassay in duplicate aliquots of 100 μ L blood plasma (Fraser et al., 1983), using the antibody first raised by Tillet et al. (1986). The sensitivity of the assay was 4 pg/mL. The intra- and interassay coefficients of variation were 18.8% and 14.2% respectively.

All hormonal analyses were performed at the hormonal analysis laboratory of the INRA (Nouzilly, France).

2.6. LH pulse identification

Luteinizing hormone pulses were defined according to Baird et al. (1981) as points with two consecutive values (pulse amplitudes) higher than the two preceding ones, with the highest value exceeding the mean value by at least four times the coefficient of variation.

2.7. Data analysis

The data obtained during the first three months of the study (15th June to 15th September) were excluded from the statistical analysis since this time was deemed the necessary period of adaptation to the sheds and treatments; nonetheless, these data are shown in the figures to confirm that adaptation occurred (Duarte et al., 2010). Changes in LW, BCS and LH concentrations were analysed using two-way ANOVA (nutritional treatments: groups H or L

and photoperiod group: SDLD or LDSD) with time as a repeated measure. The overall mean LH concentrations for the short and long day photoperiods were analysed in the same way. The effect of nutrition was analysed using the Tukey *t*-test. The effect of nutrition on mean LH plasma concentration at each intensive sampling period was examined using ANOVA, with time as a repeated measure. The LH pulse frequency was examined using Kruskal–Wallis ANOVA.

Plasma melatonin concentrations were first analysed by repeated measures ANOVA to assess possible interactions between "jugular side" and "time of collection" in each photoperiod group. Since no such interaction was observed, the data were further analysed by ANOVA (with "jugular side", "photoperiod groups", "nutrition" or "animal" as factors).

3. Results

3.1. Live weight and body condition score

Live weight and BCS varied greatly over time ($P < 0.001$), with photoperiod group and nutrition having a significant effect on both variables ($P < 0.001$). The interaction *photoperiod group* \times *time* had a significant effect on LW ($P < 0.05$) (Fig. 1), as did the interaction *nutrition* \times *photoperiod group* (51.8 ± 0.5 kg, 54.9 ± 0.4 kg, 48.7 ± 0.5 kg and 48.8 ± 0.5 kg for LDSD-H group, SDLD-H group, LDSD-L group and SDLD-L group respectively; $P < 0.01$). A clear effect of the photoperiod was observed ($P < 0.001$), with an increase in LW during the long day photoperiod (28.0 ± 5.8 g/d) and a slight reduction in LW during the short day photoperiod (-0.7 ± 5.2 g/d). Moreover, the interaction *nutrition* \times *time* had a significant ($P < 0.01$) effect on LW, with differences in LW gain/loss between nutrition groups in the second and fourth photoperiod intervals. For example, during the second interval, the H group clearly experienced an increase in LW (21.1 ± 10.6 g/d) while the L group experienced a reduction (-25.0 ± 10.4 g/d) ($P < 0.05$), and during the fourth interval the H experienced a clear increase in LW (37.5 ± 20.4 g/d) while the L group members experienced no change in this variable (-2.8 ± 12.0 g/d) ($P < 0.05$).

Only the interaction *photoperiod group* \times *time* was found to have a significant effect on BCS ($P < 0.001$) (Fig. 1).

3.2. Patterns of LH concentration

The LH concentration varied significantly over time in all animal groups ($P < 0.001$) (Fig. 2). Nutrition had a significant ($P < 0.001$) effect, with higher LH concentrations seen in the H group (0.60 ± 0.01 ng/mL) than in the L group (0.41 ± 0.01 ng/mL). Higher LH concentrations were observed during the short day photoperiod (0.58 ± 0.01 ng/mL) than during the long day photoperiod (0.44 ± 0.01 ng/mL) ($P < 0.001$). Moreover, differences between nutrition groups were observed during the short day photoperiod (0.68 ± 0.02 vs. 0.47 ± 0.02 ng/mL for the H and L groups respectively; $P < 0.001$) and long day photoperiod (0.51 ± 0.02 vs. 0.36 ± 0.01 ng/mL for the H and L groups respectively; $P < 0.001$).

A clear effect of nutrition was observed in terms of the mean interval between the shift from long to short

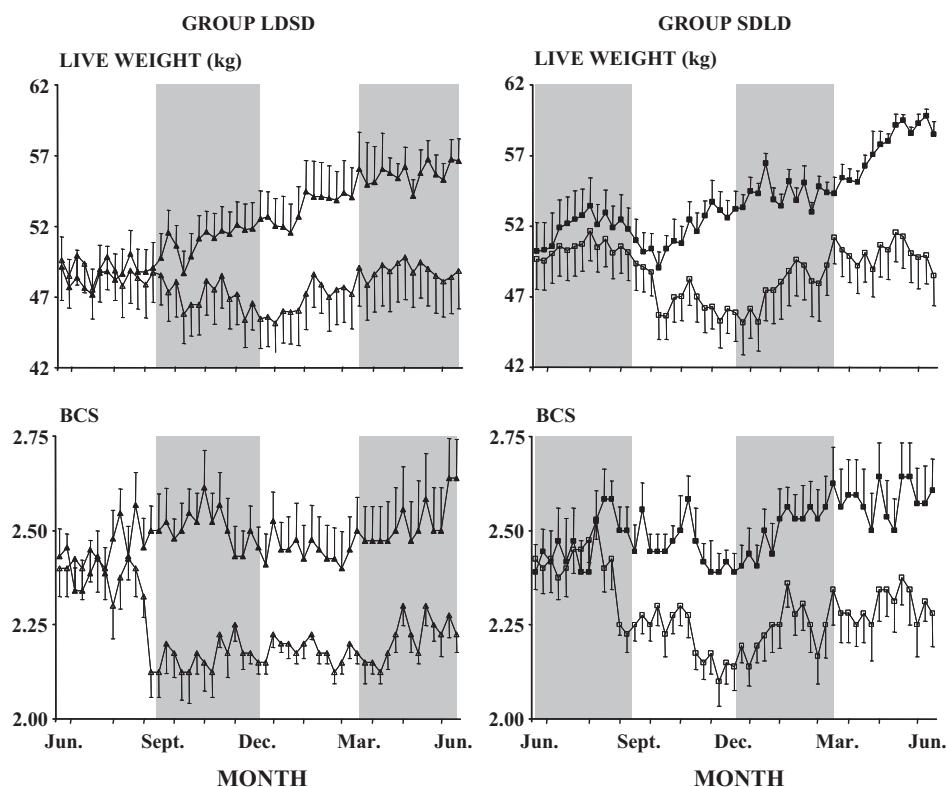


Fig. 1. Changes (mean \pm SEM) in live weight (kg) and body condition score (BCS) in female Mediterranean goats subjected to alternations of three months of long days and three months of short days (LDSD group), beginning with long days (LDSD group) or with short days (SDLD group), and which received 1.1 (H group, filled symbols) or 0.7 (L group, open symbols) times their maintenance requirements respectively. Shaded areas indicate the months when animals were exposed to short days.

days (45.7 ± 3.1 d vs. 65.8 ± 2.1 d for the H and L group respectively; $P < 0.001$), and the shift from short to long days (29.6 ± 1.9 d vs. 22.2 ± 1.7 d for the H and L group respectively; $P < 0.05$), and the stimulation/inhibition of LH secretion. Thus, a longer duration of the elevation of LH secretion was seen in the H group than in the L group (81.2 ± 5.2 d vs. 50.1 ± 3.5 d for the H and L group respectively; $P < 0.001$).

3.3. LH secretion: concentrations and pulsatility

Differences were observed in mean LH concentrations between the intensive sampling periods ($P < 0.001$) (Fig. 3). The lowest mean LH concentration appeared during the time of inhibition of LH secretion by long days (0.17 ± 0.00 ng/mL). The highest mean value was recorded during the time of the onset of stimulation of LH secretion by short days (0.84 ± 0.02 ng/mL). The frequency of LH pulses did not differ between nutrition groups in each sampling period. However, differences were seen between sampling periods, with higher pulse frequencies at the beginning of the stimulation of LH secretion by short days (0.52 ± 0.07 pulses/h), and lower pulse frequencies during the time of inhibition of LH secretion by long days (0.01 ± 0.01 pulses/h) ($P < 0.001$). The amplitude of these pulses did not differ between nutrition groups or sampling periods.

3.4. Melatonin concentration patterns

Diurnal melatonin concentrations (4.7 ± 0.3 pg/mL) were lower than nocturnal melatonin concentrations (38.4 ± 1.6 pg/mL) ($P < 0.001$) with large variations between animals ($P < 0.001$) (Fig. 4), showing that does correctly perceived the photoperiod. Differences were recorded between photoperiod groups (34.9 ± 1.7 pg/mL vs. 45.8 ± 3.6 pg/mL for SDLD and LDSD respectively) ($P < 0.01$), but no significant differences appeared between the nutrition treatments or between jugular veins. The interaction *jugular side* \times *animal* had a significant effect on melatonin concentration ($P < 0.001$).

4. Discussion

A pattern of body weight change related to pituitary activity was observed irrespective of the level of nutrition, as earlier reported (Zarazaga et al., 2005). The LW increased during long days and fell during short days. Barenton et al. (1988) suggest photoperiod to have a direct effect on LW. However, this might be mediated by leptin rather than there being a direct effect of photoperiod *per se* (Marie et al., 2001). Urrutia-Morales et al. (2009) report an increase in LW during anoestrous (long days) in does receiving six and 1.74 times the recommended intake (RI) of crude protein (CP) and metabolizable energy (ME) respectively and a slight reduction in those receiving 1.5 times RI for CP and 1.25 times the RI for ME respectively. This suggests that the

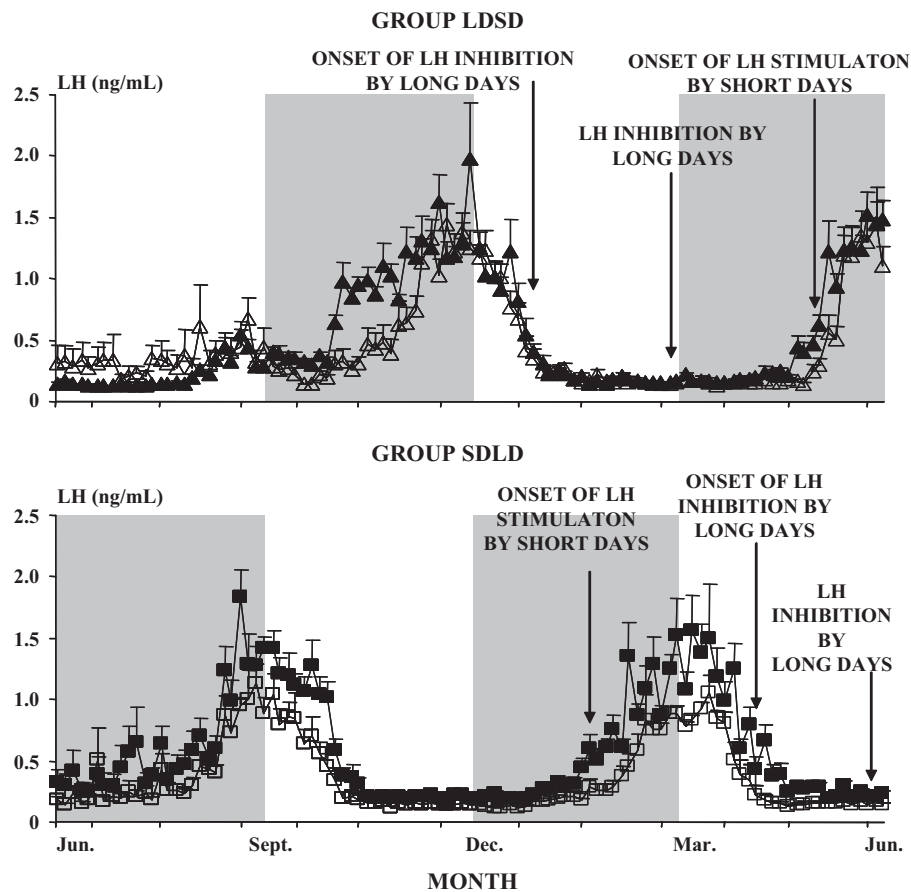


Fig. 2. Changes (mean \pm SEM) in LH concentration (ng/mL) in female Mediterranean goats subjected to alternations of three months of long days and three months of short days, beginning with long days (LDSD group), or with short days (SDDL group), and which received 1.1 (H group, filled symbols) or 0.7 (L group, open symbols) times their maintenance requirements respectively. Shaded areas indicate the months when animals were exposed to short days. The arrows indicate the moments when intensive sampling periods were performed.

amount of CP is responsible for the variations in LW with photoperiod. These finding, however, should not exclude other sources of variation in LW, such as a reduction in food intake (Marie et al., 2001; Argo et al., 1999).

As reported earlier (Zarazaga et al., 2005), the photoperiod-induced changes in LH pulse frequency and concentration suggest that photoperiod controls pituitary activity in Mediterranean female goats. The same has been indicated for does living at subtropical (Duarte et al., 2010), temperate (Chemineau et al., 1992a) and Mediterranean latitudes in domestic (Gómez-Brunet et al., 2003, 2010; Zarazaga et al., 2005) and wild goats (Santiago-Moreno et al., 2000, 2003, 2006). In the present study, the stimulation of LH secretion after the shift from long to short days took less time than reported for Saanen dairy goats (70 d) (Chemineau et al., 1986), probably due to breed differences and/or lactation influences.

There are very few reports that describe the effect of undernutrition on gonadotrophins in goats. Mani et al. (1996) studied the effect of undernutrition on LH concentrations during the oestrous cycle, and reported that rations that provided 25% of maintenance requirements had no significant effect on basal LH and follicle stimulating hormone profiles. Similarly, Meza-Herrera et al. (2008) observed that neither BCs nor the non-degradable protein intake affected the features of LH activity during the peri-

ovulatory period. The reason for this discrepancy with the present results could be that these authors studied the LH concentrations during the periovulatory period. Kouakou et al. (2008), working with dairy bucks, observed that neither sub-maintenance feeding nor the transition from this regime to *ad libitum* feeding affected LH concentrations. However, other authors have reported undernutrition to impair reproductive activity by exerting effects at the level of the hypothalamus. Walkden-Brown et al. (1994) report that, in bucks, low-quality diets reduce LH concentrations.

Under the present experimental conditions, the differences seen in LH concentration between the nutrition groups show that nutrition modulates the effect of photoperiod on LH secretion, and that the reproductive response can be modified by lower LH concentrations probably through enhanced hypophyseal-hypothalamic sensitivity to oestradiol. In ovariectomized, oestradiol-treated ewes, both hypothalamic and pituitary activity were found to be much lower in those with poorer body condition. In contrast, (Rhind et al., 1991) observed that differences in intake only resulted in changes in hypothalamic activity. Similar observations have been made in ovariectomized oestradiol-infused ewes on restricted diets fed nothing on the day of analysis (Renquist et al., 2008). This indicates that low food intake is related to enhanced hypothalamic sensitivity to oestradiol in ovariectomized,

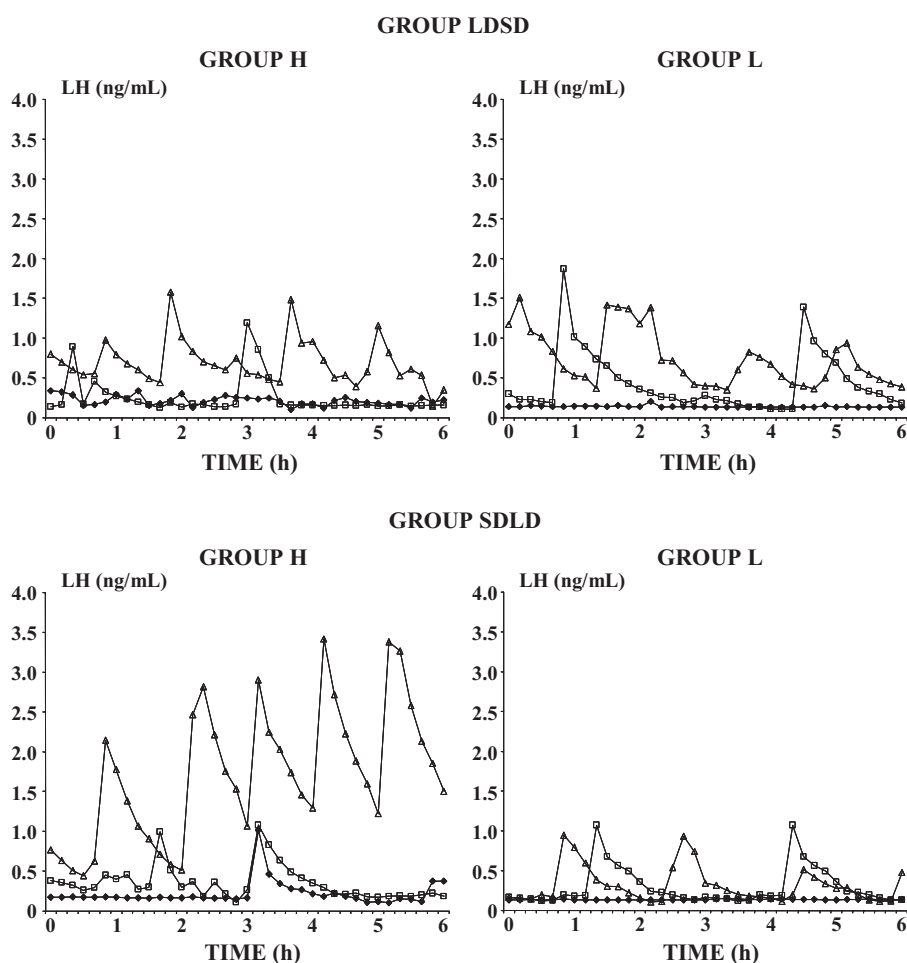


Fig. 3. Plasma LH concentrations (ng/mL) in a representative ovariectomized, oestradiol-treated female Mediterranean goat of each experimental group at the onset of the stimulation of LH secretion by short days (after 55 d of short days Δ), the onset of the inhibition of LH secretion by long days (after 27 d of long days \square), and during the inhibition of LH secretion by long days (after 86 d of long days \blacklozenge). Shaded areas indicate the months when animals were exposed to short days.

oestradiol-treated does. The effects of steroids on LH secretion are mediated through endorphins and enkephalin, opioid peptides, and through neurotransmitters such as dopamine, adrenaline and serotonin (Haynes et al., 1989), but the importance of these different mechanisms may differ with season and other factors (Rhind, 1992).

In the present work, differences between the nutrition groups were observed at the beginning and at the end of pituitary activity, with a shorter period of pituitary activity observed in the L group. This agrees with previous findings reported by our group (Zarazaga et al., 2005) working with goats at the same latitude subjected to two levels of nutrition (1.5 and 1 time the maintenance requirements). Similarly, De Santiago-Miramontes et al. (2009) reported that female goats with a poorer BCS showed an earlier onset of the anovulatory period and a delayed onset of ovulatory activity. However, in ewes at higher latitudes, the start of the breeding season appears to be less variable than its end, probably due to the synchronisation of the first ovulations among females (Zarazaga et al., 2003). Several authors have reported that the effect of nutrition on reproductive variables is greater in ewes at the beginning than at the end of seasonal anoestrus, and that an increased level of fat reserves is related

to a delay in the onset of the non-reproductive period rather than an advance in the onset of the breeding season (Forcada et al., 1992). As suggested by the results of the present study, the activity of the hypothalamic-pituitary axis might begin later in animals that have fed less. These differences between sheep and goats could be mediated by differences in the role of the different neural mechanisms that regulate LH secretion, for instance the role of the endogenous opioids, dopaminergic or serotonergic systems (Zarazaga et al., 2011). This suggests that the transition period between seasonal anoestrus and the breeding season might be a suitable time to increase nutrition above the maintenance requirements to obtain a significant effect on goats that have suffered reduced levels of nutrition, as occurs in some extensive or semiextensive farm systems under Mediterranean conditions. Urrutia-Morales et al. (2009) suggest that increased nutrition during the anoestrous season may be used to maintain the cyclicity of goats and be employed as a green, clean and ethical reproductive tool at subtropical latitudes.

The melatonin concentrations recorded confirm previous results obtained in sheep indicating that nutrition has no effect on the melatonin pattern (Martin et al.,

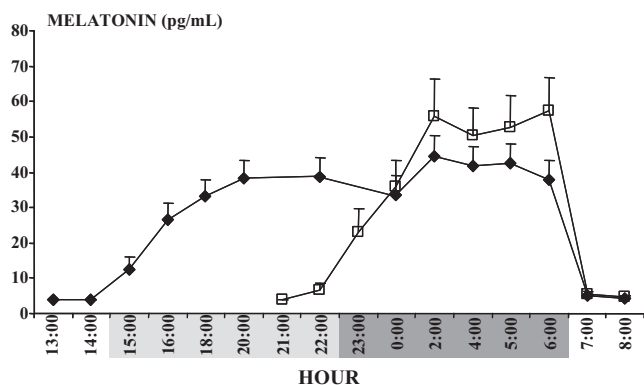


Fig. 4. Changes (mean \pm SEM) in melatonin concentration (pg/mL) as the mean of both jugular vein concentrations 45 d after the shift from short days to long days (open symbols, LDSD group), and from long days to short days (filled symbols, SDLD group). Shaded areas represent periods of darkness.

2002), even on critical aspects such as the timing of the start and end of the night-time rise in this hormone (Guerin et al., 2000). However, it has been shown that leptin treatment reduces and increase melatonin concentrations during long days and short days respectively (Zieba et al., 2007). The present results confirm previous observations made in goats (Zarazaga et al., 2010a) and ewes (Zarazaga et al., 2010b) that the mean melatonin concentrations of both jugular veins are similar but that the interaction *jugular side* \times *animal* does have an effect on the concentration recorded. The existence of an absolute dominant side for the entire population would appear, therefore, not to exist. In the present work, higher concentrations were seen on the right side in some animals while in others the left side was dominant, and in still others there was no difference. Together these data demonstrate that, from a practical stand-point, the accurate assessment of melatonin production by the pineal gland requires measurements of melatonin concentrations in both jugular veins simultaneously, with the pooling of the samples.

5. Conclusions

The present results show that Mediterranean female goats are sensitive to changes in photoperiod, and that this environmental cue may control the timing of the breeding season under natural conditions. Further, nutrition modulates the effect of photoperiod on LH secretion. Undernutrition leads to important reductions in LH that determine a longer pituitary rest period. The nutritional-metabolic pathways that determine the reduction in LH concentration in goats require further study. Finally, nutrition would appear to have no effect on melatonin concentration, at least under the conditions of the present work.

Conflict of interest statement

The authors declare they have no financial or personal relationship with any persons or organisations that might inappropriately influence or bias the content of this paper.

Acknowledgments

The authors thank the Assay Laboratory of the *Station de Physiologie de la Reproduction et des Comportements* (INRA, Nouzilly, France) for carrying out the LH radioimmunoassay, and D. Chesneau for performing the melatonin radioimmunoassay. This work was supported by Grant AGL2006-01426 from the C.I.C.Y.T. (Spain).

References

- Argo, C.M., Smith, J.S., Kay, R.N.B., 1999. Seasonal changes of metabolism and appetite in Soay rams. *Anim. Sci.* 69, 191–202.
- Baird, D.T., Swanston, I.A., McNeilly, A.S., 1981. Relationship between LH, FSH and prolactin concentration and the secretion of androgens and estrogens by the preovulatory follicle in the ewe. *Biol. Reprod.* 24, 1013–1025.
- Barenton, B., Ravault, J.P., Chabanet, C., Daveau, A., Pelletier, J., Ortavant, R., 1988. Photoperiodic control of growth hormone secretion on body weight. *Domest. Anim. Endocrinol.* 5, 247–255.
- Bissonnette, T.H., 1941. Experimental modification of breeding cycle in goats. *Physiol. Zool.* 14, 379–383.
- Chemineau, P., Daveau, A., Maurice, A., Delgadillo, J.A., 1992a. Seasonality of oestrus and ovulation is not modified by subjecting female Alpine goats to a tropical photoperiod. *Small Rumin. Res.* 8, 299–312.
- Chemineau, P., Malpoux, B., Delgadillo, J.A., Guerin, Y., Ravault, J.P., Thimonier, J., Pelletier, J., 1992b. Control of sheep and goat reproduction: use of light and melatonin. *Anim. Reprod. Sci.* 30, 157–184.
- Chemineau, P., Normant, F., Ravault, J.P., Thimonier, J., 1986. Induction and persistence of pituitary and ovarian activity in the out-of-season lactating dairy goat after a treatment combining a skeleton photoperiod, melatonin and the male effect. *J. Reprod. Fertil.* 78, 497–504.
- Clarke, I.J., Cummins, J.T., 1982. The temporal relationship between gonadotrophin releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone (LH) secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinology* 111, 1737–1739.
- De Santiago-Miramontes, M.A., Malpoux, B., Delgadillo, J.A., 2009. Body condition is associated with a shorter breeding season and reduced ovulation rate in subtropical goats. *Anim. Reprod. Sci.* 114, 175–182.
- Delgadillo, J.A., Fitz-Rodríguez, G., Duarte, G., Véliz, F.G., Carrillo, E., Flores, J.A., Vielma, J., Hernandez, H., Malpoux, B., 2004. Management of photoperiod to control caprine reproduction in the subtropics. *Reprod. Fertil. Dev.* 16, 471–478.
- Duarte, G., Nava-Hernández, M.P., Malpoux, B., Delgadillo, J.A., 2010. Ovarian activity of female goats adapted to the subtropics is responsive to photoperiod. *Anim. Reprod. Sci.* 120, 65–70.
- Faure, M.O., Nicol, L., Fabre, S., Fontaine, J., Mohoric, N., McNeilly, A., Taragnat, C., 2005. BMP-4 inhibits follicle-stimulating hormone secretion in ewe pituitary. *J. Endocrinol.* 186, 109–121.
- Forcada, F., Abecia, J.A., 2006. The effect of nutrition on the seasonality of reproduction in ewes. *Reprod. Nutr. Dev.* 46, 355–365.
- Forcada, F., Abecia, J.A., Sierra, I., 1992. Seasonal changes in oestrus activity and ovulation rate in Rasa Aragonesa ewes maintained at two different body condition levels. *Small Rumin. Res.* 8, 313–324.
- Fraser, S.P., Cowen, P., Franklin, M., Franey, C., Arendt, J., 1983. Direct radioimmunoassay for melatonin in plasma. *Clin. Chem.* 20, 396–397.
- Gómez-Brunet, A., Santiago-Moreno, J., Micheo, J.M., Sánchez, A., González-Bulnes, A., López-Sebastián, A., 2003. Variación anual de la actividad ovulatoria en la cabra de raza Malagueña. In: *Proceedings of the XXVIII Congreso de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia*, September 24–27, 2003, Badajoz, Spain.
- Gómez-Brunet, A., Santiago-Moreno, J., Toledano-Díaz, A., López-Sebastián, A., 2010. Evidence that refractoriness to long and short daylengths regulates seasonal reproductive transitions in Mediterranean goats. *Reprod. Domest. Anim.* 45, 338–343.
- Guerin, M.V., Deed, J.R., Matthews, C.D., 2000. The coincidence of light and melatonin with a specific phase of the circadian pacemaker is important for the timing of seasonal breeding. *J. Biol. Rhythms* 15, 514–523.
- Haynes, N.B., Lamming, G.E., Yang, K.P., Brooks, A.N., Finnie, A.D., 1989. Endogenous opioid peptides and farm animal reproduction. In: *Miliga, S.R. (Ed.), Oxford Reviews of Reproductive Biology*. Oxford University Press, pp. 111–145.

- Hervieu, J., Morand-Fehr, P., Schmidely, Ph., Fedele, V., Delfa, R., 1991. Mesures anatomiques permettant d'expliquer les variations des notes sternales, lombaires et caudales utilisées pour estimer l'état corporel des chèvres laitières. *Options Méditerranéennes* 13, 43–56.
- l'Anson, H., Foster, D.L., Foxcroft, G.R., Booth, P.J., 1991. Nutrition and reproduction. *Oxf. Rev. Reprod. Biol.* 13, 239–311.
- Karsch, F.J., Weick, R.F., Hotchkiss, J., Dierschke, D.J., Knobil, E., 1973. An analysis of the negative feedback control of gonadotropin secretion utilizing chronic implantation of ovarian steroids in ovariectomized rhesus monkeys. *Endocrinology* 93, 478–486.
- Kouakou, B., Gazal, O.S., Terrill, T.H., Kannana, G., Gelaye, S., Amoaha, E.A., 2008. Digestibility, hormones and blood metabolites in dairy bucks subjected to underfeeding and refeeding. *Small Rumin. Res.* 75, 171–176.
- Lincoln, G.A., Short, R.V., 1980. Seasonal breeding: nature's contraceptive. *Recent Prog. Horm. Res.* 36, 1–52.
- Mani, A.U., McKelvey, W.A.C., Watson, E.D., 1996. Effect of undernutrition on gonadotropin profiles in nonpregnant, cycling goats. *Anim. Reprod. Sci.* 43, 25–33.
- Marie, M., Findlay, P.A., Thomas, L., Adam, C.L., 2001. Daily patterns of plasma leptin in sheep: effects of photoperiod and food intake. *J. Endocrinol.* 170, 277–286.
- Martin, G.B., Hötzel, M.J., Blache, D., Walkden-Brown, S.W., Blackberry, M.A., Boukhliq, R., Fisher, J.S., Miller, D.W., 2002. Determinants of the annual pattern of reproduction in mature male Merino and Suffolk sheep: modification of responses to photoperiod by an annual cycle in food supply. *Reprod. Fertil. Dev.* 14, 165–175.
- Meza-Herrera, C.A., Hallford, D., Ortiz, J.A., Cuevas, R.A., Sanchez, J.M., Salinas, H., Mellado, M., González-Bulnes, A., 2008. Body condition and protein supplementation positively affect periovulatory ovarian activity by non LH-mediated pathways in goats. *Anim. Reprod. Sci.* 106, 412–420.
- Morand-Fehr, P., Sauvant, D., 1988. Alimentation des caprins. In: Jarrige, R. (Ed.), *Alimentation des Bovins, Ovins et Caprins*. INRA, Paris, pp. 281–304.
- Renquist, B.J., Calvert, C.C., Adams, B.M., Adams, T.E., 2008. Circulating estradiol suppresses luteinizing hormone pulse frequency during dietary restriction. *Domest. Anim. Endocrinol.* 34, 301–310.
- Restall, B.J., Starr, B.G., 1977. The influence of season of lambing and lactation on reproductive activity and plasma LH concentrations in Merino ewes. *J. Reprod. Fertil.* 49, 297–303.
- Rhind, S.M., 1992. Nutrition: its effects on endocrine profiles and reproductive performance in female sheep and goats. In: Speedy, A. (Ed.), *Progress in Sheep and Goat Research*. CAB International, Oxford, pp. 25–51.
- Rhind, S.M., McMillen, S., McKelvey, W.A.C., 1991. Effects of levels of food-intake and body condition on the sensitivity of the hypothalamus and pituitary to ovarian-steroid feedback in ovariectomized ewes. *Anim. Prod.* 52, 115–125.
- Santiago-Moreno, J., López-Sebastián, A., González-Bulnes, A., Gómez-Brunet, A., Chemineau, P., 2000. Seasonal changes in ovulatory activity, plasma prolactin, and melatonin concentrations, in Mouflon (*Ovis gmelini musimon*) and Manchega (*Ovis aries*) ewes. *Reprod. Nutr. Dev.* 40, 421–430.
- Santiago-Moreno, J., Gómez Brunet, A., González-Bulnes, A., Malpoux, B., Chemineau, P., Pulido, A., López-Sebastián, A., 2003. Seasonal ovulatory activity and plasma prolactin concentrations in Spanish ibex (*Capra pyrenaica hispanica*) maintained in captivity. *Reprod. Nutr. Dev.* 43, 217–224.
- Santiago-Moreno, J., Gómez-Brunet, A., Toledano-Díaz, A., Picazo, R., González-Bulnes, A., López-Sebastián, A., 2006. Seasonal endocrine changes and breeding activity in Mediterranean wild ruminants. *Reprod. Domest. Anim.* 41 (Suppl. 2), 72–81.
- Tatman, W.R., Judkins, M.B., Dunn, T.G., Moss, G.E., 1990. Luteinizing hormone in nutrient-restricted ovariectomized ewes. *J. Anim. Sci.* 68, 1097–1102.
- Tchamitchian, L., Ricordeau, G., Lefevre, C., Desvignes, A., 1973. Observations sur l'anestrus post-partum des brebis Romanov après un agnelage en saison sexuelle. *Ann. Zootech.* 22, 295–301.
- Tillet, Y., Ravault, J.P., Selve, C., Evin, G., Castro, B., Dubois, M.P., 1986. Conditions d'utilisation d'anticorps spécifiques pour la visualisation immunohistochimique de la sérotonine et de la mélatonine dans la glande pinéale du mouton. *C. R. Acad. Sci. Ser. III, Paris* 303, 77–82.
- Urrutia-Morales, J., Meza-Herrera, C.A., Escobar-Medina, F.J., Gámez-Vázquez, H.G., Ramírez-Andrade, B.M., Díaz-Gómez, M.O., González-Bulnes, A., 2009. Relative roles of photoperiodic and nutritional cues in modulating ovarian activity in goat. *Reprod. Biol.* 9, 283–294.
- Walkden-Brown, S.W., Restall, B.J., Hennawati, 1993. The male effect in the Australian cashmere goat. 2. Enhancement with buck nutrition and use of oestrous female. *Anim. Reprod. Sci.* 32, 69–84.
- Walkden-Brown, S.W., Restall, B.J., Norton, B.W., Scaramuzzi, R.J., Martin, G.B., 1994. Effect of nutrition on seasonal patterns of LH, FSH and testosterone concentration, testicular mass, sebaceous gland volume and odour in Australian cashmere goats. *J. Reprod. Fertil.* 102, 351–360.
- Zarazaga, L.A., Celi, I., Guzmán, J.L., Malpoux, B., 2010a. Melatonin concentrations in the two jugular veins, and relationship with the seasonal reproductive activity in goats. *Theriogenology* 74, 221–228.
- Zarazaga, L.A., Celi, I., Guzmán, J.L., Malpoux, B., 2011. The role of nutrition in the regulation of LH secretion by the opioidergic, dopaminergic and serotonergic systems in female Mediterranean goats. *Biol. Reprod.* 84, 447–454.
- Zarazaga, L.A., Guzmán, J.L., Domínguez, C., Pérez, M.C., Prieto, R., 2005. Effect of plane of nutrition on seasonality of reproduction in Spanish Payoya goats. *Anim. Reprod. Sci.* 87, 253–267.
- Zarazaga, L.A., Malpoux, B., Chemineau, P., 2003. Amplitude of the plasma melatonin nycthemeral rhythms is not associated with the dates of onset and offset of the seasonal ovulatory activity in the Ile-de-France ewe. *Reprod. Nutr. Dev.* 43, 167–177.
- Zarazaga, L.A., Todini, L., Chemineau, P., Marnet, P.G., Locatelli, A., Malpoux, B., 2010b. Nocturnal melatonin concentrations vary dramatically between the two jugular veins in most individual sheep. *Res. Vet. Sci.* 88, 233–238.
- Zieba, D.A., Klocek, B., Williams, G.L., Romanowicz, K., Boligłowa, L., Wozniak, M., 2007. In vitro evidence that leptin suppresses melatonin secretion during long days and stimulates its secretion during short days in seasonal breeding ewes. *Domest. Anim. Endocrinol.* 33, 358–365.

Artículo 2. Se corresponde con el objetivo 2.

El papel de la nutrición en la regulación de la secreción de LH por los sistemas opioidérgico, dopaminérgico y serotoninérgico en hembras caprinas Mediterráneas

The role of nutrition in the regulation of LH secretion by the opioidergic, dopaminergic and serotonergic systems in female Mediterranean goats

Luis Ángel Zarazaga, Irma Celi, José Luis Guzmán, Benoît Malpoux

Biology of Reproduction (2011) 84: 447-454.

The Role of Nutrition in the Regulation of Luteinizing Hormone Secretion by the Opioidergic, Dopaminergic, and Serotonergic Systems in Female Mediterranean Goats¹

Luis A. Zarazaga,^{2,3} Irma Celi,³ José Luis Guzmán,³ and Benoît Malpoux⁴

Department of Agroforestry Sciences,³ University of Huelva, Palos de la Frontera, Huelva, Spain
 Physiologie de la Reproduction et des Comportements,⁴ Unité Mixte de Recherche, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)/Centre National de la Recherche Scientifique-Université de Tours-Haras Nationaux, Centre INRA de Tours, Nouzilly, France

ABSTRACT

This study examined which neural mechanism (opioid, dopaminergic, or serotonergic system) is involved in the regulation of luteinizing hormone (LH) secretion, with and without nutritional modulation, at different times of the photoperiodic cycle. Goats were randomly distributed into two experimental groups that received either 1.1 (high group; $n = 18$) or 0.7 (low group; $n = 18$) times the nutritional maintenance requirements. The goats were exposed to alternations of 3 mo of long days and 3 mo of short days. Plasma LH concentrations were measured twice a week. The effects of intravenous injections of naloxone (endogenous opioid receptor antagonist), pimozide (dopaminergic₂ receptor antagonist), and cyproheptadine (serotonin 5-hydroxytryptamine₂ receptor antagonist) on LH secretion were assessed during challenges in three different photoperiodic situations: the onset of LH stimulation by short days (OnsetSD), the onset of LH inhibition by long days (OnsetLD), and during the LH inhibition by long days (LateLD). The role of the different neural systems was clearly modified by the level of nutrition. In the low-nutrition group, only naloxone increased LH concentrations during onsetLD ($P < 0.05$). However, in the high-nutrition group, naloxone increased the concentration and pulsatility of LH ($P < 0.05$) in onsetSD and onsetLD. Pimozide increased LH concentration and pulsatility ($P < 0.05$) in onsetLD and LH concentration in lateLD ($P < 0.001$). Finally, cyproheptadine significantly increased LH concentration at all three times ($P < 0.001$). These results provide evidence that all three systems are involved in the inhibition of LH release in onsetLD, and that the opioid and serotonin mechanisms are involved during the onsetSD that were enhanced by a high plane of nutrition.

dopamine, goat, LH, luteinizing hormone, nutrition, opioid, serotonin

¹Supported by grant AGL2006-01426 from the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (Spain).

²Correspondence: L.A. Zarazaga, Department of Agroforestry Sciences, University of Huelva, Carretera de Palos de la Frontera s/n, 21819, Palos de la Frontera, Huelva, Spain. FAX: 34 959217304; e-mail: zarazaga@uhu.es

Received: 7 June 2010.
 First decision: 20 July 2010.
 Accepted: 8 October 2010.

© 2011 by the Society for the Study of Reproduction, Inc.
 eISSN: 1529-7268 <http://www.biolreprod.org>
 ISSN: 0006-3363

INTRODUCTION

Photoperiod is the principal cue governing reproductive activity through its influence on pituitary responsiveness to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and the pattern of luteinizing hormone (LH) secretion [1]. In female goats, this influence is reflected by seasonal changes in ovarian activity and LH concentrations [2]. Under artificial photoperiod, the transfer of goats from a long to a short photoperiod produces an increase in neuroendocrine sexual activity after about 56 days [3]. The neural mechanisms responsible for the transduction of photoperiodic signals into an endocrine response have not been completely elucidated. It has now been established that melatonin mediates the reproductive response to both inductive and inhibitory day lengths [4, 5].

Several studies have shown the role of the different neural systems responsible for LH pulse frequency inhibition during natural anestrus, above all in ewes. Endogenous opioid modulation of reproductive activity is well documented. Opioid mechanisms regulate LH secretion during early and late anestrus [6], and the blockage of opiate receptors with naloxone increases LH concentrations in bucks during the nonbreeding season [7]. However, the response to naloxone failed to induce a response in oestradiol-implanted adult ewes [8–12].

The dopaminergic system is another neural mechanism that has been shown to be involved in the suppression of LH secretion by oestradiol during seasonal anestrus in ewes. Pimozide, a dopamine antagonist, increases LH pulse frequency in intact ewes [6, 13–16], yet no information exists about the role of this system on the inhibition of LH pulsatility in goats.

The serotonergic system is the third neural system that has been shown to be involved in LH inhibition during seasonal anestrus in sheep. Riggs and Malven [17] found that the intraventricular infusion of serotonin suppresses the secretion of LH in castrated rams, and suggests an inhibitory role for serotonergic neurons. In oestradiol-treated, ovariectomized ewes, the serotonergic receptor antagonist, cyproheptadine, increased pulsatile LH secretion, both before the onset of the stimulatory short-day response and during photorefractoriness to short days [16]. Although the role of serotonin in the inhibition of LH secretion has not been described in Mediterranean goats, it appears to be involved during early anestrus in Mediterranean ewes [18].

Nutrition is considered to be an important factor that affects reproductive function in domestic ruminants and influences the onset of ovarian cyclicity in goats [2, 19]. Low levels of food intake or poor body condition are associated with an enhanced hypothalamic sensitivity to oestradiol [20], and nutrition in

Mediterranean goats can modulate the effect of photoperiod on the length and depth of seasonal anestrus [2].

Seasonal changes in GnRH/LH secretion are related to seasonal changes in concentrations of, and sensitivity to, circulating gonadal steroids [21]. These cause a clear reduction in gonadotropin secretion during seasonal anestrus [2, 22], reflecting the corresponding change in the action of oestradiol on episodic GnRH release [23]. Moreover, the sensitivity of hypothalamic activity to oestradiol may be enhanced or reduced according to the level of food intake [24]. Thus, ovariectomized animals with oestradiol implants (OVX+E) provide an experimental model commonly used in seasonality and nutrition research, because they reflect the changes in the sensitivity of the hypothalamus-hypophyseal axis to oestradiol under constant release of this steroid [2, 22].

In this paper, we assess the effect of the level of nutrition on the regulation of LH secretion by the endogenous opioid, dopaminergic, and serotonergic systems during the stimulation of LH secretion by short days or during the onset of the inhibition of LH secretion by long days, and during the inhibition of LH secretion during long days.

MATERIALS AND METHODS

Study Conditions

All management and experimental procedures were carried out in strict accordance with the Spanish guidelines for experimental animal protection RD 1201/2005, and by trained personnel, in accordance with European Union Directive 86/609 regarding the protection of animals used in scientific experiments.

The present study was conducted on the University of Huelva's experimental farm (latitude 37°15'N), which meets the requirements of the European Community Commission for Scientific Procedure Establishments (1986).

Animals, Nutrition, and Photoperiodic Treatments

Thirty six adult female goats were used in this study. They were ovariectomized 1 mo before the onset of the experiment and simultaneously implanted subcutaneously with a 3.0-cm Silastic implant (internal diameter = 3.3 mm; external diameter = 4.6 mm) [25] containing crystalline oestradiol (Sigma Chemical Co., St. Louis). The implants were soaked in physiologic serum before insertion to prevent an initial peak of steroid release.

Does were randomly assigned to two experimental groups based on the provision of nutrition balanced for live weight (LW) and body condition score (BCS) [26]. The group that received a high plane of nutrition (high group; $n = 18$) was fed with 700 g of concentrate and 500 g of barley straw, whereas the group that received a low plane of nutrition (low group; $n = 18$) was fed with 350 g of concentrate and 500 g of barley straw. These amounts correspond to a daily intake of 0.78 milk fodder units (UFL) and 100 g of digestible protein (high group) and 0.49 UFL and 50 g of digestible protein (low group), providing 1.1 and 0.7 times maintenance requirements, respectively, for a goat of 50 kg LW at the beginning of the experiment, according to Institut National de la Recherche Agronomique standards [27]. Food was offered once a day, with the concentrate being distributed individually to each animal, and the barley straw being divided within each pen. The concentrate was a commercial mixture of maize (26.3%), beans (20%), oats (14.1%), cotton seed (13.7%), peas (13.4%), lupin (7.3%), barley (0.2%), wheat (0.2%), sunflower seeds (0.2%), and a commercial concentrate as a mineral-vitamin complement (4.6%). All the animals had free access to water and mineral blocks containing trace elements and vitamins.

The females in both nutritional groups were housed in a light-proof building under artificial lighting. They were exposed for 9 mo to alternations between 3 mo of long days (LD, 16L:8D: lights on, 0700 h; lights off, 2300 h) and 3 mo of short days (SD, 8L:16D: lights on, 0700 h; lights off, 1500 h). The photoperiodic treatment started on June 15, and the first exposure was to long days.

Long-Term LH Neuroendocrine Activity

The effect of photoperiodic treatments on neuroendocrine LH activity was assessed through monitoring long-term LH variations by collecting blood

samples twice a week by jugular venipuncture. The samples were immediately centrifuged for 30 min ($3000 \times g$) and the plasma stored at -20°C until assay. The time of onset and cessation of LH secretion was determined for each individual pattern. First, a baseline level for each individual profile was defined as the average value of the samples obtained from February 22 until April 18, since this was the period with lower LH concentrations (Fig. 1). Elevated LH concentrations were defined as differing from this baseline by more than 3 SD of the baseline.

Drugs

Antagonists to opioid receptors (naloxone), dopaminergic₂ receptors (pimozide), and serotonin 5-hydroxytryptamine₂ (5HT₂) receptors (cyproheptadine) were used at different points in time during the stimulation or inhibition of LH secretion as induced by the photoperiodic treatment. Naloxone hydrochloride (Sigma-Aldrich) was dissolved in 0.9% (w/v) sterile saline at a concentration of 4.8 mg/ml. Pimozide (Sigma-Aldrich) was dissolved in 0.1 M tartaric acid at a concentration of 3 mg/ml. Cyproheptadine hydrochloride sesquihydrate (Sigma-Aldrich) was dissolved in 50% ethanol-propanediol at a concentration of 25 mg/ml. The drugs were administered as a bolus into the jugular vein through a catheter. Each drug was dissolved less than 3 h before intravenous injection and stored at room temperature until use.

Drug Challenges

During all these challenges, blood samples were collected at 10-minute intervals, from 1 h before (control period) to 2 h after (treatment period) the intravenous injection.

Drug challenge 1: dose response to naloxone, pimozide, and cyproheptadine. The challenge was conducted in order to define the effective dose of each drug that modifies LH concentrations in goats. This challenge was performed on three occasions over 6 wk after the shift from long to short days. The first time, each goat received the lowest dose of each drug intravenously. To avoid possible carryover effects, the same goats received the intermediate dose of each drug 5 days later, and 7 days later received the highest dose of each drug. All the goats used were from the high group. The doses used were: 0.50, 1.00, and 2.00 mg/kg LW ($n = 3$ goats per dose) of naloxone; 0.25, 0.50, and 0.75 mg/kg LW ($n = 3$ per dose) of pimozide; and 0.1, 0.25, and 0.75 mg/kg LW ($n = 3$ per dose) of cyproheptadine.

Drug challenge 2: the effects of naloxone, pimozide, and cyproheptadine on LH release in goats at specific times in respect to parameters of LH release during different photoperiodic regimes. The dates of each antagonist treatment were defined according to LH profiles (Fig. 1): the onset of LH stimulation secretion by short days (late seasonal anestrus), the onset of the inhibition of LH secretion by long days (early seasonal anestrus), and the time when the LH secretion is inhibited by long days (deep seasonal anestrus). On each occasion, the goats received either naloxone ($n = 6$ per nutritional group), pimozide ($n = 6$ per nutritional group), or cyproheptadine ($n = 6$ per nutritional group). During each challenge, blood samples were collected via jugular catheter. The animals used for each nutritional group were different for each drug. During all the challenges, blood samples were collected at 10-min intervals from 3 h before (control period) to 3 h after (treatment period) the intravenous injection of the appropriate vehicles described above or the drugs, respectively.

LH Assays and Pulse Identification

Plasma LH concentrations were determined by using double-antibody ELISA, as previously described by Faure et al. [28]. The sensitivity of the assay was 0.1 ng/ml, and the intra- and interassay coefficients of variation in the control were 7.5% and 2.5%, respectively. All samples from the same challenge were measured in the same assay. All the hormonal analyses were conducted at the hormone analysis laboratory (Nouzilly, France). LH pulses were defined, according to Baird et al. [29], as the point with two consecutive values higher than the two preceding ones, with the highest value (pulse amplitude) exceeding the mean basal value by at least four times the coefficient of variation of the assay.

Statistical Analysis

The data obtained during the first 3 mo of the study (June 15 to September 15) were excluded from the statistical analysis because this was considered to be the period needed by the animals to adapt to the experimental conditions; however, these data are included in the figures. The weekly effects of nutrition on LW and BCS or twice weekly samples of LH concentrations were analyzed

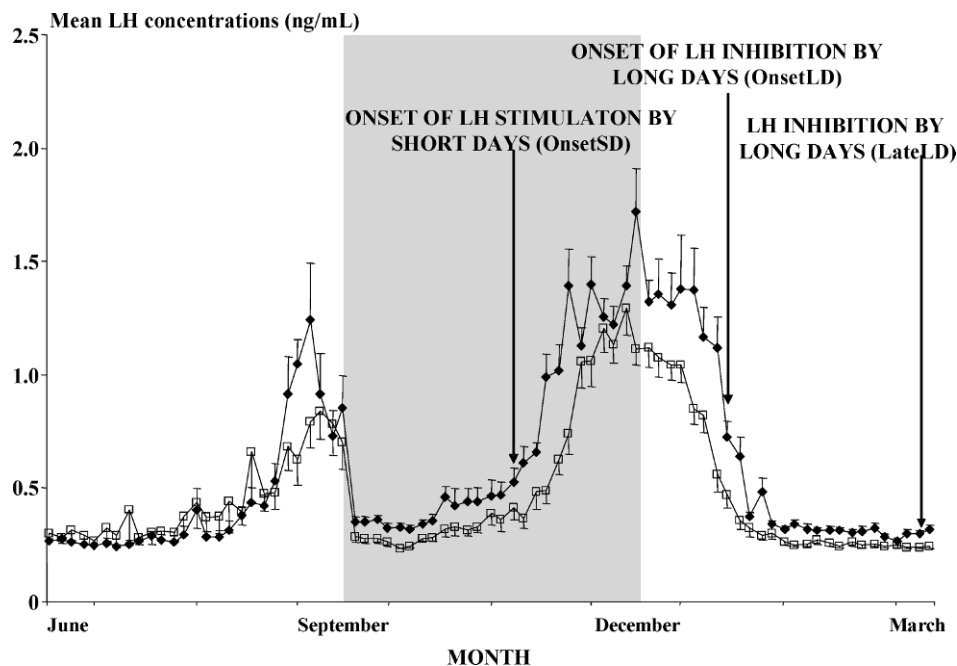


FIG. 1. Changes (mean \pm SEM) in LH concentration (ng/ml) in Mediterranean female goats subjected to alternations of 3 mo of long days and 3 mo of short days. Goats received either 1.1 (high group, solid symbols; n = 18) or 0.7 (low group, open symbols; n = 18) times the maintenance requirements. Shared areas indicate the months when animals were exposed to short days. The arrows indicate the dates that challenges with drug were performed.

using the one-factor ANOVA (nutritional treatments: high group or low group), with time as a repeated measure.

The mean LH concentrations and mean LH pulse frequencies and amplitudes in the drug treatments were calculated for each pre- and posttreatment period. These variables were used for statistical analysis.

Due to the nonparametric nature of LH pulse frequency, a Wilcoxon test was performed for the between-dose comparisons of each drug to test the difference between the number of pulses before and after treatment. The effect of the treatments on mean LH concentration were analyzed using a paired *t*-test (pre- vs. postinjection periods).

The results of the mean LH concentration during the pre and postinjection period at each point in time of the stimulation or inhibition of the LH secretion by the photoperiodic treatment (late, onset, and deep seasonal anestrus) were analyzed using ANOVA, with drug (naloxone, pimoziide, or cyproheptadine), nutrition (high or low group), and time as repeated measures. A Tukey test was performed when differences between drug treatments were significant. After ANOVA, the effect of drug treatments on the mean LH concentration were analyzed using a paired *t*-test (pre- vs. postinjection periods) at each point in time of seasonal anestrus and for each nutritional group.

Due to the nonparametric nature of LH pulse frequency, a Kruskal-Wallis ANOVA was used to test the differences between nutritional groups in the control periods. After ANOVA, the effects of drug treatments on the number of LH pulses were analyzed using the Wilcoxon test (pre- vs. postinjection periods) for each point in time studied during the reproductive period, and for each drug in the same nutritional group.

RESULTS

LW and BCS

Mean LW and BCS varied substantially ($P < 0.001$) over time between experimental groups, as depicted in Figure 2. Overall, mean LW and BCS was higher in high-group compared with low-group animals (53.4 ± 0.3 kg and 2.50 ± 0.01 kg vs. 47.9 ± 0.3 kg and 2.22 ± 0.01 kg, respectively). No interaction between plane of nutrition and time was observed.

Patterns of LH Concentrations

Both groups displayed substantial variations in LH concentrations according to the photoperiod to which they were subjected (Fig. 1). Thus, the LH concentrations varied substantially over time ($P < 0.001$), with a significant effect of nutrition (0.59 ± 0.02 ng/ml vs. 0.40 ± 0.01 ng/ml mean LH

concentrations over the entire sampling period, for the high and low groups, respectively; $P < 0.01$). When LH concentrations during the short- or long-day photoperiod were analyzed, very substantial differences were observed, with higher mean LH concentrations during the short- or long-day photoperiods (0.54 ± 0.01 vs. 0.43 ± 0.01 ng/ml for short and long days, respectively, $P < 0.001$). Moreover, mean LH differences between nutritional groups were observed during short-day (0.65 ± 0.02 vs. 0.44 ± 0.02 ng/ml for the high and low groups, respectively, $P < 0.001$) and long-day experiments (0.51 ± 0.02 vs. 0.35 ± 0.01 ng/ml for the high and low groups, respectively; $P < 0.001$).

The mean interval between the shift from long to short days and the stimulation of the LH secretion differed between nutritional groups ($P < 0.001$) (Table 1), in accordance with the criteria described above. Similar results were demonstrated with the mean interval between the change from short to long days and the onset of the inhibition of LH secretion, with a clear effect of nutrition ($P < 0.05$; Table 1). These results caused a longer duration of the inhibition of LH secretion in the low group ($P < 0.001$).

Dose Response of LH Release to Naloxone, Cyproheptadine, and Pimoziide

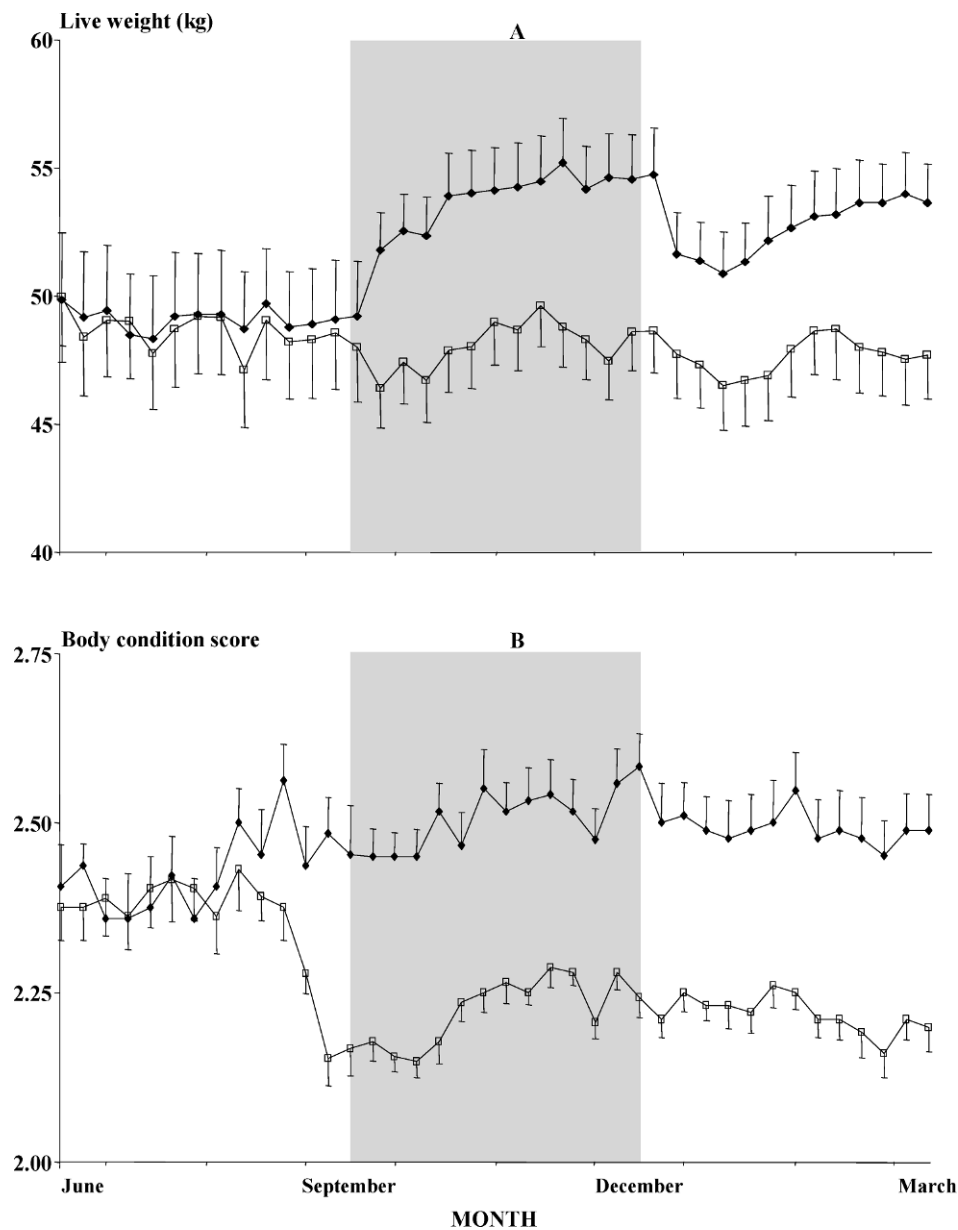
Only the highest doses of naloxone, pimoziide, or cyproheptadine elicited an elevation in mean LH concentrations (Fig.

TABLE 1. The mean interval (days) between the shift from long to short days during the stimulation of the LH (High LH) and between the change from short to long days during the onset of the inhibition of the LH (Low LH), the elevation of LH secretion (Activity), and of the period of inhibition of LH secretion (Inactivity) in each nutritional group.

Nutritional group	Mean interval (days)			
	High LH	Low LH	Activity	Inactivity
H	46.6 ± 3.8^c	27.9 ± 1.6^a	79.5 ± 5.9^c	122.0 ± 2.2^c
L	65.4 ± 2.5^d	22.6 ± 1.8^b	51.5 ± 4.1^d	138.5 ± 2.5^d

^{a-d} Different letters in the same column indicates differences of: a,b $P < 0.05$; c,d $P < 0.001$.

FIG. 2. Changes (mean \pm SEM) in live weight (A) and body condition score (B) in Mediterranean female goats subjected to alternations of 3 mo of long days and 3 mo of short days. Goats received either 1.1 (high group, solid symbols; n = 18) or 0.7 (low group, open symbols; n = 18) times the maintenance requirements. Shared areas indicate the months when animals were exposed to short days.



3). Therefore, when mean LH concentrations during the pre- and posttreatment periods were compared, differences ($P < 0.05$) were only observed at doses of 2, 0.75, and 0.75 mg/kg LW for naloxone, pimoizide, and cyproheptadine, respectively.

The Effect of Nutrition and Drug Treatments on LH Release in Goats at the Onset of the Stimulation of LH Concentrations by Short Days

There was no effect of nutrition or time on mean LH release during the control period for each drug. However, an effect of time ($P < 0.05$), nutrition ($P < 0.001$), and pharmacological treatment ($P < 0.001$) was observed during the postinjection period. The naloxone treatment induced higher LH concentrations than the other two drugs (1.50 ± 0.08 ng/ml, 0.73 ± 0.03 ng/ml, and 0.81 ± 0.04 ng/ml for naloxone, pimoizide, and cyproheptadine, respectively).

The differences between the pre- and postinjection periods for each nutritional treatment and drug are summarized in Figures 4A and 5A. None of the treatments modified LH

concentrations or the mean number of pulses in the low group. In the high group, naloxone and cyproheptadine increased LH concentrations ($P < 0.001$) and the mean number of pulses ($P < 0.05$).

The Effect of Nutrition and Drug Treatments on LH Release in Goats at the Onset of the Inhibition of LH Concentrations by Long Days

No differences were observed in LH concentrations between nutritional groups during the pretreatment period. After treatment, an effect of time and nutrition was observed ($P < 0.001$). The differences between pre- and postinjection periods for each nutritional treatment and drug are summarized in Figures 4B and 5B. Only naloxone increased the LH concentrations in the low group ($P < 0.05$), but none of the used drugs modified the mean number of LH pulses in this group. However, all the drugs induced a clear increase in LH concentrations ($P < 0.001$) and the mean number of pulses in the high group ($P < 0.05$).

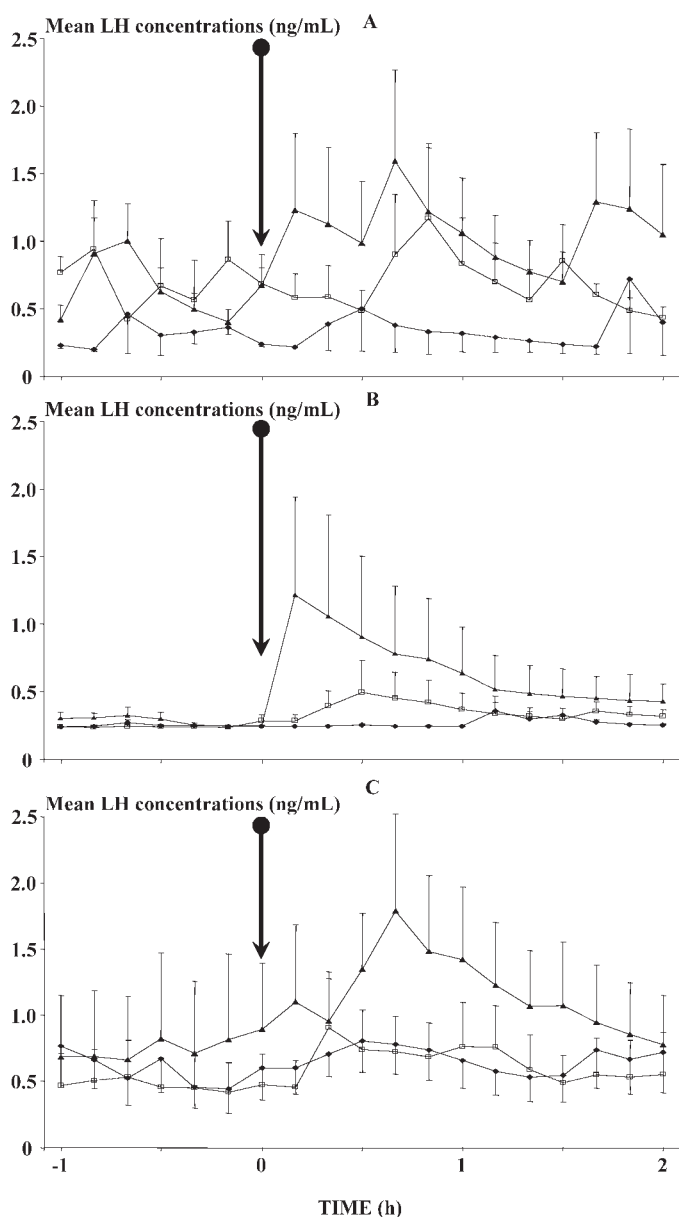


FIG. 3. Changes (mean \pm SEM) in LH concentrations (ng/ml) injected with different doses of naloxone (A), pimoizide (B), or cyproheptadine (C). A) Doses of naloxone: 0.5 mg/kg (solid diamond), 1.0 mg/kg (open square), and 2.0 mg/kg (solid triangle) live weight. B) Doses of pimoizide: 0.25 mg/kg (solid diamond), 0.5 mg/kg (open square), and 0.75 mg/kg (solid triangle) live weight. C) Doses of cyproheptadine: 0.10 mg/kg (solid diamond), 0.5 mg/kg (open square), and 0.75 mg/kg (solid triangle) live weight. Three goats were used per dose. The arrows indicate the time of the drug injection.

The Effect of Nutrition and Drug Treatments on LH Release in Goats During the Inhibition of LH by Long Days

Differences ($P < 0.001$) were observed in LH concentrations between nutritional groups during the pretreatment period. An effect of time was observed ($P < 0.01$) after the injection of the drug. Differences between nutritional groups were maintained ($P < 0.001$) during this period, but no differences among drugs treatments were observed.

The differences between the pre- and postinjection periods for each nutritional treatment and drug are summarized in Figures 4C and 5C. None of the drugs increased the LH

concentrations in the low group; however, pimoizide and cyproheptadine increased LH concentrations in the high group ($P < 0.001$). No drug increased the number of pulses in any of the nutritional groups.

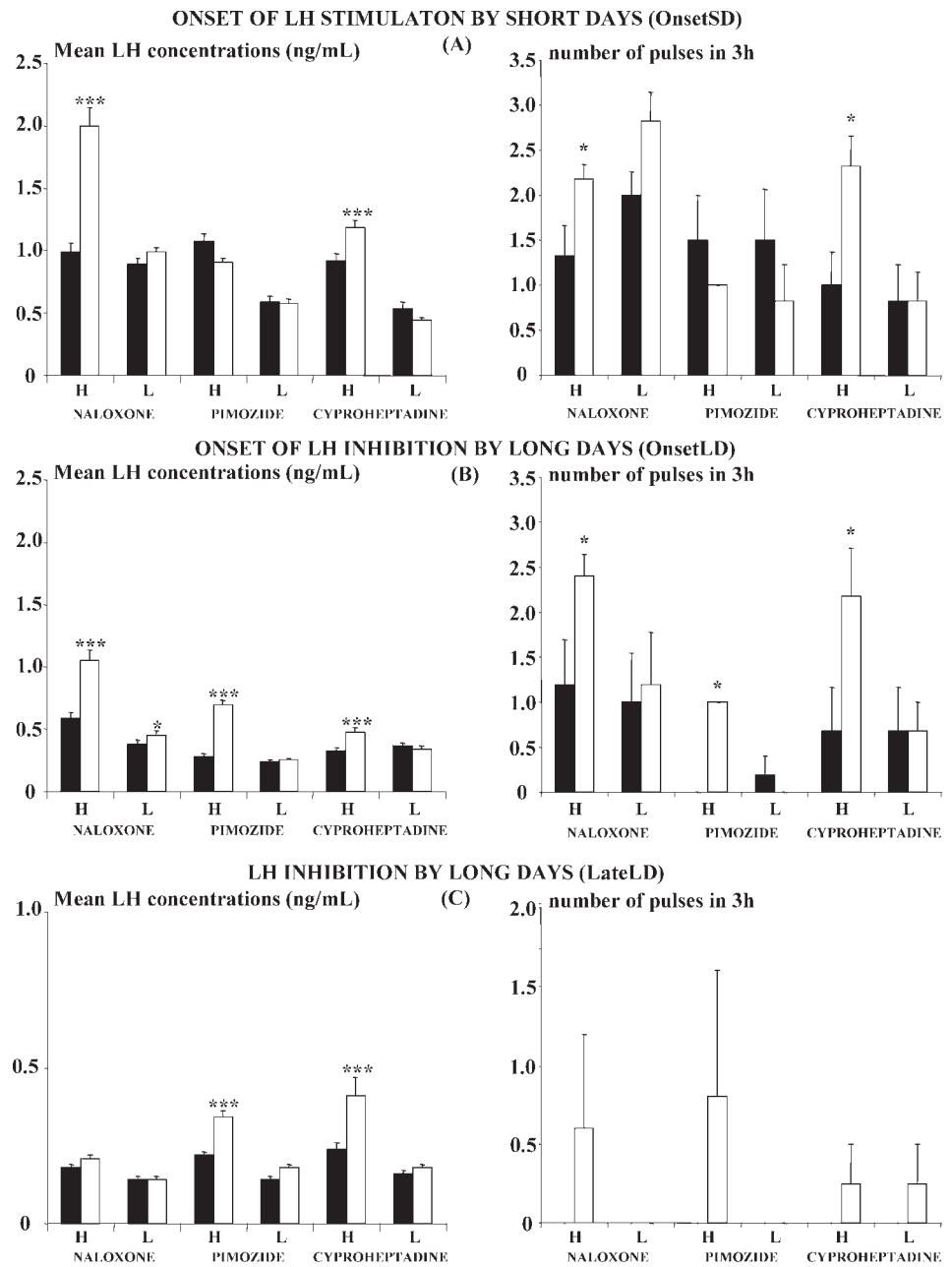
DISCUSSION

It has been demonstrated that the role of nutrition is very important in the inhibition of LH secretion in Mediterranean female goats. The results indicate that different neural systems are involved at specific times within the reproductive cycle, but their role was modified by the level of nutrition. The lack of response to the used drugs in the low-nutrition group could indicate that these neurotransmitters are more strongly involved and/or the doses selected were not adequate to overcome that inhibition under these conditions. However, whenever an increase in LH secretion was observed due to treatment, it was always in the group that received a higher plane of nutrition.

In the present study, the lower level of nutrition induced a decrease in the mean LH concentrations during the entire photoperiodic cycle in comparison with the higher level of nutrition. In line with our results, Walkden-Brown et al. [19] observed that the effect of a low-quality diet in bucks induced a reduction of LH concentrations during the entire experimental period compared with bucks with a high-quality diet. Rhind et al. [24] reported that low food intake is associated with increased negative feedback to oestradiol on LH in OVX+E ewes. In goats, De Santiago-Miramontes et al. [30] and Zarazaga et al. [2] have shown that females with a lower BCS or a lower level of nutrition, respectively, presented longer seasonal anestrus as a result of an earlier onset of the anovulatory period, and a delayed onset of ovulatory activity. These results in goats coincide with those obtained in the present experiment, and allow earlier results to be explained, because the activity of the hypothalamic-pituitary axis begins later in animals with reduced levels of nutrition.

Irrespective of the level of nutrition, naloxone treatment (endogenous opioid receptor antagonist, 2 mg/kg LW) tended to increase LH secretion only during the onset of LH inhibition by long days. Moreover, this drug increased LH secretion in the high group at the onset of the LH stimulation by the short days. This result is very similar to those obtained by Forcada et al. [6], with naloxone, producing a clear effect on both supplemented and nonsupplemented Mediterranean ewes. Several studies have failed to increase LH secretion in ewes during food restriction after naloxone treatment [31, 32], suggesting that opioid pathways do not exert a significant inhibitory influence on LH release during undernutrition, yet no previous results exist in goats. One possible explanation for the clear effect of naloxone on LH pulsatility may be that it has been demonstrated that the hypothalamic GnRH pulse generator activity is under a tonic suppression by endogenous opioid in ovariectomized goats [33]. Singh et al. [7] and Fuentes et al. [34] observed that the injection of naloxone or the chronic administration of low doses of naloxone in bucks during the nonbreeding season increased LH concentrations; Xia Orong and Zhang (1996; cited in Ref. 7) observed similar results in female goats. However, no effects from naloxone were observed during the deep seasonal anestrus in our experiment. The difference in relation to earlier studies of goat species may be related to the time of the injection in relation to the seasonal anestrus. In our experiment, the artificial photoperiod used ensured that the time of the injection was appropriate in relation to the evolution of the LH concentrations profile. Accordingly, several authors have failed to

FIG. 4. The effect of naloxone, pimoziide, and cyproheptadine on mean LH concentrations (\pm SEM, left panel) and on the mean number of LH pulses (\pm SEM, right panel) 3 h before (solid squares) and after (open squares) injections. Female Mediterranean goats received 1.1 (high group, $n = 18$) or 0.7 times the maintenance requirements (low group, $n = 18$) during the onset of LH stimulation by short days (A), the onset of the LH inhibition by long days (B), and the LH inhibition by long days (C). Six goats were used per drug. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$.



produce a response from naloxone on LH secretion in seasonally anestrous adult ewes [8–13].

The lack of effect of pimoziide (dopaminergic₂ receptor antagonist) on LH secretion in the low group could indicate that these neurotransmitters are more strongly involved and/or the dose selected (0.75 mg/kg LW) was not adequate to overcome that inhibition under our conditions. In the high group, pimoziide increased the number of pulses of LH during early anestrus (onset of the LH inhibition by long days). These results are similar to those described in supplemented OVX+E ewes during early anestrus [6], or refractory to short days after photoperiodic treatments [15, 16], reporting an increase in LH pulsatility. All together, these results demonstrate that the dopaminergic system plays an important role in modulating LH pulsatile release during this period in goats and ewes. Our results indicate that the lower hypothalamic sensitivity to the negative feedback effects of oestradiol on LH in goats receiving a higher plane of nutrition could be

mediated, at a minimum, by the dopaminergic system during early anestrus. The absence of pimoziide effect on LH secretion in the low group contrasts with previous findings by Forcada et al. [18], who observed an increase in LH pulsatility in both high- and low-nutrition OVX+E ewes. However, in that experiment, all the ewes were treated with melatonin, which stimulates GnRH and LH by reducing tyrosine hydroxylase activity in the median eminence [35]. In our study, no effect of pimoziide was observed during the LH inhibition by long days. These results are also consistent with those by Le Corre and Chemineau [16]. This suggests that the dopaminergic system could be relatively unimportant during photosuppression [36]. To our knowledge, no results concerning the role of the dopaminergic system on the inhibition of LH concentration in goats have been published.

No effect of cyproheptadine (serotonin 5-hydroxytryptamine₂ receptor antagonist) on LH of the low group was observed, which could indicate again that these neurotransmit-

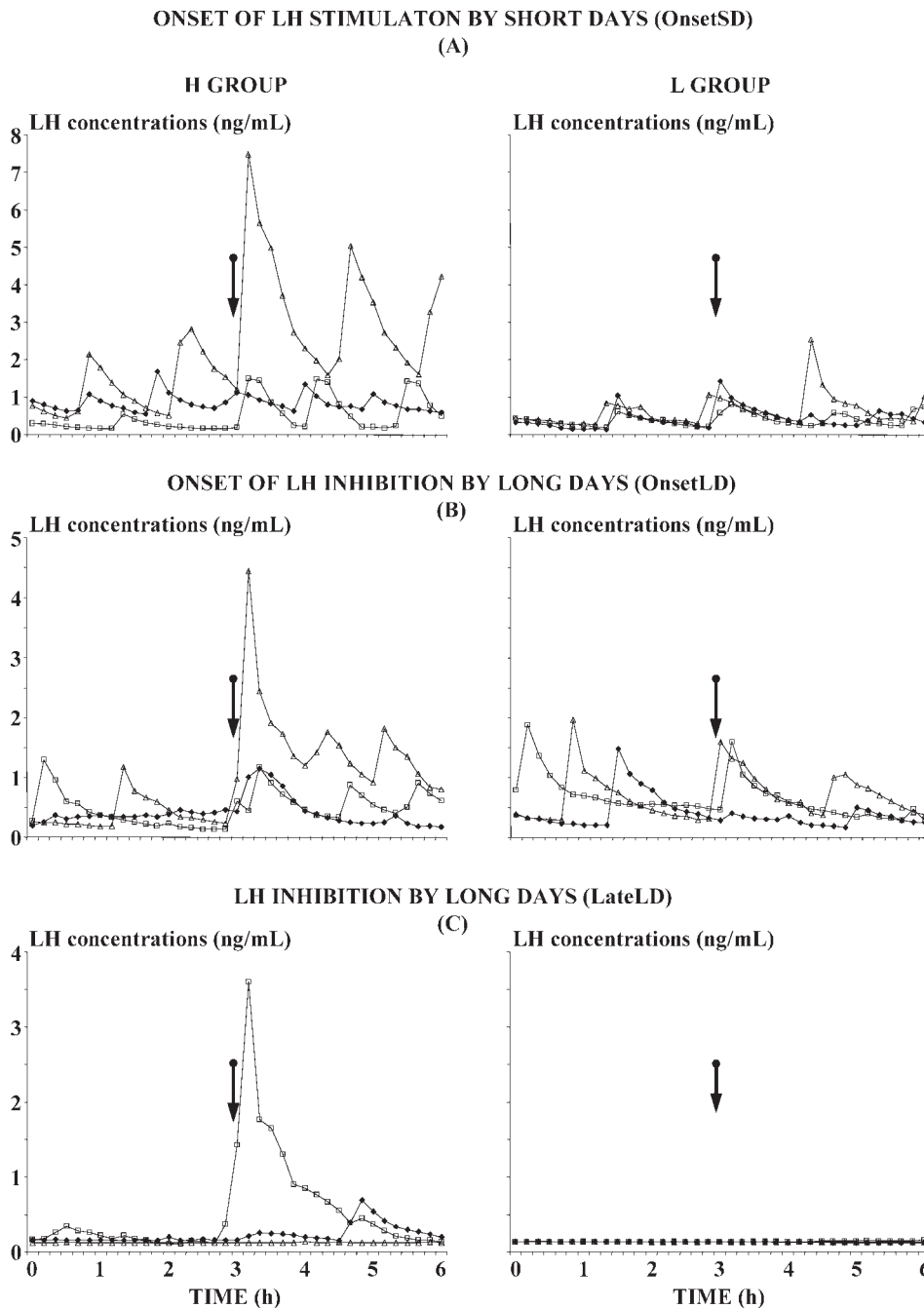


FIG. 5. Plasma LH concentrations (ng/ml) in representative ovariectomized, oestradiol-treated female Mediterranean goats injected with naloxone (open triangles), pimozide (solid diamonds), or cyproheptadine (open squares). They received 1.1 (high [H] group, left panel) or 0.7 times the maintenance requirements (low [L] group, right panel) in the onset of the LH stimulation by short days (A), the onset of the LH inhibition by long days (B), and during the LH inhibition by long days (C). The arrows indicate the time of the drug injection.

ters are strongly implicated and/or the dose selected (0.75 mg/kg LW) was not enough to overcome that inhibition under our conditions. Our findings also suggest that the serotonergic mechanism played a major role in the photoperiodic inhibition by the long days and the photoperiodic stimulation by the short days, since cyproheptadine sharply increased the number of LH pulses in the high group. These results suggest that the lower hypothalamic sensitivity to the negative feedback effects of oestradiol in goats receiving a higher plane of nutrition could be mediated, at a minimum during these periods, by the serotonergic system. These results differ from those obtained in Mediterranean ewes by Forcada et al. [18], who reported an increase in LH secretion during early anestrus in ewes with high and low levels of nutrition, but no effect during late anestrus. However, our results are similar to those obtained by Le Corre and Chemineau [16], who obtained a positive effect

from cyproheptadine in Ile de France ewes before short-day response and refractory to short days. However, these authors observed a significant effect from cyproheptadine in ewes in long days, which was similar to the deep seasonal anestrus in our experiment. This discrepancy may be due to a difference between the role of serotonergic neurons on the inhibition of the LH pulsatility between goats and ewes.

In conclusion, our results provide evidence that the role of the different neural systems were modified by the level of nutrition. In this way, the LH secretion of the group that received 0.7 times the nutritional maintenance requirements only responded to the injection of the opioid antagonist receptor (naloxone) during the onset of the inhibition by the LD. However, in the group that received 1.1 times the nutritional maintenance requirements, it was demonstrated that endogenous opioid and serotonergic mechanisms (cyprohep-

tadine) were involved in the inhibition of LH pulse frequency in female Mediterranean goats during onset of the LH inhibition by long days and onset of LH stimulation by short days. Furthermore, the ability of pimozide to increase LH pulse frequency in a state of long-days inhibition was demonstrated.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank the Assay Laboratory of the Station de Physiologie de la Reproduction et des Comportements (Institut National de la Recherche Agronomique, Nouzilly, France) for carrying out the radioimmunoassays.

REFERENCES

- Lincoln GA, Short RV. Seasonal breeding: nature's contraceptive. *Recent Prog Horm Res* 1980; 36:1–52.
- Zarazaga LA, Guzmán JL, Domínguez C, Pérez MC, Prieto R. Effect of plane of nutrition on seasonality of reproduction in Spanish Payoya goats. *Anim Reprod Sci* 2005; 87:253–267.
- Celi I, Guzmán JL, Malpoux B, Zarazaga LA. Efecto del nivel alimenticio sobre el control fotoperiódico de la secreción de LH en caprinos mediterráneos. In: *Proceedings of the 1st Congress of Young Research Workers in Formation, Córdoba, Spain, 15–16 October, 2009*.
- Bittman EL, Dempsey RJ, Karsch FJ. Pineal melatonin secretion drives the reproductive response to daylength in the ewe. *Endocrinology* 1983; 113:2276–2283.
- Bittman EL, Karsch FJ. Nightly duration of pineal melatonin secretion determines the reproductive response to inhibitory day length in the ewe. *Biol Reprod* 1984; 30:585–593.
- Forcada F, Lozano JM, Abecia JA, Zarazaga LA. Control of luteinizing hormone secretion in ewes by endogenous opioids and the dopaminergic system during short seasonal anoestrus: role of plane of nutrition. *Anim Sci* 1997; 65:217–224.
- Singh B, Dixit VD, Singh P, Georgie GC, Dixit VP. Effect of naloxone on the plasma levels of LH, FSH, prolactin and testosterone in Beetal bucks. *Small Ruminant Res* 2000; 37:51–55.
- Brooks AN, Lamming GE, Lees PD, Haynes NB. Opioid modulation of LH secretion in the ewe. *J Reprod Fertil* 1986; 76:693–708.
- Brooks AN, Haynes NB, Yang JUP, Lamming GE. Ovarian steroid involvement in endogenous opioid modulation of LH secretion in seasonally anestrus mature ewes. *J Reprod Fertil* 1986; 76:709–715.
- Trout WE, Malven PV. Effects of exogenous estradiol-17 β and progesterone on naloxone-reversible inhibition of the release of luteinizing hormone in ewes. *J Anim Sci* 1987; 65:1602–1609.
- Yang K, Haynes NB, Lamming GE, Brooks AN. Ovarian steroid hormone involvement in endogenous opioid modulation of LH secretion immature ewes during the breeding and non-breeding season. *J Reprod Fertil* 1988; 83:129–139.
- Schall RE, Ebling FJP, Karsch FJ, Foster DL. Postpubertal maturation of endogenous opioid regulation of luteinizing hormone secretion in the female sheep. *Biol Reprod* 1991; 44:760–768.
- Meyer SL, Goodman RL. Neurotransmitters involved in mediating the steroid-dependent suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion in anestrus ewes: effects of receptor antagonists. *Endocrinology* 1985; 116:2054–2061.
- Meyer SL, Goodman RL. Separate neural systems mediate the steroid-dependent and steroid-independent suppression of tonic luteinizing hormone in the anestrus ewe. *Biol Reprod* 1986; 35:562–571.
- Kao C, Schaeffer DJ, Jackson GL. Different neuroendocrine systems modulate pulsatile luteinizing hormone secretion in photosuppressed and photorefractory ewes. *Biol Reprod* 1992; 46:425–434.
- Le Corre S, Chemineau P. Control of photoperiodic inhibition of luteinizing hormone secretion by dopaminergic and serotonergic systems in ovariectomized Ile-de-France ewes supplemented with oestradiol. *J Reprod Fertil* 1993; 97:367–373.
- Riggs BL, Malven PV. Effects of intraventricular infusion of serotonin, norepinephrine, and dopamine on spontaneous LH release in castrate male sheep. *Biol Reprod* 1974; 11:587–592.
- Forcada F, Zuñiga O, Abecia JA. The role of nutrition in the regulation of LH secretion during anestrus by the serotonergic and dopaminergic systems in Mediterranean ewes treated with melatonin. *Theriogenology* 2002; 58:1303–1313.
- Walkden-Brown SW, Restall BJ, Norton BW, Scaramuzzi RJ, Martin GB. Effect of nutrition on seasonal patterns of LH, FSH and testosterone concentration, testicular mass, sebaceous gland volume and odour in Australian cashmere goats. *J Reprod Fertil* 1994; 102:351–360.
- Rhind SM. Nutrition: its effect on reproductive performance and its control in female sheep and goats. In: Speedy AW (ed.), *Progress in sheep and goats research*. Wallingford, UK: CAB International; 1992:25–52.
- Legan SJ, Karsch FJ. Photoperiodic control of seasonal breeding in ewes: modulation of the negative feedback action of estradiol. *Biol Reprod* 1980; 5:1061–1068.
- Henniawati, Restall BJ, Scaramuzzi RJ. Effect of season on LH secretion in ovariectomized Australian cashmere does. *J Reprod Fertil* 1995; 103:349–356.
- Karsch FJ, Dahl GE, Evans NP, Manning JM, Mayfield KP, Moenter SM, Foster DL. Seasonal changes in gonadotropin-releasing hormone secretion in the ewe: alteration in response to the negative feedback action of estradiol. *Biol Reprod* 1993; 49:1377–1383.
- Rhind SM, McMillen SR, McKelvey WAC. Effects of levels of food intake and body condition on the sensitivity of the hypothalamus and pituitary to ovarian steroid feedback in ovariectomized ewes. *Anim Prod* 1991; 52:115–125.
- Karsch FJ, Weick RF, Hotchkiss J, Dierschke DJ, Knobil E. An analysis of the negative feedback control of gonadotropin secretion utilizing chronic implantation of ovarian steroids in ovariectomized rhesus monkeys. *Endocrinology* 1973; 93:478–486.
- Hervieu J, Morand-Fehr P, Schmidly Ph, Fedele V, Delfa R. Mesures anatomiques permettant d'expliquer les variations des notes sternales, lombaires et caudales utilisées pour estimer l'état corporel des chèvres laitières. *Options Méditerranéennes* 1991; 13:43–56.
- Morand-Fehr P, Sauvart D. Alimentation des caprins. In: Jarrige R (ed.), *Alimentation des Bovins, Ovins et Caprins*. Paris: INRA; 1988:281–304.
- Faure MO, Nicol L, Fabre S, Fontaine J, Mohoric N, McNeilly A, Taragat C. BMP-4 inhibits follicle-stimulating hormone secretion in ewe pituitary. *J Endocrinol* 2005; 186:109–121.
- Baird DT, Swanson IA, McNeilly AS. Relationship between LH, FSH and prolactin concentration and the secretion of androgens and estrogens by the preovulatory follicle in the ewe. *Biol Reprod* 1981; 24:1013–1025.
- De Santiago-Miramontes MA, Malpoux B, Delgadillo JA. Body condition is associated with a shorter breeding season and reduced ovulation rate in subtropical goats. *Anim Reprod Sci* 2009; 114:175–182.
- Ebling FJP, Wood RI, Karsch FJ, Vannerson LA, Suttie JM, Bucholtz DC, Schall RE, Foster DL. Metabolic interfaces between growth and reproduction. III. Central mechanism controlling pulsatile luteinizing hormone secretion in the nutritionally growth-limited female lamb. *Endocrinology* 1990; 126:2719–2727.
- Recabarren SE, Zapata P, Parilo J. Disappearance of opioidergic tone of LH secretion in underfed prepubertal sheep. *Horm Metab Res* 1990; 22:225–228.
- Ito K, Tanaka T, Mori Y. Opioid peptidergic control of gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity in the ovariectomized goat. *Neuroendocrinology* 1993; 57:634–639.
- Fuentes VO, Fuentes P, Garcia A. The effect of naloxone on plasma concentrations of testosterone in male goats. *Small Ruminant Res* 1998; 27:173–176.
- Viguié C, Thibault J, Thiéry JC, Tillet Y, Malpoux B. Characterization of the short day-induced decrease in median eminence tyrosine hydroxylase activity in the ewe: temporal relationship with the changes in LH and prolactin secretion and short day-like effect of melatonin. *Endocrinology* 1997; 138:499–506.
- Malpoux B, Robinson JE, Wayne NL, Karsch FJ. Regulation of the onset of the breeding season of the ewe: importance of long days and of an endogenous reproductive rhythm. *J Endocrinol* 1989; 122:69–78.

Artículo 3. Se corresponde con el objetivo 3.

El papel de la nutrición en los mecanismos neuronales involucrados en la estimulación de la secreción de LH por la melatonina en hembras caprinas Mediterráneas

The effect of nutrition on the neural mechanisms potentially involved in melatonin-stimulated LH secretion in female Mediterranean goats

Luis Ángel Zarazaga, Irma Celi, José Luis Guzmán, Benoît Malpoux

Journal of Endocrinology (2011) 211: 263-272.

The effect of nutrition on the neural mechanisms potentially involved in melatonin-stimulated LH secretion in female Mediterranean goats

Luis A Zarazaga, Irma Celi, José Luis Guzmán and Benoît Malpoux¹

Department of Agroforestry Sciences, University of Huelva, Carretera de Palos de la Frontera s/n, Palos de la Frontera, 21819 Huelva, Spain

¹Physiologie de la Reproduction et des Comportements, UMR INRA-CNRS-Université de Tours-Haras Nationaux, Centre INRA de Tours, 37380 Nouzilly, France (Correspondence should be addressed to L A Zarazaga; Email: zarazaga@uhu.es)

Abstract

This research examines which neural mechanisms among the endogenous opioid, dopaminergic, serotonergic and excitatory amino acid systems are involved in the stimulation of LH secretion by melatonin implantation and their modulation by nutritional level. Female goats were distributed to two experimental groups that received either 1·1 (group H; $n=24$) or 0·7 (group L; $n=24$) times their nutritional maintenance requirements. Half of each group was implanted with melatonin after a long-day period. Plasma LH concentrations were measured twice per week. The effects of i.v. injections of naloxone, pimozide, cyproheptadine and *N*-methyl-D,L-aspartate (NMDA) on LH secretion were assessed the day before melatonin implantation and again on days 30 and 45. The functioning of all but the dopaminergic systems was clearly modified by the level of nutrition, melatonin implantation and time elapsed since

implantation. Thirty days after implantation, naloxone increased LH concentrations irrespective of the level of nutrition ($P<0\cdot05$), similar to NMDA in the melatonin-implanted H goats (HM; $P<0\cdot01$). On day 45, naloxone increased LH concentrations in the HM animals ($P<0\cdot05$), similar to cyproheptadine in both the non-implanted H (HC) and the HM animals ($P<0\cdot01$). Finally, at 45 days, NMDA increased the LH concentration in all subgroups ($P<0\cdot01$). These results provide evidence that the effects of different neural systems on LH secretion are modified by nutritional level and melatonin implantation. Endogenous opioids seem to be most strongly involved in the inhibition of LH secretion on days 30 and 45 after melatonin implantation. However, the serotonergic mechanism appears to be most influenced by nutritional level.

Journal of Endocrinology (2011) **211**, 263–272

Introduction

Nutrition is thought to be an important factor affecting the reproductive function in domestic ruminants, influencing the onset of ovarian cyclicity in goats (Walkden-Brown *et al.* 1994, Zarazaga *et al.* 2005). Low levels of food intake or poor body condition are associated with enhanced hypothalamic sensitivity to oestradiol (Rhind *et al.* 1991, Rhind 1992). In Mediterranean goats, nutrition can modulate the effect of photoperiod on the length and depth of seasonal anoestrus (Zarazaga *et al.* 2005) and undernutrition induces lower LH concentrations during short and long days (Zarazaga *et al.* 2011*a,b*). But in undernourished sheep, or those with low body condition scores (BCS), melatonin implantation allows a high ovulation rate (Forcada *et al.* 1995, Rondón *et al.* 1996) and a large number of healthy cleaved oocytes and blastocyst rate to be obtained (Vázquez *et al.* 2009, 2010).

Melatonin regulates seasonal reproduction through changes in the pulsatile secretion of GNRH and LH (Bittman *et al.* 1985, Viguié *et al.* 1995*a*). Its action on the activity of GNRH neurones appears to be indirect. A number of studies have suggested that different neurotransmitters are involved in the

regulation of LH secretion by melatonin or photoperiod, especially in ewes (Meyer & Goodman 1985, 1986, Le Corre & Chemineau 1993, Forcada *et al.* 1997). The neuroendocrine mechanism downstream of the action of melatonin, leading to the regulation of LH secretion, appears to involve several dopaminergic structures in the hypothalamus, such as the A14 and A15 nuclei of the lateral reticulohypothalamic area (Havern *et al.* 1994) and the arcuate nucleus–median eminence region (Anderson *et al.* 1997). In sheep, serotonin receptors are thought to be involved in the neural mechanisms that regulate the release of LH associated with the photoperiod. In this species, the determination of the brain-binding sites of the tritiated 5-hydroxytryptamine receptor₂ (5HT₂) antagonist ketanserin led to the identification of a specific ventral hypothalamic zone in which the binding density parallels the change in LH pulsatility (Le Corre *et al.* 1994). In goats, it has recently been shown that inhibitory pathways, such as the endogenous opioid pathways, regulate LH secretion during the early inhibition of LH secretion by long days and during LH stimulation by short days. Further, the dopaminergic inhibitory pathways are responsible for a reduction in LH pulse frequency during the

onset of LH inhibition by long days and during the inhibition of LH secretion by long days. Finally, the serotonergic system is involved during the onset of LH inhibition by long days, in the inhibition of LH secretion by long days, and in the onset of LH stimulation by short days, but always in well-nourished females (Zarazaga *et al.* 2011a).

The excitatory amino acids (EAA), glutamate and aspartate, are major stimulatory neurotransmitters in the mammalian nervous system. Acting through *N*-methyl-D,L-aspartate (NMDA) receptors, in sheep, these amino acids modulate the secretion of LH (Estienne *et al.* 1990, Lincoln & Wu 1991). In support of this, the administration of NMDA, a glutamatergic receptor agonist, acutely stimulates LH secretion (Viguié *et al.* 1995b). This stimulatory effect is larger during the period of photoinhibition of LH secretion than during the photostimulation, suggesting that EAA are involved in the photoperiodic regulation of LH secretion (Lincoln & Wu 1991). In bucks, the stimulatory effect of NMDA on LH secretion is more pronounced when subjected to long days than short days (Gazal *et al.* 2002). However, the information available on the effect of neuroexcitatory amino acid receptors in LH secretion in melatonin-implanted goats, or goats subjected to different levels of nutrition, is lacking.

Continuing our previous research (Zarazaga *et al.* 2011a), the present research assesses the interaction between the nutritional level and melatonin implants on the regulation of LH secretion by the endogenous opioid, dopaminergic, serotonergic and NMDA systems in melatonin-implanted Mediterranean goats maintained under a long-day photoperiod.

Materials and Methods

Study conditions

All procedures were performed by trained personnel in strict accordance with Spanish guidelines for the protection of experimental animals (RD 1201/2005) and in agreement with European Union Directive 86/609. The study was conducted at the University of Huelva experimental farm (latitude 37° 15'N), which meets the requirements of the European Community Commission for Scientific Procedure Establishments (1986).

Animals, nutrition, photoperiod and melatonin treatments

The study animals were 48 adult female goats. All were ovariectomised 1 month before beginning the experiment and simultaneously implanted subcutaneously with a 3.0 cm Silastic implant (internal diameter 3.3 mm and external diameter 4.6 mm; Karsch *et al.* 1973) containing crystalline oestradiol (Sigma–Aldrich Chemical Co.). These implants were soaked in physiological serum before insertion to prevent an initial peak of steroid release.

The experiment had a 2×2 factorial design (two nutrition levels, plus implantation – or not – of exogenous melatonin). Doses assigned to two experimental groups were based on the provision of nutrition balanced for live weight (LW) and BCS (Hervieu *et al.* 1991). The members of the high-nutrition group (group H; *n*=24) were fed 700 g concentrate and 500 g barley straw each day, while the members of the low-nutrition group (group L; *n*=24) received 350 g concentrate and 500 g barley straw. These amounts correspond to a daily intake of 0.78 milk fodder units (UFL) and 100 g digestible protein (group H) and 0.49 UFL and 50 g digestible protein (group L), providing 1.1 and 0.7 times the maintenance requirements of a goat with an LW of 50 kg at the beginning of the experiment, according to the INRA standards (Morand-Fehr & Sauvant 1988). The concentrate was offered once a day, distributed individually; the barley straw was distributed loosely to each group. The concentrate was a commercial mixture of maize (26.3%), beans (20%), oats (14.1%), cotton-seed (13.7%), peas (13.4%), lupin (7.3%), barley (0.2%), wheat (0.2%), sunflower seeds (0.2%) and a commercial mineral–vitamin complement (4.6%). All the animals had free access to water and mineral blocks containing trace elements and vitamins.

Both groups were housed in a lightproof building under artificial lighting where they were exposed for 9 months to alternations between 3 months of long days (16 h of light/day; lights-on: 0700 h, lights-off: 2300 h) and 3 months of short days (8 h of light/day; lights-on: 0700 h, lights-off: 1500 h). The first 3 months of controlled photoperiod (long days, started on September 14th) was necessary for the animals to adapt to the experimental conditions. The next 3 months (short days) were deemed necessary to ensure that the animals were able to respond to a stimulatory photoperiod prior to melatonin insertion. The final phase of long days was required before melatonin could be implanted.

At the end of the second period of long days (June 14th), each nutritional group was divided into two subgroups, i.e. those that received a melatonin implantation (18 mg; Melovine, CEVA Salud Animal, Barcelona, Spain) at the base of the left ear (M) and those that did not (C): HM (*n*=12) and HC (*n*=12), and LM (*n*=12) and LC (*n*=12). After the implantation procedure, all animals were maintained under a long-day photoperiod to ensure that the positive effect of the melatonin implants on LH secretion was due to exogenous melatonin.

Sampling and measurements

The effect of photoperiod treatments on neuroendocrine LH activity was assessed through monitoring long-term plasma LH variations, collecting blood samples twice per week by jugular venipuncture at 0930 h. The samples were immediately centrifuged for 30 min (3000 g) and the plasma stored at –20 °C until use. The time of onset of LH secretion after melatonin implantation was determined for each animal as differing from the baseline by more than 3 s.d. The baseline

was defined as the mean value of the samples obtained from May 2 until June 13 – the period with the lowest LH concentrations (Fig. 1). The LW and BCS of all animals were recorded weekly.

To evaluate the melatonin concentrations induced by the implants, five weekly blood samples were taken from each goat during the light phase, starting 1 week after melatonin implantation.

Drugs

Antagonists to opioid receptors (naloxone), dopaminergic₂ receptors (pimozide), serotonin 5HT₂ receptors (cyproheptadine) and an agonist of neuroexcitatory amino acid receptors (NMDA) were administered at different time points during the stimulation of LH secretion by the melatonin implantation. Naloxone hydrochloride (Sigma–Aldrich Chemical Co.) was dissolved in 0.9% (w/v) sterile saline at a concentration of 4.8 mg/ml. Pimozide (Sigma–Aldrich Chemical Co.) was dissolved in 0.1 M tartaric acid at a

concentration of 3 mg/ml. Cyproheptadine hydrochloride sesquihydrate (Sigma–Aldrich Chemical Co.) was dissolved in 50% ethanol–propanediol at a concentration of 25 mg/ml. NMDA, comprising a mixture of D and L isomers (Sigma–Aldrich Chemical Co.), was dissolved in 0.9% sterile and apyrogenic saline at a concentration of 5 mg/ml. Each drug was dissolved <3 h before i.v. injection and stored at room temperature until use. All drugs were administered as a bolus into the jugular vein through a catheter.

Drug challenges

Preliminary experiment: NMDA dose–response curve A dose–response curve for the effect of NMDA on LH secretion was created in a preliminary experiment to determine the dosage to be used in the main experiment. This preliminary work was performed on three animals of group H (before randomisation for implantation). LH secretion in these animals was inhibited by exposure to 70 long days (16 h light:8 h darkness cycle) during the second period of long days. Three doses were tested at 48 h intervals on the same animals (1, 2 and 4 mg/kg BW) in increasing order. LH secretion was assessed in serial samples of jugular blood obtained every 10 min during the hour preceding the injection, and every 10 min for 2 h thereafter.

For the other drugs, doses similar to those used by Zarazaga *et al.* (2011a) were given: 2 mg/kg, and originally 0.6 and 0.6 mg/kg LW for naloxone, pimozide and cyproheptadine respectively. The latter two doses were reduced by 0.15 mg/kg since ataxia and akinesia symptoms were seen in 20% of the animals 3 h after the 0.6 mg/kg pimozide injection, and respiratory depression was observed in about 40% of animals after the 0.6 mg/kg cyproheptadine injection. No correlation was seen between these side effects and the LH responses to drug treatments.

Main experiment: the effects of naloxone, pimozide, cyproheptadine and NMDA on LH release in goats at different time points following melatonin implantation

The first drug challenge was given during the inhibition of LH secretion by long days before the melatonin implantation (day –1). The second challenge was given before the onset of LH increase, on day 30. The third challenge was given when LH secretion was stimulated by the melatonin implantation, on day 45. At each time, all goats of each subgroup (HC, HM, LC and LM) were distributed in balanced ‘drug groups’ according to the LW and BCS. Each animal, from each ‘drug group’, received naloxone and then NMDA after 5 days ($n=6$), or cyproheptadine and then pimozide after 5 days (using the other six females), the 5-day period allowing for washout of the previously administered drug. Drugs were always administered in the same order. As a consequence, each goat of each subgroup received two drugs, naloxone and NMDA or cyproheptadine and pimozide. During all drug challenges, blood samples were collected via jugular catheter at 10 min intervals 3 h before (control period)

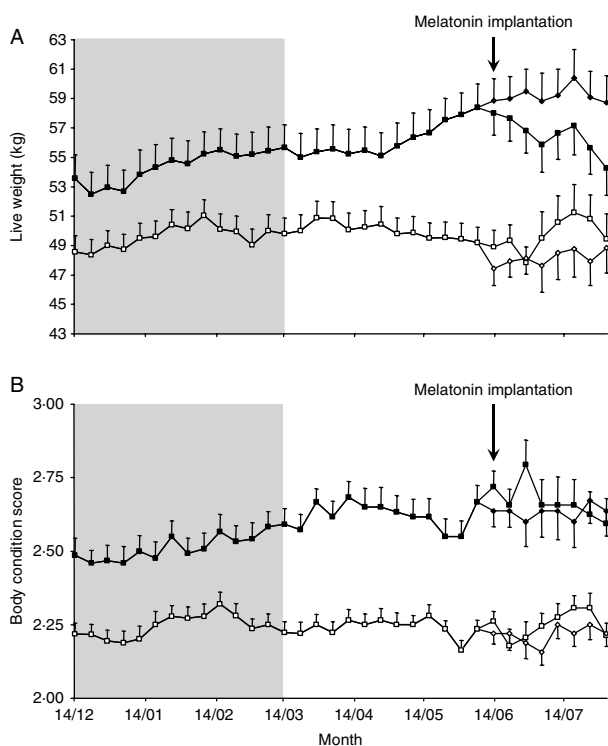


Figure 1 Changes (mean \pm S.E.M.) in live weight (A) and body condition score (B) in Mediterranean female goats subjected to alternations of 3 months of short days and 3 months of long days that received 1.1 (solid symbols, $n=24$) or 0.7 (open symbols, $n=24$) times their maintenance requirements, respectively, and that were implanted (filled square, $n=12$; open square, $n=12$) or not (filled diamond, $n=12$; open diamond, $n=12$) with melatonin (14/06). Shaded areas indicate the months when animals were exposed to short days.

and 3 h after (drug period) the i.v. injection of the drug or corresponding vehicle (controls). The sampling periods started at 0900 h and finished at 1500 h.

Hormone assays and LH pulse identification

Plasma LH concentrations were determined using double antibody ELISA, as described by Faure *et al.* (2005). The sensitivity of the assay was 0.1 ng/ml. The intra- and inter-assay coefficients of variation (CV) in the control were 6.5 and 3.0% respectively. All samples from the same challenge were measured in the same assay.

LH pulses were defined according to Baird *et al.* (1981) as the point with two consecutive values higher than the two preceding ones, with the highest value (pulse amplitude) exceeding the mean baseline value by at least four times the CV of the assay.

Plasma melatonin concentrations were measured by RIA in duplicate aliquots of 100 µl blood plasma (Fraser *et al.* 1983), using the antibody first raised by Tillet *et al.* (1986). The sensitivity of the assay was 4 pg/ml. The intra-assay CV was 5.83%.

All hormonal analyses were conducted at the hormone analysis laboratory at the Centre INRA de Tours, Nouzilly, France.

Statistical analysis

The data obtained during the first 3 months of the study (September 14th to December 14th) were excluded from the statistical analysis since they referred to the period needed by the animals to adapt to the sheds and nutritional treatments. The effects of nutrition on LW and BCS (measured weekly) and LH concentrations (measured twice weekly) were analysed using one-way ANOVA (nutritional treatments: groups H or L) with time as a repeated measure. Two-way ANOVA was used to determine the effect of nutrition plus melatonin treatment on LH secretion, with time as a repeated measure.

The mean LH concentrations and mean LH pulse frequencies and amplitudes in the drug treatments were calculated for each pre- and post-administration period. Due to the non-parametric nature of the LH pulse frequency, a Wilcoxon test was performed for between-dose comparisons of the effect of NMDA on the number of LH pulses. The effects of the treatments on mean LH concentration were analysed using a paired *t*-test (pre- vs post-injection periods).

Mean LH concentrations during the pre- and post-injection periods at each time point in the stimulation of the LH secretion by the melatonin treatment (−1, 30 and 45 day after melatonin insertion) were compared using ANOVA, with drug (naloxone, pimoizide, cyproheptadine or NMDA), nutrition level (H or L), melatonin implantation (or not) and time as repeated measures. The Tukey test was performed when differences between drug treatments were significant. After ANOVA, the effect of the drug treatments

on mean LH concentration were analysed using a paired *t*-test (pre- vs post-injection periods) at each time point before and after melatonin implantation, and for each nutritional group.

Due to the non-parametric nature of LH pulse frequency, the Kruskal–Wallis ANOVA test was used to examine the differences between the HL, HM, LC and LM subgroups before drug injection. After ANOVA, the effects of drug treatments on the number of LH pulses were analysed using the Wilcoxon test (pre- vs post-injection periods) for each time point studied before and after melatonin implantation, and for each drug before and after its administration within each nutritional subgroup.

Significance was set at $P < 0.05$. All calculations were performed using the SPSS package (Statistical Package for the Social Sciences 2008).

Results

LW and BCS

Before melatonin implantation, mean LW and BCS varied substantially over time in both group H and group L animals ($P < 0.05$; Fig. 1), but with mean LW and BCS higher in the former (55.9 ± 0.3 kg and 2.59 ± 0.01 vs 49.5 ± 0.3 kg and 2.23 ± 0.01). After melatonin implantation, LW, but not BCS, varied substantially over time in all groups (HC, HM, LC and LM; $P < 0.01$), although no effect of melatonin treatment on LW or BCS was seen, nor was any interaction between sources of variation and time observed ($P > 0.05$).

LH concentration profiles

Nutrition had a significant effect on LH secretion prior to melatonin implantation (0.65 ± 0.02 vs 0.45 ± 0.01 ng/ml for the H and L groups respectively; $P < 0.01$; Fig. 2).

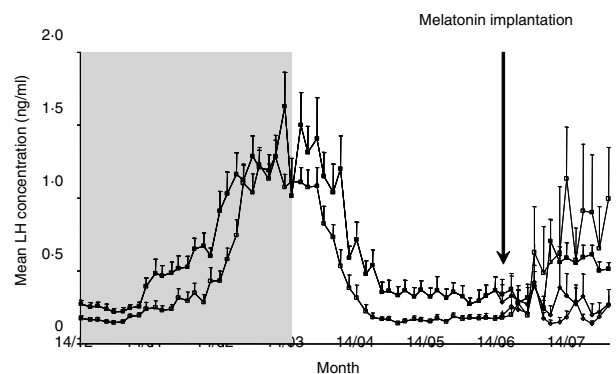


Figure 2 Changes (mean \pm S.E.M.) in plasma LH concentration (ng/ml) in Mediterranean female goats subjected to alternations of 3 months of short days and 3 months of long days that received 1.1 (solid symbols, $n=24$) or 0.7 (open symbols, $n=24$) times their maintenance requirements, respectively, and that were implanted (filled square, $n=12$; open square, $n=12$) or not (filled diamond, $n=12$; open diamond, $n=12$) with melatonin (14/06). Shaded areas indicate the months when animals were exposed to short days.

After melatonin implantation, LH concentrations increased ($P < 0.05$; Fig. 2). An interaction between nutrition and melatonin implantation ($P < 0.05$) affecting LH secretion was also observed; the LH concentration of the LM animals was clearly higher than that of the HM animals (Fig. 2).

The mean interval between melatonin implantation and the stimulation of LH secretion was 31.3 ± 3.4 days, with no differences seen between HM and LM animals. Only three goats from the HC and LC groups, which were maintained under long days, showed a slight increase in LH concentration.

Melatonin concentrations

Melatonin implantation had a clear effect on plasma melatonin concentration (227.1 ± 28.1 vs 4.2 ± 0.1 pg/ml for implanted and non-implanted animals respectively; $P < 0.01$). Neither nutrition nor the melatonin implantation by nutrition interaction had any effect on melatonin concentration ($P > 0.05$).

LH secretion response to NMDA dose (preliminary experiment)

The injection of NMDA caused an acute increase in LH secretion, characterised by a sustained and prolonged rise in plasma LH levels. This response was dose dependent ($P < 0.01$), with mean LH concentrations peaking at 1.1, 1.8 and 2.1 ng/ml for NMDA doses of 1, 2 and 4 mg/kg BW respectively. After injection of the highest dosage (4 mg/kg BW), LH secretion remained above baseline for more than 2 h. This dose was therefore used for the main experiment.

The effect of nutrition and drug treatment on LH secretion on day -1 before melatonin implantation

Figure 3 shows the differences between the pre- and post-injection periods for each nutritional treatment and drug.

Nutrition had a significant effect on mean LH concentration during the 3 h prior to drug injection (0.32 ± 0.01 vs 0.20 ± 0.01 ng/ml for the H and L groups respectively; $P < 0.05$) with no variations in concentration during this period irrespective of the drug vehicle injected as a control ($P > 0.05$). LH pulsatility was not modified by nutritional level during the pre-injection period ($P > 0.05$).

The NMDA treatment induced higher LH concentrations ($P < 0.001$; 0.73 ± 0.05 ng/ml) and pulsatility ($P < 0.05$) in both the L and H groups, especially in the former. Cyproheptadine increased LH concentration ($P < 0.01$) and pulsatility ($P < 0.05$) only in the H group animals.

The effect of nutrition, melatonin and drug treatment on LH secretion on day 30 after melatonin implantation

Figure 4 shows the differences in LH secretion between the pre- and post-injection periods for each nutritional subgroup (HM, HC, LM and LC) and drug.

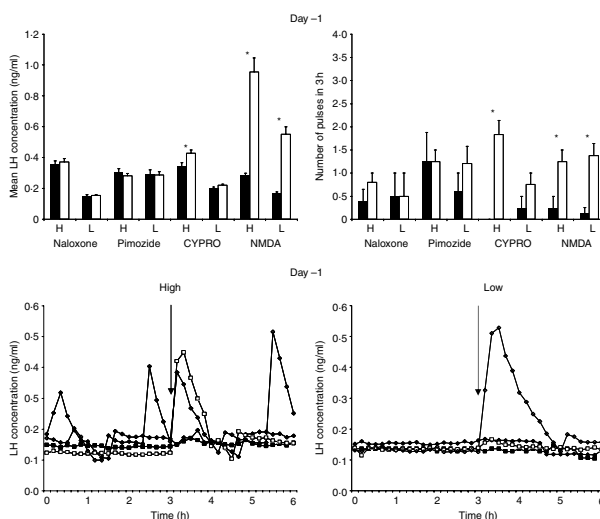


Figure 3 Effect of naloxone, pimoziide, cyproheptadine and NMDA on mean plasma LH concentrations (\pm s.e.m., top left panel) and on the mean number of LH pulses in the 3 h (\pm s.e.m., top right panel) period before (filled square) and after (open square) injection, on the day before melatonin insertion (day -1), into female Mediterranean goats that received 1.1 (H group, $n=24$) or 0.7 times their maintenance requirements (L group, $n=24$). Six goats per drug were used for each experimental group. A representative profile of an ovariectomised oestradiol-treated dose-administered naloxone (filled square), pimoziide (filled diamond), cyproheptadine (open square) or NMDA (open diamond) is shown at the bottom. The arrows indicate the time of the drug injection. * $P < 0.05$.

Prior to drug injection, no effect of nutrition was seen on LH secretion (a difference between the HC and LC groups was no longer observed due to the melatonin implantation by nutrition interaction). At this time, neither the melatonin implantation nor the drug vehicles, injected as controls, had any effect on LH secretion ($P > 0.05$). However, LH pulsatility was affected by nutritional level (0.52 ± 0.12 vs 1.23 ± 0.27 pulses for the H and L groups respectively; $P < 0.05$), but not by melatonin.

During the post-injection period, naloxone increased the LH concentration in the HM ($P < 0.01$) and LM animals ($P < 0.05$), and NMDA increased the LH concentrations in the HM and HC subgroups ($P < 0.01$). The injection of both naloxone and NMDA increased the mean number of LH pulses in the HM animals ($P < 0.05$).

The effect of nutrition, melatonin and drug treatments on LH secretion in goats on day 45 after melatonin insertion

Figure 5 shows the differences in LH secretion between the pre- and post-injection periods for each nutritional subgroup (HM, HC, LM and LC) and drug.

During the 3 h period prior to drug injection, no effect of nutrition on LH secretion was observed (again probably due to the melatonin implantation by nutrition interaction; $P > 0.05$), although both melatonin implantation (0.52 ± 0.02 vs 0.26 ± 0.01 ng/ml for the M and C groups

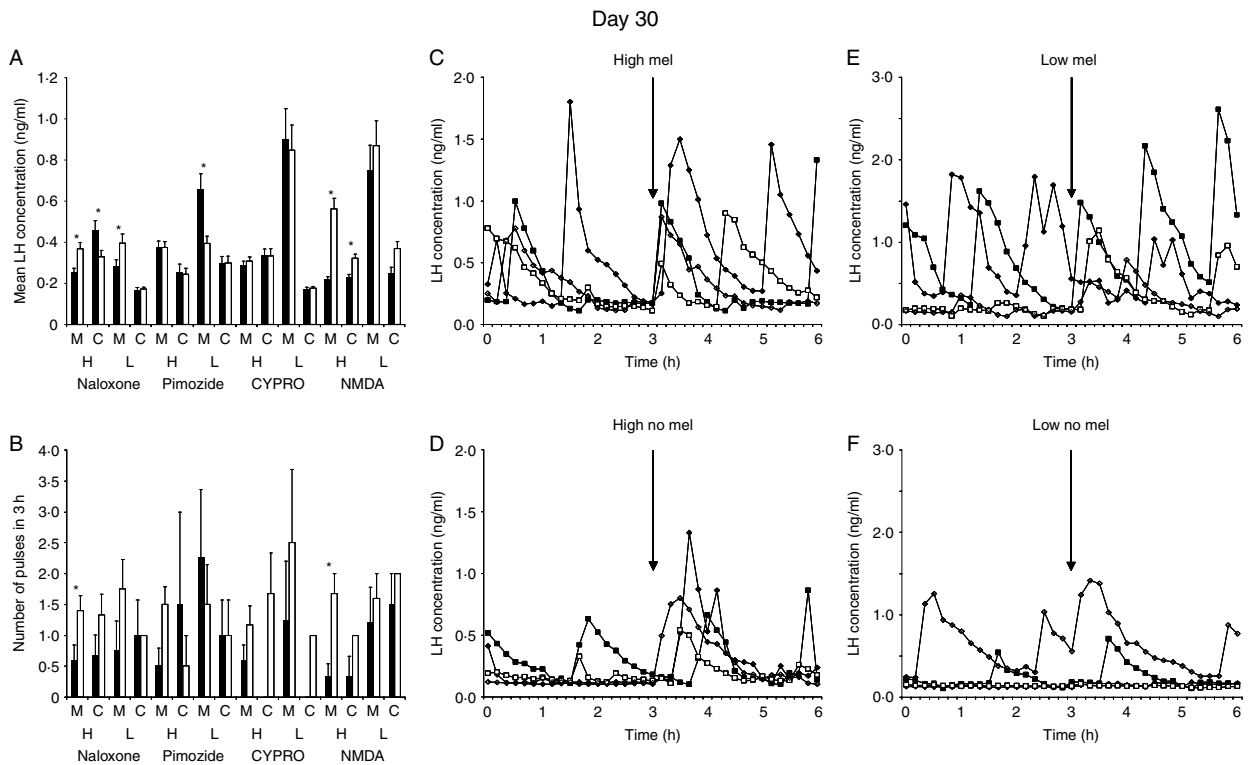


Figure 4 Effect of naloxone, pimozide, cyproheptadine and NMDA at 30 d after melatonin insertion on mean plasma LH concentration (\pm S.E.M., A), and on the mean number of LH pulses, in the 3 h (\pm S.E.M., B) period before (filled square) and after (open square) injection into female Mediterranean goats that received 1.1 (H group, $n=24$) or 0.7 times their maintenance requirements (L group, $n=24$), and that were implanted (M) or not (C) with melatonin. Six goats per drug were used for each experimental subgroup. A representative profile of an ovariectomised oestradiol-treated dose-administered naloxone (filled square), pimozide (filled diamond), cyproheptadine (open square) or NMDA (open diamond) is shown in C, D, E and F. The arrows indicate the time of the drug injection. * $P<0.05$.

respectively; $P<0.05$) and the melatonin implantation by nutrition interaction (0.32 ± 0.01 , 0.34 ± 0.02 , 0.70 ± 0.04 and 0.21 ± 0.01 ng/ml for the HM, HC, LM and LC groups respectively; $P<0.01$) had a significant effect. The different drug vehicles injected during this period as controls had no effect on LH secretion either ($P>0.05$). However, LH pulsatility was affected by the level of nutrition (0.80 ± 0.15 vs 1.33 ± 0.18 pulses for the H and L groups respectively; $P<0.05$) and melatonin implantation (1.30 ± 0.16 vs 0.70 ± 0.15 pulses for the M and C groups respectively; $P<0.05$).

Naloxone only increased the LH concentration in the HM group ($P<0.05$). Cyproheptadine increased LH concentrations in the HM and HC groups ($P<0.01$). NMDA clearly increased LH concentrations in all experimental groups ($P<0.01$). However, LH pulsatility was only increased by cyproheptadine in the HM and HC groups ($P<0.05$).

Discussion

In this study, before the implantation of melatonin, the lower level of nutrition induced a reduction in the mean LH concentration independent of the photoperiod, as reported in

previous work by our group (Zarazaga *et al.* 2011a). These results help explain earlier findings that a low BCS induced by a low level of nutrition (De Santiago-Miramontes *et al.* 2009), or a maintenance level of nutrition compared to a higher level of nutrition (Zarazaga *et al.* 2005), induced a longer seasonal anoestrus as a result of an earlier onset of the anovulatory period. The reason for this may be that, as seen in this study, hypothalamic–pituitary activity is diminished in animals with reduced levels of nutrition. This reduction in LH associated with a lower nutritional level contrasts with that reported by Meza-Herrera *et al.* (2008), who suggest that the increased ovarian activity observed with undegradable protein supplementation, and in goats with better body conditions, is not the result of changes in LH or GH. Rather these authors suggest an effect at local level caused by changes in insulin in a non-GNRH-gonadotrophin-dependent manner. The reason for this discrepancy could be that these authors studied LH concentrations only around the periovulatory period. Similarly, Kouakou *et al.* (2008), working with dairy bucks subjected to underfeeding and refeeding, observed that neither underfeeding nor the transition to *ad libitum* feeding affected LH concentrations. Moreover, in this study, the LH concentrations observed before melatonin implantation were

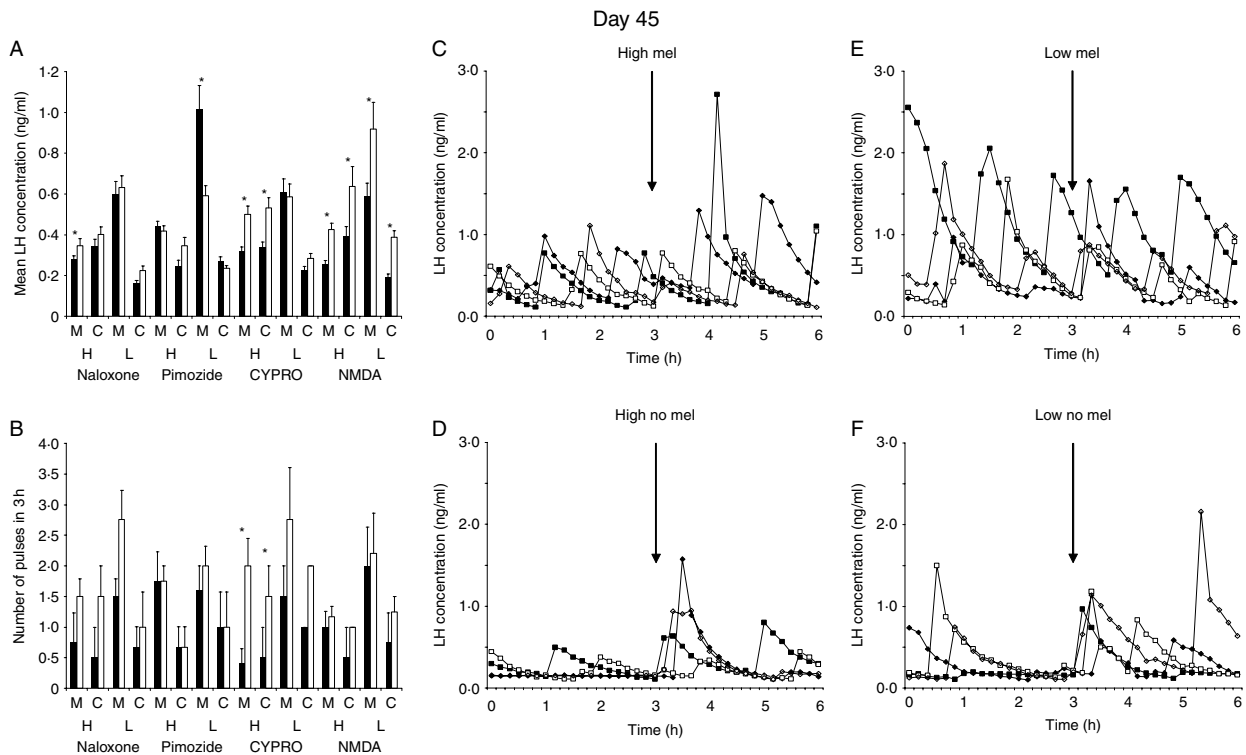


Figure 5 Effect of naloxone, pimozide, cyproheptadine and NMDA at 45 d after melatonin insertion on mean plasma LH concentration (\pm S.E.M., A), and on the mean number of LH pulses, in the 3 h (\pm S.E.M., B) period before (filled square) and after (open square) injection into female Mediterranean goats that received 1.1 (H group, $n=24$) or 0.7 times their maintenance requirements (L group, $n=24$), and that were implanted (M) or not (C) with melatonin. Six goats per drug were used for each experimental subgroup. A representative profile of an ovariectomised oestradiol-treated dose-administered naloxone (filled square), pimozide (filled diamond), cyproheptadine (open square) or NMDA (open diamond) is shown in C, D, E and F. The arrows indicate the time of the drug injection. * $P<0.05$.

similar to those described in OVX + E Mediterranean goats (Zarazaga *et al.* 2011a), confirming that, in caprines at this latitude, the photoperiod is the main environmental factor controlling pituitary activity but that nutrition is an important modulator of LH secretion.

After melatonin implantation, the LH concentration increased and the onset of pituitary activity was earlier than in non-implanted females. The period between implantation and the activation of pituitary activity (31.3 ± 3.4 days) was similar to that recorded in previous work when melatonin was implanted at the spring equinox (30.33 ± 10.17 days; Zarazaga *et al.* 2009) or after a long-day photoperiod treatment (29.7 ± 10.2 days; Zarazaga, Gatica, Celi, Guzmán unpublished data), but shorter than that described by Chemineau *et al.* (1986) who observed no ovulation after a period of 70 short days. This discrepancy is probably due to breed differences and/or lactation influences. The present results also contrast with those obtained in sheep, in which melatonin implantation around the spring equinox does not induce reproductive activity during seasonal anoestrus in OVX + E females that have no contact with males (Forcada *et al.* 2002), or in intact females in contact with males (Forcada *et al.* 1995).

The melatonin implantation by nutrition interaction had a significant effect on LH secretion. To our knowledge, this is the first report of such an observation in goats. However, in sheep, this interaction (Robinson *et al.* 1991, Forcada *et al.* 1995), and the BCS by melatonin implantation interaction (Rondón *et al.* 1996) have been reported to affect ovulation rate. All these authors report the enhancing effect of melatonin implantation on the ovulation rate to be more pronounced in ewes with a low, rather than a high, feed intake. The practical implications of this interaction could be important in induced reproductive activity during seasonal anoestrus in goats that have suffered reduced food availability.

On the day before melatonin implantation, during the inhibition of LH secretion by the long-day photoperiod, differences were seen in response to the drug challenges compared to that previously reported by our group (Zarazaga *et al.* 2011a). In our earlier study, pimozide and cyproheptadine increased the LH concentration during the inhibition of LH by long days, but in this study, pimozide had no such effect. The reason for this discrepancy might be that, in the present experiment, the injected doses of both pimozide and cyproheptadine were smaller than those in the previous study by 0.15 mg/kg.

The response to the naloxone injection before melatonin implantation suggests that endogenous opioids are not involved in the inhibition of LH secretion by long days since no response was observed, as previously reported (Zarazaga *et al.* 2011a). The injection of NMDA increased the LH concentration in both the H and L groups, indicating that nutritional level does not modify the response to EAA and that this mechanism is involved in LH secretion during the period of its photo-induced inhibition (Lincoln & Wu 1991).

On day 30 after melatonin implantation, naloxone increased LH secretion irrespective of the level of nutrition, and on day 45 in the HM subgroup. In a previous study (Zarazaga *et al.* 2011a), in goats exposed to alternations of 3 months of long days and 3 months of short days, increases in LH were also seen, although the drug challenge was given at 55 days after the onset of short days. The present results suggest that stimulation by the endogenous opioid system might occur earlier in well-nourished females or that melatonin implantation more strongly represses the opioid mechanism that inhibits LH secretion than that achieved by artificial short days. In support of this, in ewes, Misztal & Romanowicz (2005) observed that the stimulatory effect of melatonin or naloxone on LH secretion was more effective when they were infused intracerebroventricularly in combination. A possible explanation is that the secretion of GNRH/LH in response to the exclusion of the inhibitory tone of endogenous opioids becomes intensified by melatonin at the cellular level. Certainly, studies on the pars tuberalis cells have revealed that cAMP is dramatically elevated following simultaneous treatment with adenylate cyclase activators and melatonin (Hazlerigg *et al.* 1994, Barrett *et al.* 2003). Melatonin can induce a sensitised response to adenylate cyclase in ovine *pars tuberalis* cells, in which the receptor for melatonin is endogenously expressed (Barrett *et al.* 2003). This mechanism is, however, not fully understood. Nevertheless, the increase in the release of LH, evoked by melatonin under the conditions of exclusion of inhibitory opioid tone, reflects the potent induction of gonadotrophic axis activity. Nevertheless, Yang *et al.* (1989) failed to elevate LH concentration after the injection of WIN-3, an opioid antagonist, into melatonin-implanted or non-implanted control sheep at 5, 15 or 25 days after melatonin implantation. Indeed, at 60 days, they only achieved significantly enhanced LH secretion in three melatonin-implanted ewes showing ovarian cyclicity. These authors suggest that melatonin *per se*, at least at a level sufficient to advance the breeding season, is unlikely to induce reproductive cyclicity by initially switching LH control to an opioid-mediated system.

The lack of effect of pimozide at days 30 and 45 after melatonin implantation agrees with that described in goats exposed to alternations of 3 months of long days and 3 months of short days (Zarazaga *et al.* 2011a). These results contrast with previous findings by Forcada *et al.* (2002), who observed an increase in LH pulsatility in both high- and low-nutrition OVX + E ewes treated with melatonin. This might indicate differences between sheep and goats in relation to the

role of the dopaminergic system on regulation of the LH secretion in melatonin-implanted females.

The positive effect of cyproheptadine on day 45 after melatonin implantation on the HM and HC subgroups indicates that the negative effect of serotonin mechanism on LH secretion is reduced when stimulation of LH secretion by good nutrition levels occurs, independent of melatonin implantation. No evidence was found to support the hypothesis that the influence of melatonin on advancing the breeding season might occur via a serotonergic pathway. Moreover, these results agree with those previously reported by our group (Zarazaga *et al.* 2011a) when cyproheptadine was injected 55 days after the onset of short days. This procedure was only effective at inducing an increase in LH secretion in well-nourished animals. This suggests that the lower hypothalamic sensitivity to the negative feedback effects of oestradiol in goats receiving higher levels of nutrition is mediated, at least during the above 45 and 55 short day periods, by the serotonergic system.

The injection of NMDA acutely stimulated LH secretion in both the HC and the HM dose 30 days after melatonin implantation, and in all subgroups at 45 days. This suggests that, contrary to that described in sheep (Lincoln & Wu 1991, Vigiúé *et al.* 1995b), EAA are involved in LH secretion during periods of both photostimulation and photoinhibition. In fact, NMDA had a significant effect each time it was administered. The origin of this discrepancy between goats and sheep may be double. First, this mechanism may act in a different manner in ewes and goats, and secondly, Vigiúé *et al.* (1995b) studied the effect of NMDA in OVX + E ewes at 39 and 74 days after melatonin implantation – later than in the present experiment. In bucks, Meza-Herrera *et al.* (2007a) observed no effect on LH secretion of injecting L-glutamine three times per week during increasingly long days. In pre-pubertal goats, it has been shown that the injection of L-glutamine induces the earlier onset of puberty (Meza-Herrera *et al.* 2007b). According to the present results, the absence of any effect of NMDA on LH secretion in either the LM and the LC animals 30 days after melatonin implantation suggests that these EAA neurotransmitters are strongly inhibited by nutrition at this time. Finally, the positive effect observed at 30 days in both the HM and the HC animals, and at 45 days in all subgroups, provides no evidence to support the hypothesis that the influence of melatonin in advancing the breeding season may occur via a glutamatergic pathways.

Conclusions

To our knowledge, this is the first study to report results on the role of nutrition and the different neural mechanisms involved in the stimulation of LH secretion by exogenous melatonin in goats. The results provide evidence of a clear interaction between nutrition and melatonin and throw light on how the potential neural systems involved in the stimulation of LH secretion by melatonin are modulated by

nutritional level. Endogenous opioid receptors seem to be involved in this since the injection of naloxone increased LH concentrations only in melatonin-implanted animals. However, the serotonergic mechanism, as evidenced by the results of the cyproheptadine injection, appears to be most influenced by nutritional level since a clear response was observed 45 days after the moment of melatonin implantation in those animals that received 1.1 times their nutritional maintenance requirements, irrespective of whether they received melatonin or not. Further, the role of dopaminergic mechanisms would seem to be very small when LH is stimulated by exogenous melatonin. Finally, the stimulation of LH secretion by NMDA is strong in goats implanted with melatonin and maintained under photoperiod conditions that inhibit LH secretion. No evidence was found to support the hypothesis that the influence of melatonin in advancing the breeding season may occur via a glutamatergic pathway.

Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Funding

This study was supported by Grant AGL2006-01426 from the C.I.C.Y.T. (Spain).

Author contribution statement

J L G and B M contributed actively in valuable discussion, drafted the paper and critically read the manuscript. I C contributed to the handling of the animals and recovering data. L A Z designed the study, analysed the data and wrote the paper.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Assay Laboratory of the *Station de Physiologie de la Reproduction et des Comportements* (INRA, Nouzilly, France) for undertaking the LH and melatonin assays. The authors are also grateful to CEVA Salud Animal, Barcelona, Spain, for providing Melovine implants. We also thank A Burton for revision of the English manuscript.

References

Anderson ST, Sawangjaroen K & Curler JD 1997 A method for drug infusion into the lateral median eminence and arcuate nucleus of sheep. *Journal of Neuroscience Methods* **71** 169–176. (doi:10.1016/S0165-0270(96)00139-2)

Baird DT, Swanston IA & McNeilly AS 1981 Relationship between LH, FSH and prolactin concentration and the secretion of androgens and estrogens by the preovulatory follicle in the ewe. *Biology of Reproduction* **24** 1013–1025. (doi:10.1095/biolreprod24.5.1013)

Barrett P, Schuster C, Mercer J & Morgan PJ 2003 Sensitization: a mechanism for melatonin action in the pars tuberalis. *Journal of Neuroendocrinology* **15** 415–421. (doi:10.1046/j.1365-2826.2003.00988.x)

Bittman EL, Kaynard AH, Olster DH, Robinson JE, Yellon SM & Karsch FJ 1985 Pineal melatonin mediates photoperiodic control of pulsatile luteinizing hormone secretion in the ewe. *Neuroendocrinology* **40** 409–418. (doi:10.1159/000124106)

Chemineau P, Normant F, Ravault JP & Thimonier J 1986 Induction and persistence of pituitary and ovarian activity in the out-of-season lactating dairy goat after a treatment combining a skeleton photoperiod, melatonin and the male effect. *Journal of Reproduction and Fertility* **78** 497–504. (doi:10.1530/jrf.0.0780497)

De Santiago-Miramontes MA, Malpau B & Delgadillo JA 2009 Body condition is associated with a shorter breeding season and reduced ovulation rate in subtropical goats. *Animal Reproduction Science* **114** 175–182. (doi:10.1016/j.anireprosci.2008.09.001)

Estienne MJ, Schillo KK, Hileman SM, Green MA, Hayes SH & Boling JA 1990 Effect of *N*-methyl-D,L-aspartate on luteinizing hormone secretion in ovariectomized ewes in the absence and presence of estradiol. *Biology of Reproduction* **42** 126–130. (doi:10.1095/biolreprod42.1.126)

Faure MO, Nicol L, Fabre S, Fontaine J, Mohoric N, McNeilly A & Taragat C 2005 BMP-4 inhibits follicle-stimulating hormone secretion in ewe pituitary. *Journal of Endocrinology* **186** 109–121. (doi:10.1677/joe.1.05988)

Forcada F, Zarazaga L & Abecia JA 1995 Effect of exogenous melatonin and plane of nutrition after weaning on estrous activity, endocrine status and ovulation rate in Salz ewes lambing in the seasonal anestrus. *Theriogenology* **43** 1179–1193. (doi:10.1016/0093-691X(95)00090-U)

Forcada F, Lozano JM, Abecia JA & Zarazaga LA 1997 Control of luteinizing hormone secretion in ewes by endogenous opioids and the dopaminergic system during short seasonal anoestrus: role of plane of nutrition. *Animal Science* **65** 217–224. (doi:10.1017/S1357729800016520)

Forcada F, Abecia JA, Zúñiga O & Lozano JM 2002 Variation in the ability of melatonin implants inserted at two different times after the winter solstice to restore reproductive activity in reduced seasonality ewes. *Australian Journal of Agricultural Research* **53** 167–173. (doi:10.1071/AR00172)

Fraser SP, Cowen P, Franklin M, Franey C & Arendt J 1983 Direct radioimmunoassay for melatonin in plasma. *Clinical Chemistry* **29** 396–397.

Gazal S, Kouakou B, Amoah EA, Barb CR, Barrett JB & Gelaye S 2002 Effects of *N*-methyl-D,L-aspartate on LH, GH, and testosterone secretion bucks maintained under long or short photoperiods. *Journal of Animal Science* **80** 1623–1628.

Havern RL, Whisnant CS & Goodman RL 1994 Dopaminergic structures in the ovine hypothalamus mediating estradiol negative feed-back in anestrus ewes. *Endocrinology* **134** 1905–1914. (doi:10.1210/en.134.4.1905)

Hazlerigg DG, Hastings MN & Morgan PJ 1994 The recovery of ovine pars tuberalis cells from melatonin-induced sensitization is slow, protein synthesis-dependent phenomenon. *Journal of Endocrinology* **142** 127–138. (doi:10.1677/joe.0.1420127)

Hervieu J, Morand-Fehr P, Schmidely Ph, Fedele V & Delfa R 1991 Mesures anatomiques permettant d'expliquer les variations des notes sternaes, lombaires et caudales utilisées pour estimer l'état corporel des chèvres laitières. *Options Méditerranéennes* **13** 43–56.

Karsch FJ, Weick RF, Hotchkiss J, Dierschke DJ & Knobil E 1973 An analysis of the negative feedback control of gonadotropin secretion utilizing chronic implantation of ovarian steroids in ovariectomized rhesus monkeys. *Endocrinology* **93** 478–486. (doi:10.1210/endo-93-2-478)

Kouakou B, Gazal OS, Terrill TH, Kannana G, Gelaye S & Amoaha EA 2008 Digestibility, hormones and blood metabolites in dairy bucks subjected to underfeeding and refeeding. *Small Ruminant Research* **75** 171–176. (doi:10.1016/j.smallrumres.2007.10.002)

Le Corre S & Chemineau P 1993 Control of photoperiodic inhibition of luteinizing hormone secretion by dopaminergic and serotonergic systems in ovariectomized Ile-de-France ewes supplemented with oestradiol. *Journal of Reproduction and Fertility* **97** 367–373. (doi:10.1530/jrf.0.0970367)

Le Corre S, Segu L, Caldani M & Chemineau P 1994 Differences in ketanserin binding in the ventromedial hypothalamus of ewes responsive or refractory to short days. *Neuroendocrinology* **60** 589–600. (doi:10.1159/000126802)

- Lincoln GA & Wu FCW 1991 Luteinizing hormone response to N-methyl-D,L-aspartate during a photoperiodically-induced reproductive cycle in the ram. *Journal of Neuroendocrinology* **3** 309–317. (doi:10.1111/j.1365-2826.1991.tb00280.x)
- Meyer SL & Goodman RL 1985 Neurotransmitters involved in mediating the steroid dependent suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion in anestrus ewes: effects of receptor antagonists. *Endocrinology* **116** 2054–2061. (doi:10.1210/endo-116-5-2054)
- Meyer SL & Goodman RL 1986 Separate neural systems mediate the steroid-dependent and steroid-independent suppression of tonic luteinizing hormone secretion in the anoestrus ewe. *Biology of Reproduction* **35** 562–571. (doi:10.1095/biolreprod35.3.562)
- Meza-Herrera CA, López-García MA, López-Medrano JI, Torres-Moreno M & Salinas-González H 2007a Excitatory aminoacids, body condition, scrotal circumference and LH serie concentrations in male goats under long photoperiods. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas* **6** 205–210.
- Meza-Herrera CA, López-Medrano JI, Torres-Moreno M, Tinajero Pérez K, Mellado-Bosque M & González de Bulnes A 2007b Excitatory amino acid effects upon the onset of puberty in goats: quantification of progesterone as endocrine marker of puberty. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas* **6** 197–203.
- Meza-Herrera CA, Hallford D, Ortiz JA, Cuevas RA, Sanchez JM, Salinas H, Mellado M & González-Bulnes A 2008 Body condition and protein supplementation positively affect periovulatory ovarian activity by non LH-mediated pathways in goats. *Animal Reproduction Science* **106** 412–420. (doi:10.1016/j.anireprosci.2007.06.004)
- Misztal T & Romanowicz K 2005 Effective stimulation of daily LH secretion by the combined treatment with melatonin and naloxone in luteal-phase ewes. *Acta Neurobiologicae Experimentalis* **65** 1–9.
- Morand-Fehr P & Sauvant D 1988 Alimentation des caprins. In *Alimentation des Bovins, Ovins et Caprins*, pp 281–304. Ed. R Jarrige. Paris: INRA.
- Rhind SM 1992 Nutrition: its effect on reproductive performance and its control in female sheep and goats. In *Progress in Sheep and Goats Research*, pp 25–52. Ed. AW Speedy. Wallingford, UK: CAB International.
- Rhind SM, McMillen SR & McKelvey WAC 1991 Effects of levels of food intake and body condition on the sensitivity of the hypothalamus and pituitary to ovarian steroid feedback in ovariectomized ewes. *Animal Production* **52** 115–125. (doi:10.1017/S0003356100005742)
- Robinson JJ, Wigzell S, Aitken RP, Wallace JM, Ireland S & Robertson IS 1991 The modifying effects of melatonin, mm exposure and plane of nutrition on the onset of ovarian activity, ovulation rate and the endocrine status of ewes. *Animal Reproduction Science* **26** 73–91. (doi:10.1016/0378-4320(91)90067-A)
- Rondón Z, Forcada F, Zarazaga L, Abecia JA & Lozano JM 1996 Oestrous activity, ovulation rate and plasma melatonin concentrations in Rasa Aragonesa ewes maintained at two different and constant body condition levels and implanted or reimplanted with melatonin. *Animal Reproduction Science* **41** 225–236. (doi:10.1016/0378-4320(95)01451-9)
- Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 2008. SPSS Statistics Base User's Guide 17.0. Chicago: SPSS Inc. p. 640.
- Tillet Y, Ravault JP, Selve C, Evin G, Castro B & Dubois MP 1986 Conditions d'utilisation d'anticorps spécifiques pour la visualisation immunohistochimique de la sérotonine et de la mélatonine dans la glande pinéale du mouton. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* **303** 77–82.
- Vázquez MI, Forcada F, Casao A, Sosa C, Palacín I & Abecia JA 2009 Effects of melatonin and undernutrition on the viability of ovine embryos during anestrus and the breeding season. *Animal Reproduction Science* **112** 83–94. (doi:10.1016/j.anireprosci.2008.04.004)
- Vázquez MI, Forcada F, Casao A, Abecia JA, Sosa C & Palacín I 2010 Undernutrition and exogenous melatonin can affect the *in vitro* developmental competence of ovine oocytes on a seasonal basis. *Reproduction in Domestic Animals* **45** 677–684. (doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01329.x)
- Vigüé C, Caraty A, Locatelli A & Malpoux B 1995a Regulation of LHRH secretion by melatonin in the ewe. I. Simultaneous delayed increase in LHRH and LH pulsatile secretion. *Biology of Reproduction* **52** 1114–1120. (doi:10.1095/biolreprod52.5.1114)
- Vigüé C, Caraty A, Locatelli A & Malpoux B 1995b Regulation of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) secretion by melatonin in the ewe. II. Changes in N-methyl-D,L-aspartic acid-induced LHRH release during the stimulation of luteinizing hormone secretion by melatonin. *Biology of Reproduction* **52** 1156–1161. (doi:10.1095/biolreprod52.5.1156)
- Walkden-Brown SW, Restall BJ, Norton BW, Scaramuzzi RJ & Martin GB 1994 Effect of nutrition on seasonal patterns of LH, FSH and testosterone concentration, testicular mass, sebaceous gland volume and odour in Australian cashmere goats. *Journal of Reproduction and Fertility* **102** 351–360. (doi:10.1530/jrf.0.1020351)
- Yang KP, Lamming GE, Haynes NB & Brooks AN 1989 Failure of melatonin to influence endogenous opioid effects on LH secretion in the anoestrus ewe. *Journal of Reproduction and Fertility* **85** 397–403. (doi:10.1530/jrf.0.0850397)
- Zarazaga LA, Guzmán JL, Domínguez C, Pérez MC & Prieto R 2005 Effect of plane of nutrition on seasonality of reproduction in Spanish Payoya goats. *Animal Reproduction Science* **87** 253–267. (doi:10.1016/j.anireprosci.2004.11.004)
- Zarazaga LA, Gatica MC, Celi I, Guzmán JL & Malpoux B 2009 Effect of melatonin implants on sexual activity in Mediterranean goat females without separation from males. *Theriogenology* **72** 910–918. (doi:10.1016/j.theriogenology.2009.05.020)
- Zarazaga LA, Celi I, Guzmán JL & Malpoux B 2011a The role of nutrition in the regulation of LH secretion by the opioidergic, dopaminergic and serotonergic systems in female Mediterranean goats. *Biology of Reproduction* **84** 447–454. (doi:10.1095/biolreprod.110.086520)
- Zarazaga LA, Celi I, Guzmán JL & Malpoux B 2011b The response of luteinizing hormone secretion to photoperiod is modified by the level of nutrition in female Mediterranean goats. *Animal Reproduction Science* **126** 83–90. (doi:10.1016/j.anireprosci.2011.04.017)

Received in final form 5 August 2011

Accepted 6 September 2011

Made available online as an Accepted Preprint

8 September 2011

Artículo 4. Se corresponde con el objetivo 4.

Las concentraciones de melatonina en las dos venas yugulares, y su relación con la actividad reproductiva en caprino

Melatonin concentrations on the two jugular veins, and relationship with the seasonal reproductive activity in goats

Luis Ángel Zarazaga, Irma Celi, José Luis Guzmán, Benoît Malpoux

Theriogenology (2010) 74: 221-228.



ELSEVIER

Melatonin concentrations in the two jugular veins, and relationship with the seasonal reproductive activity in goats

L.A. Zarazaga^{a,*}, I. Celi^a, J.L. Guzmán^a, B. Malpoux^b

^a *Departamento de Ciencias Agroforestales, Universidad de Huelva, Carretera de Palos de la Frontera s/n, 21819, Palos de la Frontera, Huelva, Spain*

^b *Neuroendocrinologie Sexuelle, INRA-PRMD, URA CNRS 1291, 37380, Nouzilly, France.*

Received 11 September 2009; received in revised form 1 February 2010; accepted 5 February 2010

Abstract

The authors investigated whether melatonin concentrations vary between the two jugular veins and whether absolute (nocturnal) or relative (nocturnal/diurnal ratio) plasma melatonin concentrations are associated with seasonal reproductive activity measured by oestrus or ovulatory activity in Payoya goats. Thirty-two adult Payoya goats were penned under natural photoperiod. Oestrus activity was tested daily using aproned males—twice a week plasma was sampled for progesterone. Melatonin plasma concentrations were studied at each equinox and solstice of the year in jugular samples taken simultaneously by venipuncture. Nocturnal and diurnal plasma melatonin concentrations from each jugular vein were assessed in 3 and 2 plasma samples per goat, respectively, taken at hourly intervals in each period. No differences in melatonin concentrations between the two veins were observed, but there was a significant interaction ($P < 0.001$) between jugular vein and animal in nocturnal melatonin concentrations. There was no effect of sampling period on melatonin concentrations and the coefficient of correlation between sampling periods was very high. The analyses performed indicated that neither absolute nor relative melatonin concentrations were related with the dates of onset or end of ovulatory/oestrus activity. Therefore, we concluded that in goats (1) melatonin concentrations are highly variable between jugular veins in the same individual but not in the general population, (2) melatonin concentrations are highly repeatable for each individual, and (3) absolute and relative amplitudes of melatonin concentrations are not linked to the seasonal breeding activity in Mediterranean goats.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Goat; Melatonin; Jugular; Seasonality; Reproduction

1. Introduction

Reproductive activity in goats shows a clear annual pattern, with a period of breeding activity that begins in the late summer or autumn, when daylight is decreasing, and the onset of seasonal anoestrus in late winter or at the start of spring, with increasing daylight. This seasonal breeding cycle in goats is not directly driven by the photoperiod, rather it appears to be a reflection

of the expression of a self-sustained endogenous rhythm that is synchronised or entrained by the photoperiod [1]. The reproductive response to photoperiod is mediated by the pineal gland via changes in the daily secretion of its main secretory product, melatonin [2] that is read by a large variety of tissues in the whole organism [3].

After its synthesis, melatonin is secreted via the vasculature of the pineal that flows into the vein of Galen or vena cerebri magna. This cerebral vein drains into the sinus rectus, and venous blood is delivered to the internal jugular veins via the lateral sinus [4]. An

* Corresponding author. Tel.: +34 959217523; Fax: +34 959217304.
E-mail address: zarazaga@uhu.es (L.A. Zarazaga)

intriguing feature of melatonin concentrations in the blood is the existence of a high variability between individuals, as has been reported in sheep. A major component of this inter-individual variability is the size of the pineal gland [5]. Other components could originate from within—individual differences in melatonin concentrations between the two jugular veins, and/or random sampling one of the two jugular veins—as has been demonstrated in sheep [6].

Two main alternative hypotheses have been proposed to explain how nycthemeral melatonin secretion controls reproductive activity: the duration of the melatonin secretion, and the temporal phase of this rise relative to the light-dark cycle have both been considered [7–10]. For each hypothesis, the amplitude of melatonin secretion may play a specific role to modulate the response; it has been suggested that the ratio nocturnal/diurnal melatonin after implant insertion [11] or under natural conditions [12] could be related to the speed of resumption of ovulatory activity. A significant relationship between the mean nocturnal melatonin concentration and the intensity of seasonal breeding activity has also been reported in the female Italian buffalo [13]. Those authors observed that animals showing less tendency to seasonality presented lower levels of melatonin concentration during the night. However, Zarazaga et al. [14] have shown that neither absolute nor relative amplitude of melatonin concentrations is linked to the seasonal breeding activity in ewes. The literature contains very few results on the existence of a relationship between absolute or relative melatonin concentrations and seasonality in goats.

Thus, in the present study, we used goats to determine (1) whether there is a difference in melatonin concentrations between jugular veins sampled at different moments of the year, and (2) whether the dates of onset and end of the annual breeding season are linked to the melatonin concentrations.

2. Material and methods

2.1. Animals and management

This experiment was performed in accordance with the Spanish Animal Protection Policy RD1201/2005, which conforms to the European Union Directive 86/609 regarding the protection of animals used in scientific experiments.

The study was conducted at the experimental farm of the University of Huelva (latitude 37° 15'), which meets the requirements of the European Community Commission for Scientific Procedure Establishments

(1986). Thirty-two adult and non-pregnant Payoya goats, which had kidded at least 5 mo previously, were used.

Throughout the experimental period, the goats were kept permanently in communal yards with an uncovered area, and without any supplementary light. The animals were maintained under intensive management and were fed daily with lucerne hay, barley straw *ad libitum*, and commercial concentrate, according to INRA standards [15], to maintain adult weight. All animals had free access to water and mineral blocks containing trace elements and vitamins.

Oestrus activity was tested daily using entire aproned males. Females standing at mounting by the male were considered in oestrus. In order to determine the onset of ovarian activity, blood samples were collected twice a week from each animal by jugular venipuncture and assayed for progesterone. Immediately after collection, samples were centrifuged and the plasma was stored at -20°C until assay.

2.2. Sampling for melatonin determination

Nocturnal and diurnal melatonin plasma concentrations of the goats were assessed at each equinox and solstice of the year (“sampling periods”) (spring equinox: 20th March, summer solstice: 21st June, autumn equinox: 23rd September, and winter solstice: 21st December). Nocturnal melatonin plasma concentrations of goats were assessed in three plasma samples of each jugular vein, taken at hourly intervals during the night, starting 3 h after sunset (“time of collection”). Blood samples from the two jugular veins were obtained by venipuncture in evacuated tubes with heparin by two operators to ensure the simultaneity of sampling, and special care was taken to puncture precisely at the same level of the neck on the two sides. All goats were always sampled within 15–20 min, and the same order was maintained at each sampling time. Blood samples were collected under dim red light (less than 1 lux at 20 cm), avoiding any direct illumination of the eyes. Diurnal melatonin plasma concentrations were assessed in two plasma samples of each jugular vein, taken at hourly intervals, starting 4 h after sunrise. Plasma was immediately separated by centrifugation and stored at -20°C until assay.

2.3. Definitions of reproductive activity

Ovulatory activity was confirmed when four consecutive plasma samples had progesterone concentrations above baseline (1 ng/mL) with subsequent cyclicity. For each goat, the date of the last plasma progesterone

value below baseline that was continued by the first extended cyclic pattern was taken as the onset of ovulatory activity. Ovulatory activity was considered to have ceased when five or more consecutive plasma samples had concentrations below baseline. The date of the last plasma progesterone value below baseline at the completion of the last extended cyclic progesterone pattern was taken as the end of ovulatory activity.

The mean duration of oestrus cyclicity and the ovulatory season were defined as the number of days between the first and the last detected oestrus or the first and the last ovulation, respectively, in the same breeding season [16].

2.4. Hormone assays

Plasma progesterone concentrations were assayed by radioimmunoassay using the technique described by Terqui and Thimonier [17]. The sensitivity of the assay was 0.125 ng/mL. The intra- and interassay coefficients of variation were 7.6% and 8.7%, respectively.

Plasma melatonin concentrations were measured in duplicate aliquots of 100 microlitres of blood plasma by radioimmunoassay, using the technique described by Fraser et al. [18], with antibody first raised by Tillet et al. [19]. The sensitivity of the assay was 4 pg/mL. The intra- and interassay coefficients of variation were 18.8% and 14.2%, respectively.

Hormone assays were carried out at the Assay Laboratory of the Station de Physiologie de la Reproduction et des Comportements (INRA, Nouzilly, France).

2.5. Statistical analysis

Absolute and relative (night/day ratio) plasma melatonin concentrations per jugular and season were calculated for each goat. Night or day plasma melatonin concentrations were analysed first by a repeated-measure ANOVA to assess a possible interaction between “jugular side” and “time of collection” for each “sampling period”. The objective of this analysis was to assess a possible interaction between “jugular side” and “time of collection”. Since no interaction between “jugular side” and “time of collection” was observed, data were further analysed by a 3-way ANOVA (“jugular side”, “animal”, and “sampling period” as factors). A one-way ANOVA (“jugular side” as factor) was performed to identify animals that presented differences between jugular veins in the overall experiment as the mean of the four sampling periods. A one-way ANOVA (“night” and “day” as factor) was performed to study the overall differences between night and day melatonin concentrations.

To determine the repeatability of the melatonin concentrations a Pearson test was used between mean nocturnal melatonin concentrations for each sampling period and between melatonin concentrations from each jugular for each sampling period.

A Chi² test was performed to determine the potential existence of a non-uniform distribution in the cumulative percentage of animals that started their breeding season and those that ended it.

An analysis of variance was used to test the existence of a difference in absolute or relative melatonin concentrations between dates of onset and end of the reproductive activity. A correlation coefficient was calculated, using the Spearman test, between the dates of onset or end of reproductive activity or the duration of the ovulatory or the oestrus season and the nocturnal, diurnal, and relative plasma melatonin concentrations for each sampling period.

The relative difference between concentrations in the two jugular veins was quantified by a relative ratio equal to the difference between the left and right concentrations divided by the lowest one, and expressed as a percentage. A ratio of 100% means that the highest concentration is twice the lowest one.

3. Results

3.1. Effect of jugular vein and sampling period on melatonin concentrations

Diurnal melatonin concentrations were lower (5.1 ± 0.1 vs. 5.2 ± 0.1 pg/mL, right and left jugular veins, respectively) than nocturnal melatonin concentrations (65.6 ± 2.7 vs. 55.8 ± 2.3 pg/mL, right and left jugular veins, respectively) ($P < 0.001$) in a similar way in each jugular vein.

The mean nocturnal and diurnal melatonin concentrations for each sampling period and for overall samples were not affected by the sampled jugular vein or the sampling period ($P > 0.05$). However, there was a significant effect of the animal used in the study ($P < 0.05$) in diurnal or nocturnal melatonin concentrations. In the same analysis, interaction between jugular vein and animal was observed in nocturnal melatonin concentrations ($P < 0.001$). Figure 1 shows the distribution of animals with respect to the relative side-related difference in melatonin concentration. In 47.1% of the animals, the relative difference between jugular veins was greater than 100% (i.e., the highest concentration was at least twice the lowest one), and in 73.5% of the goats this difference was greater than 50%.

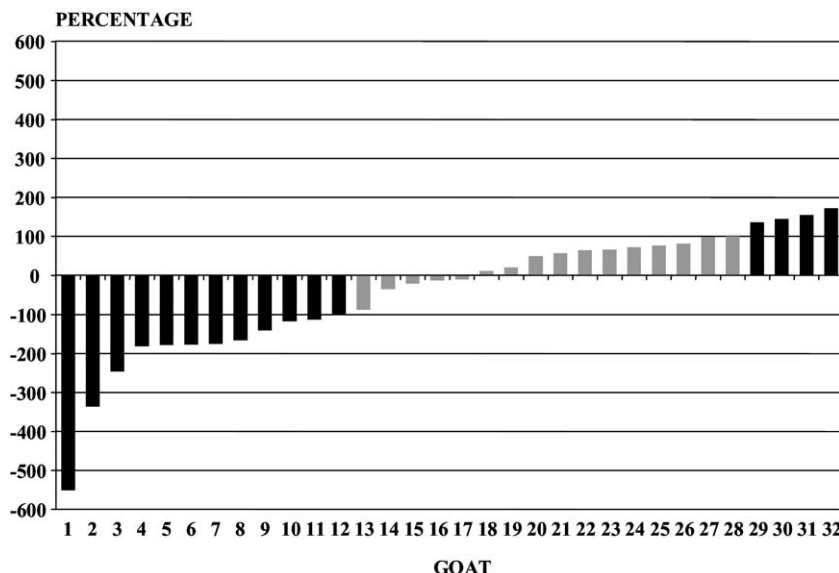


Fig. 1. Distribution of the mean relative difference for each goat in melatonin concentrations between the two jugular veins in entire Payoya goats. The relative difference is equal to the difference between left and right jugular veins divided by the lowest one, and expressed as a percentage. Solid bars indicate relative differences higher than 100% between left and right jugular veins, i.e., the concentration on the higher side was at least twice as high as on the opposite side.

The one-way ANOVA revealed that in 18 goats (53% of the animals) melatonin concentrations were significantly different (at least $P < 0.05$) between jugular veins. The relative difference between jugulars averaged $126.0 \pm 14.7\%$ for all individuals, and ranged from 0.1% to 1142.2%.

Table 1 shows the Pearson coefficients of correlation between the right and left jugular nocturnal melatonin concentrations and between periods. In general, it was observed that the highest significant ($P < 0.01$) correlation coefficients were between the melatonin concentrations in the same jugular vein for each sampling period. However, the coefficients between melatonin concentrations in different jugular veins for the same

sampling period or even for different sampling periods were lower, and in general non-significant.

3.2. Correlation between melatonin concentrations and onset or end of reproductive activity

Figure 2 shows the cumulative percentage of animals that started the breeding season or stopped it. The changes in the cumulative percentage for the onset of ovulatory activity occurred significantly faster than a uniform distribution ($P < 0.001$). The distribution of the onset of oestrus activity and the end of the breeding season was not different from a uniform one. No differences in absolute or relative melatonin concentra-

Table 1
Correlation coefficient between the mean nocturnal melatonin concentrations from each jugular vein (right or left) in each sampling period (spring equinox, summer solstice, autumn equinox, and winter solstice) in entire Payoya goats.

	Right spring	Right summer	Right autumn	Right winter	Left spring	Left summer	Left autumn
Right Summer	0.82†						
Right Autumn	0.62†	0.60†					
Right Winter	0.73†	0.67†	0.67†				
Left Spring	0.17	0.07	0.14	0.12			
Left Summer	0.45*	0.44*	0.23	0.40*	0.62†		
Left Autumn	0.23	0.30	0.23	-0.01	0.53†	0.52†	
Left Winter	0.51†	0.35	0.09	0.17	0.64†	0.71†	0.57†

* $P < 0.05$.

† $P < 0.01$.

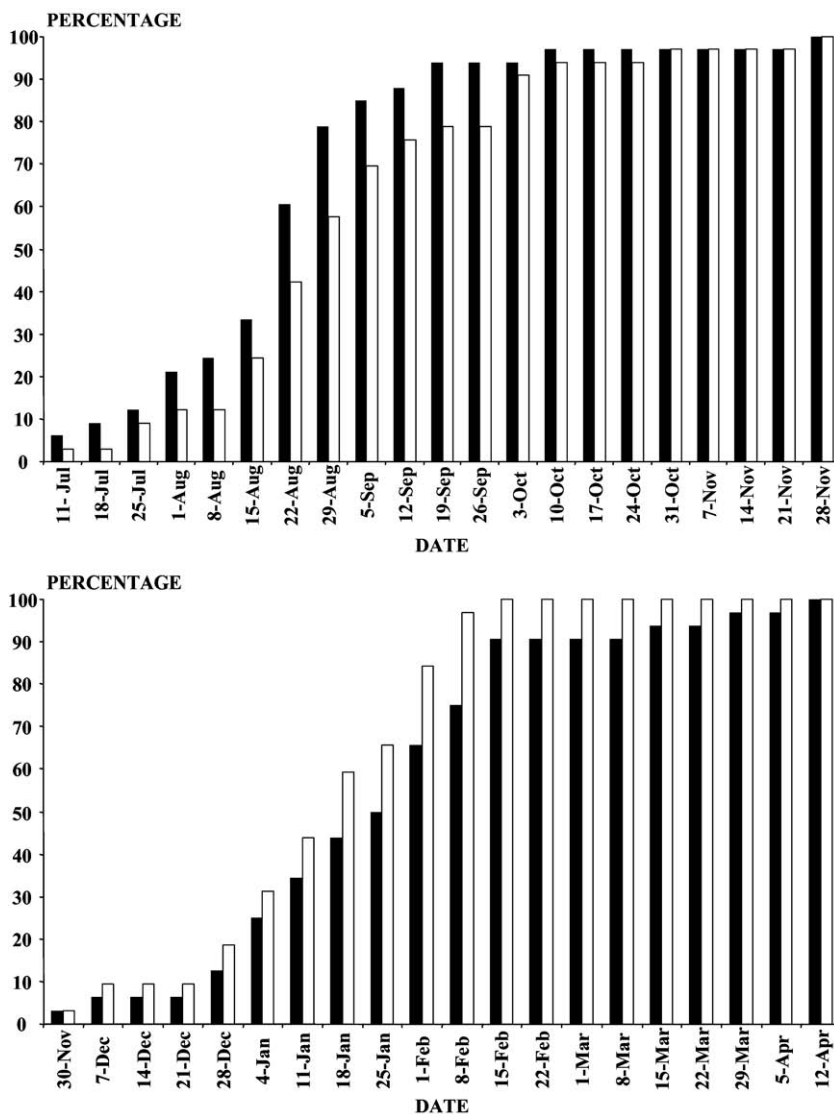


Fig. 2. Distribution of the cumulative percentage of animals starting the breeding season (upper) (first ovulatory activity (solid bars) and first oestrus activity (open bars)) and stopping it (lower) (last ovulatory activity (solid bars) and last oestrus activity (open bars)).

tions were observed between dates of first or last oestrus/ovulatory activity.

The Spearman coefficients of correlation between the first ovarian or oestrus activity, the last ovarian or oestrus activity, the duration of the ovulatory or the oestrus season and the nocturnal melatonin concentrations or the ratio nocturnal/diurnal melatonin concentration determined that all but one correlation coefficient did not significantly differ from zero; there was only one negative coefficient of correlation between the mean plasma melatonin concentrations during the night from both solstices and the first detected oestrus ($r = -0.36, P < 0.05$).

4. Discussion

The present study clearly shows for the first time in goats that, contrary to a widely-accepted assumption, the concentration of melatonin can differ considerably between the jugular veins of a given animal. In sheep, English et al. [20] found a possible difference in melatonin concentrations between right and left jugular veins only in two ewes. However, that result was biased because only two animals were used. In the present experiment, it has been observed that one animal can have higher melatonin concentrations on one jugular side than on the other, although no difference has been

observed in the population. Consequently, it could have been that in the experiment of English et al. [20] two animals with differences between them were used. Therefore, to study the possible differences between jugular veins, it is necessary to use a high number and a random selection of animals in the experiment. Confirming this assumption, Zarazaga et al. [6] have recently demonstrated in a large number of animals that there is no absolute dominant side—in some individuals, higher concentrations were found on the right side, while in others they were on the left side, and in yet others, levels were similar on the two sides. Moreover, the authors demonstrated, using continuous collection of blood during the night, that the higher melatonin concentration in one jugular relative to the other was stable throughout the night. In our case, we did not use fraction collection, but sampled the same animals in four different periods of the year; we found that a similar result was obtained, as the correlation coefficients for each side and for each sampling period were high.

The origin of this dissymmetry is unknown, but various possibilities can be postulated. The first would point to differences between the two jugular veins in terms of diameter, blood flow, or connections with draining veins, which would lead to a different dilution of melatonin on each side. Another possibility is anatomical differences between animals, suggesting that the sagittal sinus distribution of blood carrying melatonin is not equal between the two transverse sinuses, which would explain the differences in concentration observed in the jugular veins.

The difference in melatonin concentrations between the two jugular veins has important practical implications for the assessment of melatonin secretion. Indeed, results may be different depending on whether melatonin is measured on the right side or the left. In a general population, mean melatonin concentrations are independent of the sampling side, as average concentrations are similar on the two sides. However, when the amplitude of the melatonin rhythm has to be assessed for each individual, the measurement on a single side will be misleading in many animals and will not provide a good index of the synthetic activity of the pineal gland of a given animal. Studies addressing relationships between the amplitude of the melatonin rhythm and physiological responses to melatonin may have been flawed by this failure of an accurate individual assessment of the amplitude. From a practical standpoint, a better assessment of melatonin production by the pineal gland can be obtained either by collecting blood simulta-

neously from both jugular veins and pooling the samples, or by collecting blood from the carotid artery, i.e., after the blood from the two jugulars has been mixed in the heart.

Analysis of melatonin concentrations per doe showed very high inter-individual variability but a high correlation coefficient between concentrations in the different sampling periods. This establishes that melatonin concentration is an individual characteristic of each animal, as was found in sheep [21], and—as in sheep [22]—could be under strong genetic control. Although it is clear that most of this inter-individual variability is intrinsic to the pineal gland, and may be related to its varying size between individuals [5,23,24], the unpredictable distribution of melatonin between the two jugular veins could explain in part this inter-individual variability, melatonin measurements being performed in a single jugular vein.

The absence of correlation between absolute or relative melatonin concentrations and the onset or the end of reproductive activity is consistent with recent results obtained in sheep [14]. That study, using a large number of animals, did not find any evidence indicating that these two parameters (date of onset/end of the breeding season and the mean plasma melatonin concentrations) are linked and that the variability in plasma melatonin concentrations is independent of the variability in the dates of onset or end of the breeding season. The present results confirm previous ones obtained in mares [25] suggesting that the pattern of secretion of melatonin plays a limited role in controlling the cessation of reproductive activity.

These results contrast with those from previous experiments in sheep and in buffaloes. In one of those experiments, using melatonin-treated Ile-de-France ewes after long-days exposure, the interval between insertion of melatonin implants and onset of ovulatory activity was positively correlated with the relative melatonin concentrations [11]. In another, performed in non-implanted ewes of a reduced-seasonality breed (Rasa Aragonesa) maintained under natural photoperiod, a high correlation ($r = 0.84$) was found between night/day ratio and date of the first oestrus activity [12]. Similarly, Italian buffaloes—non-seasonal animals—presented a low variation in melatonin concentrations between night and day [13]. Selection for fertility in autumn lambing affects patterns of melatonin during the dark phase, with lower melatonin plasma concentrations in ewes selected for higher spring fertility [26]. Finally, it was recently observed that after a buck effect, animals with lower levels of melatonin showed an onset of cyclic ovarian activity about 12 d after buck introduc-

tion, while another group with higher melatonin concentrations started 22 d later [27]. Thus, it is possible that animals with reduced seasonality have reduced variation of melatonin concentrations between night and day. However, this was not the case in the present study. This divergence with the results obtained in the former studies may be attributable to the difference in the number of animals used. However, the results obtained in the present study are reinforced by the examination of not only oestrus activity by introduction of males, but also ovarian activity by progesterone concentrations.

The major influence of melatonin on the reproductive axis is exerted on the pulsatile secretion of LHRH/LH, and this effect could by itself be sufficient to explain the regulation of seasonality [7,8]. One explanation for the absence of a relationship between variability in plasma melatonin concentrations and variability in dates of the breeding season may be found in the route taken by pineal melatonin to control LHRH/LH pulsatility. Melatonin synthesised in the pineal gland is secreted directly into the cerebrospinal fluid (CSF) of the III ventricle [28], from where it may diffuse to reach the premammillary hypothalamus, where melatonin receptors controlling the LH pulsatile secretion are located [29]. Accordingly, the rest of the pineal melatonin flowing into the general circulation via the vein of Galen would not be that which controls the central effects of melatonin. Therefore, it is possible that the main role of CSF melatonin is the control of seasonality of reproduction, whereas the role of melatonin of the peripheral circulation is to control other traits—such as moult and/or thermoregulation [3]—depending on the action of melatonin on peripheral rather than central receptors.

In conclusion, it has been proved that melatonin concentrations in Payoya goats are highly variable between jugular veins in the same individual but not in the general population, that melatonin concentration is an individual characteristic indicating a possible genetic control of this trait, and that absolute or relative amplitude of plasma melatonin concentration is not related to the seasonal breeding activity in Mediterranean goats. The role of melatonin amplitude in goats originating from higher latitudes requires further study.

Acknowledgments

The authors wish to thank the Assay Laboratory of the Station de Physiologie de la Reproduction et des Comportements (INRA, Nouzilly, France) for carrying

out the radioimmunoassays, and the Asociación de Criadores de la raza Caprina Payoya (ACAPA) for supplying animals. This work was supported by Grant RZ00-019 from C.I.C.Y.T.-I.N.I.A. and AGL2006-01426 from C.I.C.Y.T. (Spain).

None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organisations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

References

- [1] BonDurant RH, Darien BJ, Munro CJ, Stabenfeldt GH, Wang P. Photoperiod induction of fertile oestrus and changes in LH and progesterone concentration in yearling dairy goats (*Capra hircus*). *J Reprod Fertil* 1981;63:1–9.
- [2] Arendt J, Symons AM, Laud CA. Pineal function in the sheep: evidence for a possible mechanism mediating seasonal reproductive activity. *Experientia* 1981;37:584–86.
- [3] Arendt J. Physiology of the pineal: Role in photoperiodic seasonal functions. In: Arendt, editor. *J. Melatonin and the Mammalian Pineal Gland*, Chapman & Hall: London. 1995. p. 110–58.
- [4] Duvernoy HM, Parratte B, Tatu L, Vuillier F. The human pineal gland: relationships with surrounding structures and blood supply. *Neurological Res* 2000;22:747–90.
- [5] Zarazaga LA, Malpoux B, Guillaume D, Bodin L, Chemineau P. Genetic variability in melatonin concentration in ewes originates in its synthesis, not in catabolism. *Am J Physiol* 1998; 274:E1086–90.
- [6] Zarazaga LA, Todini L, Chemineau P, Marnet PG, Locatelli A, Malpoux B. Nocturnal melatonin concentrations vary dramatically between the two jugular veins in most individual sheep. *Res Vet Sci* 2010;88:233–238.
- [7] Bittman EL, Dempsey RJ, Karsch FJ. Pineal melatonin secretion drives the reproductive response to daylength in the ewe. *Endocrinology* 1983;113:2276–83.
- [8] Bittman EL, Karsch FJ, Hopkins JW. Role of the pineal gland in ovine photoperiodism: Regulation of seasonal breeding and the negative feedback effects of estradiol upon luteinizing hormone secretion. *Endocrinology* 1983;113:329.
- [9] Almeida OFX, Lincoln GA. Photoperiod regulation of reproductive activity in the ram: Evidence for the involvement of circadian rhythms in melatonin and prolactin secretion. *Biol Reprod* 1982;27:1062–75.
- [10] Guerin MV, Deed JR, Matthews CD. The coincidence of light and melatonin with specific phase of the circadian pacemaker is important for the timing of seasonal breeding in the ewe. *J Biol Rhythms* 2000;15:514–23.
- [11] Chemineau P, Maurice F, Daveau A. Re-initiation of ovulatory activity by melatonin given as a constant release implant long-day treated Ile-de-France ewes, depends on endogenous secretion of melatonin. In: Y. Touitou, J. Arendt, P. Pévet, editors. *Melatonin and the Pineal Gland-From Basic Science to Clinical Application*. Paris: Elsevier, 1993. p. 247–50.
- [12] Zarazaga LA, Forcada F, Abecia JA, Lozano JM. Date of reinitiation of the breeding season could be related with relative changes in plasma melatonin amplitude in ewes. In: S.M. Webb, M. Puig-Domingo, M. Moller, P. Pévet, editors. *Pineal update:*

- From molecular mechanisms to clinical implications. New York: PJD Publications, 1996. p. 295–300.
- [13] Parmeggiani A, Di Palo R, Zicarelli L, Campanile G, Esposito L, Seren E, Accorsi PA, Soflai SM. Melatonina e stagionalità riproduttiva della bufala. *Agricoltura Ricerca* 1994;153:41–8.
- [14] Zarazaga LA, Malpoux B, Chemineau P. Amplitude of the plasma melatonin nycthemeral rhythms is not associated with the dates of onset and offset of the seasonal ovulatory activity in the Ile-de-France ewe. *Reprod Nutr Develop* 2003;43:167–77.
- [15] Morand-Fehr P, Sauvant D. Alimentation des caprins. In: R. Jarrige, editor. *Alimentation des Bovins, Ovins et Caprins*. Paris: INRA. 1988. p. 281–304.
- [16] Zarazaga LA, Guzmán JL, Domínguez C, Pérez MC, Prieto R. Effect of plane of nutrition on seasonality of reproduction in Spanish Payoya goats. *Anim Reprod Sci* 2005;87:253–67.
- [17] Terqui M, Thimonier J. Nouvelle méthode radioimmunologique rapide pour l'estimation du niveau de progesterone plasmatique. Application pour le diagnostic précoce de la gestation chez la brebis et la chèvre. *CR Acad Sci Paris* 1974;279:1109–12.
- [18] Fraser SP, Cowen P, Franklin M, Franey C, Arendt J. Direct radioimmunoassay for melatonin in plasma. *Clin Chem* 1983; 20:396–7.
- [19] Tillet Y, Ravault JP, Selve C, Evin G, Castro B, Dubois MP. Conditions d'utilisation d'anticorps spécifiques pour la visualisation immunohistochimique de la sérotonine et de la mélatonine dans la glande pinéale du mouton, *CR Acad Sci: Paris*, 303 Série III 1986. p 77–82.
- [20] English J, Arendt J, Poulton A, Symons AM. Short-term variations of circulating melatonin in the ewe. *J Pineal Res* 1987;4:359–66.
- [21] Chemineau P, Beltrán de Heredia I, Daveau A, Bodin L. High repeatability of the amplitude and duration of the nycthemeral rhythm of the plasma melatonin concentrations in Ile-de-France ewes. *J Pineal Res* 1996;21:1–6.
- [22] Zarazaga LA, Malpoux B, Bodin L, Chemineau P. The large variability in melatonin blood levels in ewes is under strong genetic influence. *Am J Physiol* 1998;274:E607–10.
- [23] Coon ST, Zarazaga LA, Malpoux B, Ravault J, Bodin L, Vosin P, Weller JL, Klein DC, Chemineau P. Genetic variability in plasma melatonin in sheep is due to pineal weight, not to variations in enzyme activities. *Am J Physiol* 1999; 277:E792–97.
- [24] Gómez-Brunet A, Malpoux B, Daveau A, Taragnat C, Chemineau P. Genetic variability in melatonin secretion originates in the number of pinealocytes in sheep. *J Endocrinol* 2002;172: 397–404.
- [25] Fitzgerald BP, Schmidt MJ. Absence of association between melatonin and reproductive activity in mares during the non-breeding season. *Biol Reprod* 1995;Mono1:425–34.
- [26] Notter DR, Chemineau P. Nocturnal melatonin and prolactin plasma concentrations in sheep selected for fertility in autumn lambing. *J Anim Sci* 2001;79:2895–901.
- [27] Carcangiu V, Vacca GM, Parmeggiani A, Mura MC, Bini PP. Blood melatonin levels relating to the reproductive activity of Sarda does. *Small Ruminant Res* 2005;59:7–13.
- [28] Tricoire H, Locatelli A, Chemineau P, Malpoux B. Melatonin enters the cerebrospinal fluid through the pineal recess. *Endocrinology* 2002;143:84–90.
- [29] Malpoux B, Daveau A, Maurice-Mandon F, Duarte G, Chemineau P. Evidence that melatonin acts in the pre-mammillary hypothalamic area to control reproduction in the ewe: Presence of binding sites and stimulation of LH secretion by in situ microimplant delivery. *Endocrinology* 1998;139:1508–16.

DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL

En general, en los tres trabajos en los que se controló el régimen fotoperiódico al que estaban sometidos los animales y su alimentación, se observó que el peso vivo aumentaba durante los días largos y disminuía durante los días cortos. Estos cambios coinciden con la actividad reproductiva medida a través de las concentraciones plasmáticas de LH, al igual que lo observado por otros autores en esta misma especie (Walkden-Brown *et al.*, 1994a,b; Argo *et al.*, 1999; Zarazaga *et al.*, 2005). Confirmando estas observaciones, Barenton *et al.* (1988) demostraron que el fotoperiodo tiene un efecto directo sobre el peso vivo, de manera que los días largos estimulan la ganancia en peso y los días cortos la inhiben, si bien este estímulo podría estar mediado por la leptina más que existir un efecto directo del fotoperiodo (Marie *et al.*, 2001; Zieba *et al.*, 2007; Gutiérrez, 2009). De todos modos, no deben excluirse otras fuentes de variación en la disminución del peso vivo durante los días cortos, tales como una reducción en la ingesta de alimentos (Marie *et al.*, 2001) o una mayor actividad física (como consecuencia de una mayor actividad sexual) (Walkden-Brown *et al.*, 1997).

Ha quedado claramente demostrado que el fotoperiodo es el principal factor medioambiental que controla la actividad hipofisaria en hembras caprinas Mediterráneas. Este mismo hecho ha sido descrito en cabras situadas en latitudes subtropicales (Duarte *et al.*, 2010), latitudes altas (Chemineau *et al.*, 1992a) y en caprinos mediterráneos domésticos (Gómez-Brunet *et al.*, 2003; Zarazaga *et al.*, 2005; Gómez-Brunet *et al.*, 2010) y salvajes (Santiago-Moreno *et al.*, 2000, 2003, 2006). Nuestros resultados indican que la estimulación de la secreción de LH tras el comienzo de los días cortos tiene lugar antes (entorno a 56 días cortos) que en la raza Saanen, en la que se ha descrito que sucede a los 70 días (Chemineau *et al.*, 1986). Estas diferencias pueden ser debidas a las diferentes razas utilizadas y/o al diferente estado de lactación en el que se encontraban.

En el presente trabajo se observó un efecto de la alimentación, tanto sobre el inicio como el final de la actividad hipofisaria, siendo más corto el periodo de actividad hipofisaria en los animales subnutridos. Estos datos concuerdan con los resultados publicados anteriormente por nuestro grupo de investigación (Zarazaga *et al.*, 2005), en la misma latitud con cabras de la raza Payoya, utilizando diferentes niveles de alimentación (1,5 vs 1,0 veces las necesidades energéticas de mantenimiento), indicando que la actividad del eje hipotálamo-hipofisario comienza más tarde en los

animales con un nivel de alimentación reducido. Del mismo modo, De Santiago-Miramontes *et al.* (2009), trabajando con cabras en latitudes subtropicales, describieron que aquellas que tenían una pobre condición corporal experimentaron un inicio más temprano del periodo anovulatorio y un retraso en el inicio de la actividad ovulatoria. En ovejas situadas en latitudes altas, y en relación con el inicio y el final de la actividad reproductiva, el inicio de la temporada de reproducción parece ser menos variable que el final, probablemente debido a la sincronización de las primeras ovulaciones entre las hembras (Zarazaga *et al.*, 2003). De igual modo, también en ovejas, se ha demostrado que el efecto de la nutrición, en las variables reproductivas, es mucho mayor al inicio que al final del anestro estacionario, y que un mayor incremento en las reservas de grasa se relaciona con un retraso en el inicio del periodo de anestro estacionario en lugar de un avance en el inicio de la estación reproductiva (Forcada *et al.*, 1992). Estas diferencias encontradas entre las ovejas y cabras podrían estar mediadas por el papel que juegan los diferentes mecanismos neuronales que regulan la secreción de LH durante la etapa de transición de la estación reproductiva al anestro estacionario; por ejemplo, el papel que juegan los opioideos endógenos, el sistema dopaminérgico o el sistema serotoninérgico. Todo esto podría sugerir que el periodo de transición entre la época de anestro estacional y la época de actividad reproductiva podría ser un momento propicio para incrementar los niveles de nutrición por encima de los de mantenimiento para obtener un efecto significativo en aquellas cabras con un menor nivel de nutrición, como ocurre en algunos sistemas de producción extensivos o semiextensivos en condiciones Mediterráneas.

Respecto a la secreción de LH, se ha demostrado cómo la alimentación puede tener un papel modulador muy importante en la regulación de su secreción por el fotoperiodo. Así, en los tres trabajos realizados en fotoperiodo controlado, se ha puesto en evidencia cómo la subnutrición provoca una clara reducción en las concentraciones plasmáticas de LH, independientemente del momento fotoperiódico en el que se encontraran los animales. En el ganado caprino hay pocos trabajos que describan el efecto de la subnutrición sobre la secreción de las gonadotropinas. Mani *et al.* (1996) demostraron que una ración que aportaba el 25% de las necesidades nutritivas de mantenimiento no modificaba las concentraciones basales de LH y FSH durante el ciclo estral. Igualmente, Meza-Herrera *et al.* (2008) observaron que ni la condición corporal ni la ingestión de proteína no degradable modificaba las concentraciones de LH durante el periodo periovulatorio. Estos resultados difieren de los nuestros, probablemente

porque han sido realizados en periodos diferentes. Trabajando con machos cabríos, Kouakou *et al.* (2008) demostraron que ni un nivel de alimentación bajo ni la transición a un régimen alimenticio *ad libitum* modificaba las concentraciones de LH. Sin embargo, Walkden-Brown *et al.* (1994a) observaron que el efecto de una alimentación de baja calidad, en machos cabríos, sí provocaba una reducción en las concentraciones de LH durante todo el periodo experimental, en comparación con machos que recibían una dieta de alta calidad. Rhind *et al.* (1991) observaron que el efecto de una dieta de baja calidad está asociado con una mayor sensibilidad al *feedback* negativo del estradiol en la secreción de LH, en ovejas ovariectomizadas portadoras de un implante de estradiol. El efecto de los esteroides sobre la secreción de LH está mediado por las endorfinas y las encefalinas, los opioideos endógenos, y a través de neurotransmisores como la dopamina, la adrenalina y la serotonina (Haynes *et al.*, 1989), aunque la importancia de estos factores puede ser variable (Rhind, 1992).

Respecto al papel de los diferentes sistemas neuronales estudiados en el control de la secreción de la LH, éstos parecen estar claramente afectados por el nivel de alimentación, así como por el momento del ciclo fotoperiódico.

El antagonista de los opioideos endógenos utilizado, la naloxona, produjo sus efectos en menos de una hora post-aplicación. Además, incrementó la secreción de LH (concentración y pulsatilidad), independientemente del nivel de alimentación, en el momento del inicio de la inhibición de ésta por los días largos, lo que indicaría que, durante ese periodo, este sistema estaría implicado en la inhibición de la secreción de la LH; Xia Orong y Zhang (1996; citado por Singh *et al.*, 2000) observaron efectos similares. También tuvo el mismo efecto durante la estimulación de la LH por los días cortos, en el lote mejor alimentado, indicando que la adecuada alimentación sería capaz de reducir el efecto inhibitorio de los opioideos durante este periodo. Estos resultados son muy similares a los obtenidos por Forcada *et al.* (1997) en ovejas suplementadas y no suplementadas de la raza Rasa Aragonesa. Sin embargo, diferentes trabajos no han mostrado efecto de la naloxona sobre la secreción de la LH, en ovejas que recibían una alimentación restringida (Ebling *et al.*, 1990; Recabarren *et al.*, 1990); sugiriendo, en estos casos, que los opioideos no estarían implicados en la inhibición de la secreción de la LH debido a una subalimentación. El claro efecto que tuvo este fármaco, en nuestro trabajo, sobre la pulsatilidad de la secreción de LH, podría ser explicado porque el generador de pulsos de GnRH parece estar controlado por los opioideos endógenos (Ito *et al.*, 1993). Por otro lado, también en machos cabríos, Singh *et al.* (2000) y Fuentes *et*

al. (1998a) observaron que la inyección de naloxona o la administración de bajas dosis del mismo fármaco durante el anestro estacionario, incrementaba las concentraciones de LH. Sin embargo, en el presente trabajo no encontramos efecto alguno de la naloxona durante el pleno periodo de inhibición de la secreción de la LH por los días largos. La diferencia con respecto a los estudios previos probablemente sea el momento de llevar a cabo el tratamiento. En nuestro trabajo, al estar los animales sometidos a un fotoperiodo artificial, controlábamos perfectamente el momento del ciclo fotoperiódico y el momento de la inhibición de la secreción de la LH. Igualmente, en el ovino, otros autores no han observado efecto de la naloxona durante el periodo de anestro estacionario (Brooks *et al.*, 1986; Trout y Malven, 1987; Yang *et al.*, 1988; Schall *et al.*, 1991; Meyer y Goodman, 1985; Misztal *et al.*, 2004). De todos modos, Malven *et al.* (1990) indican que los opioideos endógenos modulan diferentes parámetros de secreción de la LH, pero que cuando no ejerce efecto, los resultados podrían no considerarse definitivos, ya que pudieran deberse a la dosis o vía de administración o porque su acción es sobre otro tipo de receptor específico.

El escaso efecto del pimozide (antagonista de los receptores dopaminérgicos₂) sobre la secreción de LH, en el grupo subalimentado, indicaría que el efecto negativo del sistema dopaminérgico sobre la secreción de LH estaría altamente potenciado como consecuencia de la subnutrición o que, en nuestras condiciones, la dosis seleccionada (0,75 mg/kg de peso vivo) no fue suficiente para reducir su inhibición sobre la secreción de LH. En el grupo sobrealimentado de nuestra experiencia, el pimozide aumentó las concentraciones y número de pulsos de LH al comienzo de la inhibición de la secreción de LH por los días largos. Estos resultados son similares a los descritos en ovejas OVX+E₂ y suplementadas al comienzo del anestro estacionario (Forcada *et al.*, 1997) o refractarias a los días cortos (Kao *et al.*, 1992; Le Corre y Chemineau, 1993), quienes observaron un incremento en la pulsatilidad de LH. Estos resultados, demuestran que el sistema dopaminérgico juega un papel importante como modulador de la liberación pulsátil de LH durante este periodo, en cabras y ovejas. Por lo tanto, nuestros resultados podrían indicar que existe una menor sensibilidad del hipotálamo a los efectos del *feedback* negativo del estradiol sobre la LH, en cabras que recibieron un mayor nivel de alimentación y que podría estar regulado, al menos, por el sistema dopaminérgico al comienzo del anestro. La ausencia de efecto del pimozide sobre la secreción de LH en el grupo peor alimentado, contrasta con los resultados obtenidos por Forcada *et al.* (2002), quienes observaron un incremento en la pulsatilidad de LH tanto en ovejas OVX+E₂,

tanto sobre- como subalimentadas. Sin embargo, en dicho experimento, todas las ovejas estaban implantadas con melatonina, que se ha demostrado estimula la secreción de GnRH y LH porque reduce la actividad tirosina hidroxilasa en la eminencia media (Viguié *et al.*, 1997). La ausencia de efecto del pimozide, encontrada en nuestro estudio sobre la pulsatilidad de secreción de la LH durante su inhibición por los días largos, es similar a los resultados de Le Corre y Chemineau (1993) lo que sugiere que el sistema dopaminérgico podría ser relativamente poco importante durante la fotosupresión por los días largos (Malpaux *et al.*, 1989). Según los trabajos publicados consultados, no se había descrito hasta ahora el papel del sistema dopaminérgico sobre la inhibición de la secreción de LH en caprino.

No se observó efecto alguno de la inyección de cyproheptadina (antagonista de los receptores 5-hydroxytryptamina₂) sobre la secreción de LH, en el grupo de cabras subalimentadas, lo que podría indicar, de nuevo, que estos receptores están fuertemente influenciados por el efecto de la nutrición sobre la secreción de LH y/o la dosis seleccionada (0,75 mg/kg de peso vivo) no fue suficiente para superar la inhibición en nuestras condiciones experimentales. Igualmente, nuestros resultados muestran que el papel del sistema serotoninérgico es importante, en el grupo sobrealimentado, durante el comienzo de la inhibición de la secreción de LH por la acción de los días largos y en el comienzo de la estimulación de la secreción de la LH por los días cortos, ya que la cyproheptadina aumentó considerablemente, en ambos casos, tanto la concentración como el número de pulsos de LH. Estos resultados sugieren, además, que la menor sensibilidad del hipotálamo a los efectos del *feedback* negativo del estradiol en cabras bien alimentadas podría estar controlada, por lo menos durante estos periodos, por el sistema serotoninérgico. En ovino, los resultados encontrados son dispares. En razas ovinas Mediterráneas, Forcada *et al.* (2002), usando dos grupos de ovejas sometidas a niveles de alimentación diferentes, observaron un aumento de la secreción de LH a principios del anestro, pero no ocurrió lo mismo a finales de este periodo. Sin embargo, Le Corre y Chemineau (1993) obtuvieron un efecto positivo de la cyproheptadina en ovejas Ile-de-France, antes de la estimulación de la secreción de LH por los días cortos y durante la refractariedad a los mismos. Estos autores observaron también un efecto significativo de la cyproheptadina en las ovejas sometidas a días largos, que fue similar a los animales en pleno anestro estacional de nuestro trabajo. Estas discrepancias pueden deberse a una diferencia entre el papel de las neuronas serotoninérgicas en la

inhibición de la pulsatilidad de LH entre cabras y ovejas o en todo caso en función de la raza utilizada.

La interacción significativa entre el tratamiento con melatonina y la nutrición sobre la secreción de LH ha sido descrita por primera vez en caprino. Sin embargo, en ovejas, esta interacción entre el tratamiento con melatonina exógena y la nutrición ha sido ya descrita, ejerciendo un efecto significativo sobre la tasa de ovulación en las ovejas peor alimentadas (Robinson *et al.*, 1991; Forcada *et al.*, 1995). También, Rondón *et al.* (1996) han descrito el efecto positivo de la colocación de los implantes de melatonina sobre la tasa de ovulación, siendo más pronunciado en las ovejas con un reducido nivel de reservas corporales. Estos resultados tienen importantes implicaciones prácticas ya que la utilización de implantes de melatonina durante el anestro estacional podría permitir mejorar el estado reproductivo de animales que hubieran sufrido algún tipo de restricción alimentaria.

Tras la colocación del implante de melatonina, al final del periodo de días largos, las concentraciones de LH se incrementaron y el inicio de la actividad hipofisaria fue más rápido que en las hembras no implantadas, de manera que se produjo a los $31,3 \pm 3,4$ días. Este intervalo de tiempo es similar a resultados previos obtenidos por nuestro grupo cuando la melatonina fue implantada entorno al equinoccio de primavera ($30,3 \pm 10,2$ días) (Zarazaga *et al.*, 2009a) o tras un tratamiento fotoperiódico de días largos ($29,7 \pm 10,2$ días) (Zarazaga *et al.*, *datos no publicados*), pero más corto que el descrito por Chemineau *et al.* (1986), que no observaron ovulación tras un periodo de 70 días cortos. Estas diferencias pueden estar motivadas por la influencia de la raza y/o estado de lactación. Sin embargo, estos resultados contrastan con los obtenidos en ovejas, en donde la colocación del implante de melatonina durante el equinoccio de primavera no indujo actividad reproductiva durante el anestro estacionario, en ovejas OVX+E₂ que no tuvieron contacto alguno con machos (Forcada *et al.*, 2002) o en ovejas enteras en contacto con los machos (Forcada *et al.*, 1995).

El día previo a la colocación del implante se observaron diferencias, con respecto a los resultados obtenidos en el experimento del segundo objetivo de la presente memoria, como respuesta a la inyección de pimozide y cyproheptadina en el mismo momento que en el experimento de este tercer objetivo. En nuestro trabajo previo, correspondiente al objetivo 2, el pimozide y la cyproheptadina incrementaron las concentraciones de LH durante la inhibición de la LH por los días largos, pero en este

tercer objetivo el pimozide no ejerció ningún efecto. El motivo de estas diferencias podría venir dado por que en el presente trabajo se redujeron las dosis administradas en 0,15 mg/kg. En este momento, día previo a la colocación del implante de melatonina, no se observó respuesta a la inyección de naloxona, lo que sugiere que los opioideos endógenos no están involucrados en la inhibición de la secreción de LH por la acción de los días largos. Finalmente, la inyección del NMDA, antes de la colocación del implante de melatonina, incrementó las concentraciones de LH, independientemente del nivel de alimentación, indicando que éste mecanismo estaría implicado en la inhibición por parte del fotoperiodo de la secreción de LH (Lincoln y Wu, 1991) y que la alimentación no afecta a la respuesta producida por los aminoácidos excitatorios.

A los 30 días de la colocación del implante de melatonina, la naloxona incrementó la secreción de LH, independientemente del nivel de alimentación, y a los 45 días sólo en el subgrupo de cabras mejor alimentadas. Por otro lado, en cabras sometidas a alternancia de 3 meses de días largos y 3 meses de días cortos, la inyección de este fármaco incrementó también la secreción de LH, cuando fue administrado a los 55 días del inicio de los días cortos. Estos resultados sugieren que el efecto inhibitorio de los opioideos endógenos sobre la secreción de LH se reduce en hembras bien alimentadas. Por otro lado, y ya que, en este tercer trabajo, el efecto positivo de la naloxona se observó a los 30 y 45 días de la colocación del implante, antes que en el experimento del segundo objetivo, se podría pensar que la melatonina reduce el efecto inhibitorio de los opioideos endógenos sobre la secreción de LH de una manera más clara que los días cortos artificiales. Apoyando esta hipótesis en ovejas, Misztal y Romanowicz (2005) observaron que el efecto estimulador de la melatonina o naloxona en la secreción de LH fue más efectivo al ser infundidas combinadas intracerebroventricularmente. Una posible explicación a este hecho es que la secreción de GnRH/LH, en respuesta a la eliminación de la inhibición de los opioideos endógenos, se intensifica por la melatonina a nivel celular. Así, estudios realizados sobre las células de la *pars tuberalis* han puesto de manifiesto que el AMPc se incrementa claramente tras el tratamiento simultáneo con activadores de la adenilato ciclasa y la melatonina (Barrett *et al.*, 2003; Hazlerigg *et al.*, 1994). De este modo, la melatonina podría inducir una respuesta sensible a la adenilato ciclasa en las células de la *pars tuberalis* donde se expresan los receptores de la melatonina (Barrett *et al.*, 2003). De todos modos, el mecanismo exacto de acción de la melatonina en la especie ovina aún no se conoce. El aumento en la liberación de LH provocada por la melatonina, en

condiciones de eliminación del efecto inhibitorio de los opioideos, refleja su potente nivel de acción a nivel del eje gonadotrópico. Aún así, Yang *et al.* (1989) no observaron incremento en la secreción de LH tras la inyección de WIN-3, un antagonista opioideo, en ovejas implantadas y no implantadas con melatonina en los días 5, 15 ó 25 después de la colocación del implante. A los 60 días sólo consiguieron mejorar significativamente la secreción de LH en tres ovejas implantadas con melatonina que mostraron ciclicidad ovárica. Estos autores sugieren que la melatonina, por sí misma, no es capaz de inducir actividad reproductiva, por modificación de la secreción de LH, al menos por la simple eliminación del mecanismo de los opioideos endógenos.

La falta de efecto del pimozide en los días 30 y 45 después de la colocación del implante de melatonina contrasta con los resultados obtenidos en ovejas. Así, Forcada *et al.* (2002) observaron un incremento en la secreción de LH en ovejas implantadas con melatonina tanto en aquellas que estaban subnutridas como en las que estaban bien alimentadas. Estos hechos podrían explicar un diferente papel de los opioideos endógenos en el control de la secreción de LH en animales implantados con melatonina entre ovejas y cabras.

También se observó un efecto positivo de la cyproheptadina cuando se inyectó a los 45 días tras la colocación del implante de melatonina en los subgrupos de cabras mejor alimentadas. Igualmente, cuando la cyproheptadina se inyectó en cabras a los 55 días del inicio de los días cortos sólo fue capaz de inducir un aumento en la secreción de LH en los animales bien alimentados. Todo ello indica que el efecto negativo del sistema serotoninérgico sobre la secreción de LH se reduce con un adecuado nivel nutricional, independientemente de la colocación de implante de melatonina o no. Esto sugiere que la menor sensibilidad del hipotálamo a los efectos del *feedback* negativo del estradiol en cabras que reciben altos niveles nutricionales está mediada, al menos en los momentos estudiados, por el sistema serotoninérgico. Igualmente, estos resultados impiden concluir que la estimulación de la secreción de LH por parte del implante de melatonina se produzca a través de la implicación del sistema serotoninérgico.

La inyección de NMDA estimuló de manera muy evidente la secreción de LH, en los subgrupos de cabras mejor alimentadas, a los 30 días de la colocación del implante y en todos los subgrupos, a los 45 días. Esto sugiere que, contrariamente a lo descrito en ovejas (Lincoln y Wu, 1991; Viguié *et al.*, 1995), los aminoácidos excitadores están involucrados en la secreción de LH tanto durante el periodo de fotoestimulación como en el de fotoinhibición. De hecho, el NMDA estimuló de forma

significativa la secreción de LH cada vez que fue administrado. El origen de estas diferencias encontradas entre la oveja y la cabra podría ser doble: en primer lugar, que este mecanismo pueda actuar de una manera diferente en ambas especies, y en segundo lugar, que Viguié *et al.* (1995) estudiaron el efecto del NMDA, en ovejas OVX+E₂, en los días 39 y 74 posteriores a la implantación de melatonina (mucho más tarde que en el presente objetivo). Igualmente, en cabras prepúberes, se ha demostrado que la inyección de L-glutamina induce la aparición más temprana de la pubertad (Meza-Herrera *et al.*, 2007b) y sin embargo, Meza-Herrera *et al.* (2007a), en machos cabríos con una inyección de L-glutamina tres veces por semana durante días crecientes, no observaron ningún efecto sobre la secreción de LH. De acuerdo con nuestros resultados, la ausencia de cualquier efecto del NMDA sobre la secreción de LH, en los grupos de hembras peor alimentados, 30 días después de la colocación del implante de melatonina, sugiere que, por lo menos en este momento, la estimulación de la secreción de LH por los aminoácidos neuroestimuladores glutamina y aspartato por el NMDA se encuentra bloqueada por la restricción nutricional. Por último, el efecto positivo observado, a los 30 días post-implante de melatonina, en los animales con un nivel de alimentación más alto, implantados o no con melatonina, y a los 45 días en todos los subgrupos, no permite concluir que la melatonina estimule la secreción de LH a través de una vía glutamatérgica.

En relación a las concentraciones plasmáticas de melatonina, nuestros resultados confirman los ya obtenidos en ovejas, indicando que la nutrición no tiene efecto sobre esta hormona (Martin *et al.*, 2002), incluso en momentos críticos como son el inicio y final del periodo de oscuridad (Guerin *et al.*, 2000). Sin embargo, se ha demostrado que el tratamiento con leptina (mediador del nivel de reservas grasas del animal) reduce o incrementa las concentraciones de melatonina durante los días largos y cortos, respectivamente (Adam y Mercer, 2004; Zieba *et al.*, 2007). Así, se han encontrado receptores de leptina en la glándula pineal y en el sistema nervioso central en especies de rumiantes, aunque el lugar exacto no está del todo claro, pero se sugiere que existe una interacción entre fotoperiodo, melatonina y leptina (Chelikani *et al.*, 2003).

Respecto al estudio de las concentraciones plasmáticas de melatonina entre las dos venas yugulares, los trabajos realizados han mostrado que éstas difieren considerablemente entre ambas venas de un mismo animal. Igualmente, en la oveja, English *et al.* (1987) obtuvieron un resultado similar aunque dicho estudio solamente fue realizado en dos ovejas y encontraron una mayor concentración plasmática de

melatonina en la misma vena de las dos ovejas. Sin embargo, en el presente trabajo, realizado con un mayor número de animales, si bien se observó que un animal presenta mayores concentraciones plasmáticas de melatonina en una vena o en otra, en la población global no se observó esta tendencia, lo que indicaría que las mayores concentraciones en una yugular de un animal es compensada por las menores concentraciones en la misma yugular de otro. Por lo tanto, para estudiar las posibles diferencias entre ambas venas yugulares, es necesario usar un gran número de animales y una selección aleatoria de estos animales en el experimento. Confirmando esta hipótesis, Zarazaga *et al.* (2010) han demostrado, en un gran número de ovejas, que no existe una yugular dominante, ya que había ovejas con concentraciones mayores en la yugular izquierda o en la yugular derecha y otras con concentraciones similares en ambas venas. Por otra parte, estos autores demostraron, mediante un muestreo continuo durante toda la noche, que ésta era una característica individual y que se mantenía a lo largo de todo el día y noche, sin ser de forma puntual. En el presente estudio no se utilizó un muestreo continuo, pero se muestrearon las cabras en cuatro momentos diferentes (solsticios y equinoccios) y se obtuvieron resultados similares, demostrado por los elevados coeficientes de correlación de las concentraciones plasmáticas de melatonina de cada vena yugular entre los diferentes periodos de muestreo.

El origen de esta disimetría entre ambas venas no se conoce, pero podrían proponerse diversas hipótesis. La primera, podría estar relacionada con el diámetro de la vena yugular, la velocidad del flujo sanguíneo o las diferencias en el punto de bifurcación de las venas yugulares, lo que podría dar lugar a una dilución diferente de la melatonina en cada vena. La segunda hipótesis, podría ser las diferencias anatómicas existentes entre los animales, de manera que la distribución de la sangre en el seno sagital, que contiene la melatonina liberada por la glándula pineal, no se distribuye de igual manera entre los dos senos transversos antes de llegar a las venas yugulares. Estos resultados tienen importantes implicaciones prácticas ya que si se desea una determinación precisa de la producción de melatonina de un animal, por la glándula pineal, es necesario sacar sangre de ambas venas al mismo tiempo, para luego mezclar ambas muestras, o recolectar la sangre de la arteria carótida, es decir, después de que la sangre de las dos yugulares se mezcle en el corazón.

Las concentraciones de melatonina presentaron una elevada variabilidad entre individuos pero, con una elevada repetibilidad, lo que podría indicar que este parámetro podría ser una característica de cada individuo, tal y como ha sido descrito en la especie

ovina (Chemineau *et al.*, 1996), y que podría estar bajo control genético (Zarazaga *et al.*, 1998b). Aunque la mayor parte de esta variabilidad entre individuos se puede deber a las variaciones en el tamaño de la glándula pineal entre cada individuo (Zarazaga *et al.*, 1998a; Coon *et al.*, 1999; Gómez-Brunet *et al.*, 2002), también podrían ser debidas a las variaciones en la distribución de la melatonina entre ambas venas yugulares, debido a que las mediciones de las concentraciones de melatonina no se hayan hecho correctamente.

La ausencia de correlación entre las concentraciones absolutas o relativas (relación día/noche) de melatonina y el inicio o el final de la actividad reproductiva, encontradas en este trabajo, es similar a los resultados obtenidos en ovejas (Zarazaga *et al.*, 2003). En dicho estudio, utilizando un elevado número de animales, no se observó que estos dos parámetros (fecha de inicio/final de la estación reproductiva y las concentraciones plasmáticas medias de melatonina) estuvieran relacionados. Además se demostró que la variabilidad en las concentraciones plasmáticas de melatonina era independiente de la variabilidad en la fecha de comienzo o final del periodo de actividad reproductiva. Igualmente, estos resultados confirman los obtenidos en otros animales como la yegua (Fitzgerald y Schmidt, 1995) y sugieren que el patrón de secreción de melatonina juega un papel limitado en el control de la actividad reproductiva.

No obstante, estos resultados contrastan con otros experimentos previos de otros autores. En uno de esos experimentos, usando ovejas Ile-de-France tratadas con melatonina tras ser expuestas a días largos, el intervalo entre la inserción de los implantes de melatonina y el inicio de la actividad ovulatoria se correlacionó positivamente con las concentraciones relativas de melatonina (Chemineau *et al.*, 1993). En otro experimento, realizado en ovejas de raza Rasa Aragonesa mantenidas bajo fotoperiodo natural, se encontró una alta correlación ($r=0,84$) entre las concentraciones relativas y la fecha del inicio del primer celo (Zarazaga *et al.*, 1996a). En búfalos, animales no estacionales, presentaron poca variación entre las concentraciones diurnas y nocturnas de melatonina (Parmeggiani *et al.*, 1994). Igualmente, la selección de ovejas realizada para incrementar la fertilidad, con el objetivo de obtener partos en otoño, ha provocado la modificación del patrón de secreción de melatonina durante la noche, con menores concentraciones de melatonina en estas ovejas seleccionadas (Notter y Chemineau, 2001). Finalmente, en cabras, recientemente se ha indicado que, tras el efecto macho, las hembras que tenían unas concentraciones bajas de melatonina mostraban un inicio de la actividad ovárica más rápido (a los 12 días) que las cabras que

tenían unas concentraciones de melatonina superiores (a los 22 días de la introducción de los machos) (Carcangiu *et al.*, 2005). Por lo tanto, sería posible que los animales que tienen una reducida estacionalidad reproductiva pudieran tener una variación entre las concentraciones de noche y de día menor. Sin embargo, esto no fue así en los resultados obtenidos en el experimento de este cuarto objetivo. La diferencia de nuestros resultados con respecto a los experimentos previos podría ser debido a los animales utilizados. Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente trabajo están reforzados porque estudiamos no sólo el comienzo de la actividad estral sino también el comienzo de la actividad ovárica.

La explicación de la ausencia de una relación entre las concentraciones plasmáticas de melatonina y las fechas de inicio o final de la actividad reproductiva podrían estar relacionadas con la ruta utilizada por la melatonina para controlar la pulsatilidad de la secreción de la GnRH/LH. La melatonina sintetizada en la glándula pineal es secretada directamente en el líquido cefalorraquídeo del 3^{er} ventrículo (Tricoire *et al.*, 2002), desde donde difunde hasta llegar al hipotálamo premamilar, en donde se encuentran los receptores de melatonina encargados de controlar la secreción pulsátil de LH (Malpoux *et al.*, 1998). En consecuencia, el resto de la melatonina pineal que desemboca en la circulación general a través de la vena de Galiano no sería la que controla los efectos centrales de la melatonina. Por lo tanto, es posible que la principal función de la melatonina del líquido cefalorraquídeo sea el control de la estacionalidad de la reproducción, mientras que el papel de la melatonina de la circulación periférica sea el control de otras características, como la muda y/o la termorregulación (Arendt, 1995), dependiendo de la acción de la melatonina en los receptores periféricos.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En las condiciones en las que se han desarrollado los experimentos de la presente memoria, en hembras caprinas Mediterráneas, se puede concluir lo siguiente:

Artículo 1:

- En cabras sometidas a ciclos fotoperiódicos de 90 días largos y 90 días cortos, la secreción de LH se ajustó claramente a estos ciclos, siendo estimulada por los días cortos e inhibida por los días largos, lo que indicaría que el fotoperiodo es el principal factor medioambiental que controla la secreción de LH y como consecuencia la actividad reproductiva a lo largo del año.
- El nivel de alimentación parece modular el efecto que el fotoperiodo tiene sobre la secreción de LH. Las concentraciones de esta hormona fueron claramente inferiores en el lote subnutrido en comparación con el lote mejor alimentado.
- El nivel de alimentación más alto redujo el intervalo de tiempo que transcurre entre el paso de los días largos a días cortos y el comienzo de la estimulación de la secreción de LH ($45,7 \pm 3,1$ vs. $65,8 \pm 2,1$ días, para cabras que recibían una ración que cubría 1,1 ó 0,7 veces sus necesidades de mantenimiento, respectivamente).
- El nivel de alimentación más alto alargó el intervalo de tiempo transcurrido entre el paso de los días cortos a días largos y el comienzo de la inhibición de la secreción de LH ($29,6 \pm 1,9$ vs. $22,2 \pm 1,7$ días, para cabras que recibían una ración que cubría 1,1 ó 0,7 veces sus necesidades de mantenimiento, respectivamente).
- Las concentraciones plasmáticas de melatonina no resultaron modificadas por el nivel de alimentación pero sí por el tratamiento fotoperiódico, con mayores concentraciones durante los días largos que durante los días cortos.

Artículo 2:

- El nivel de alimentación parece ser un importante modulador del control que el fotoperiodo ejerce sobre la secreción de LH, ya que el efecto de los diferentes sistemas neuroendocrinos estudiados (opioideos endógenos, sistema

- dopaminérgico y serotoninérgico) fue modificado en función del nivel de alimentación.
- Los tres sistemas neuroendocrinos estudiados parecen estar implicados en el comienzo de la inhibición de la secreción de LH por los días largos en cabras sometidas a un nivel de alimentación alto (1,1 veces las necesidades energéticas de mantenimiento).
 - Durante el comienzo de la estimulación de la secreción de LH por los días cortos, los opioideos endógenos y el sistema serotoninérgico mostraron una mayor implicación en el control de la secreción de LH, sobre todo en las cabras sometidas a un nivel de alimentación alto (1,1 veces las necesidades de mantenimiento).

Artículo 3:

- El uso de melatonina exógena permitió incrementar las concentraciones plasmáticas de LH de una manera más marcada en las cabras que recibían un nivel de alimentación bajo (0,7 veces las necesidades de mantenimiento).
- El nivel de alimentación modificó el papel de los sistemas neuroendocrinos estudiados (opioideos endógenos, sistema dopaminérgico, sistema serotoninérgico y los aminoácidos excitatorios) durante la estimulación de la secreción de la LH por la melatonina.
- Los opioideos endógenos parecen ejercer un efecto inhibitorio durante la estimulación de la LH por el implante de melatonina. La inyección de naloxona incrementó las concentraciones de LH en las cabras implantadas con melatonina tanto a los 30 días, independientemente del nivel de alimentación, como a los 45 días de la colocación del implante de melatonina, en las cabras mejor alimentadas (ración que cubría 1,1 veces sus necesidades de mantenimiento).
- El papel del sistema serotoninérgico, parece tener una mayor implicación en el control de la secreción de LH ejercido por la alimentación que el provocado por el tratamiento con melatonina. Se observó una respuesta positiva a la inyección de cyproheptadina a los 45 días de la colocación del implante en el lote mejor alimentado, independientemente del tratamiento con melatonina.
- Los resultados obtenidos en nuestro trabajo no permiten concluir que la estimulación de la LH por la melatonina exógena se ejerza a través de la vía de los aminoácidos excitatorios. El uso del NMDA, incrementó la secreción de LH

a los 30 días de la colocación del implante de melatonina en las cabras mejor alimentadas (1,1 veces sus necesidades de mantenimiento), y a los 45 días post-implante, en todos los grupos.

Artículo 4:

- Las concentraciones plasmáticas de melatonina se ha demostrado que son muy variables entre las venas yugulares de un mismo individuo, pero no se observan diferencias entre las mismas en la población en general. Además se observó una elevada repetibilidad en las concentraciones de esta hormona para un mismo individuo.
- Las concentraciones absolutas o relativas de melatonina no están relacionadas con la actividad reproductiva (inicio de actividad reproductiva o inicio de anestro estacionario).

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

According to the conditions of the experiments performed of the present memory, in Mediterranean female goats, we can conclude:

Article 1:

- In goats under photoperiodic cycles of 90 days of long days and 90 days of short days, the LH secretion clearly meets these cycles. The LH secretion was stimulated by the short days and inhibited by the long days. These facts, suggests that the photoperiod is the main environmental factor that controls the LH secretion and consequently the reproductive activity throughout the year.
- The nutrition level seems to modulate the effect of photoperiod on the LH secretion. Its concentrations were significantly lower in the underfed group compared with the high nutrition group.
- The interval between the shift from long to short days and the onset of stimulation of LH secretion was shortened by the high nutrition level (45.7 ± 3.1 vs. 65.8 ± 2.1 days for the goats that received 1.1 or 0.7 times their maintenance requirements, respectively).
- The high nutrition level lengthening the time interval between the shift from short to long days and the onset of the LH inhibition (29.6 ± 1.9 days vs. 22.2 ± 1.7 days for the goats that received 1.1 o 0.7 times their maintenance requirements, respectively).
- Melatonin concentrations were not modified by the level of nutrition but were altered by the photoperiodic treatment. The melatonin concentrations were higher during the long days than during the short days.

Article 2:

- The level of nutrition seems to be an important modulator of the LH secretion by the photoperiod, since the effect on LH concentrations of the different neuroendocrine systems studied (endogenous opioids, dopaminergic and serotonergic system) was modified according to the level of nutrition.
- The three studied neuroendocrine systems: endogenous opioids, dopaminergic and serotonergic system, appear to be involved in the onset of inhibition of the

LH secretion by long days in goats submitted to a higher level of nutrition (1.1 times their maintenance requirements).

- During the beginning of the stimulation of LH secretion by short days, the endogenous opioids and serotonergic system showed greater involvement in the control of LH secretion, especially in goats that received a higher level of nutrition (1.1 times their maintenance requirements).

Article 3:

- The exogenous melatonin increased the plasma LH concentrations more clearly in goats receiving a lower level of nutrition (0.7 times their maintenance requirements).
- Nutrition level it has been shown to be a modulator of the effect of the different neuroendocrine systems studied (endogenous opioids, dopaminergic and serotonergic system, and excitatory amino acids) on the stimulation of the LH secretion by the exogenous melatonin.
- Endogenous opioids have an inhibitory effect during the stimulation of the LH secretion by the exogenous melatonin. The naloxone injection increased LH concentrations in goats implanted with melatonin both at 30 days, irrespective of the level of nutrition. Moreover, naloxone increases LH concentrations 45 days after melatonin implantation, only in well fed goats (ration covering 1.1 times their maintenance requirements).
- The role of serotonergic system appears to be more clearly involved in the control of LH secretion by nutrition than by melatonin treatment. A positive response was observed after cyproheptadine injection 45 days after melatonin implantation in the well fed group, irrespective of melatonin treatment.
- No evidence was found to support the hypothesis that the influence of melatonin in advancing the breeding season may occur via a glutamatergic pathway. The NMDA an agonist of the excitatory amino acids, increased LH secretion 30 days after melatonin implantation in well fed goats (ration covering 1.1 times their maintenance requirements), and 45 days after treatment with melatonin, in all groups.

Article 4:

- Plasma melatonin concentrations are highly variable between jugular veins of the same individual but not in the general population. Moreover a high repeatability of this hormone concentration for the same individual was observed.
- The absolute and relative amplitude of melatonin concentrations are not linked to the seasonal breeding activity (onset of the breeding season or onset of the seasonal anoestrous).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abecia JA, Forcada F, Zarazaga LM, 1993a.** Variación del peso vivo durante la lactación: efecto sobre la reactivación cíclica y ovárica en ovejas paridas en anestro estacionario. ITEA, 89: 78-89.
- Abecia JA, Forcada F, Zarazaga LM, 1993b.** A note on the effect of level of nutrition after weaning on the resumption of reproductive activity by ewes of two Spanish breeds lambing in spring. *Animal Production*, 56: 273-276.
- Abecia JA, Rhind SM, Bramley TA, McMillen SM, 1995.** Steroid production and LH receptor concentrations of ovarian follicles and corpora lutea and associated rates of ova wastage in ewes given high and low levels of food intake before and after mating. *Animal Science*, 61: 57-62.
- Abecia JA, Forcada F, Lozano JM, 1999.** A preliminary report on the effect of dietary energy on prostaglandin $F_{2\alpha}$ production *in vitro*, interferon-tau synthesis by the conceptus, endometrial progesterone concentration on days 9 and 15 of pregnancy and associated rates of embryo wastage in ewes. *Theriogenology*, 52: 1203-1213.
- Acero-Camelo A, Valencia E, Rodríguez A, Randel PF, 2008.** Effects of *flushing* with two energy levels on goat reproductive performance. *Livestock Research for Rural Development*, 20: Article #136.
- Adam CL, Mercer JG, 2004.** Appetite regulation and seasonality: implications for obesity. *Proceedings of the Nutrition Society*, 63: 413-419.
- Adam CL, Findlay PA, Kyle CE, Young P, Mercer JG, 1997.** Effect of chronic food restriction on pulsatile luteinizing hormone secretion and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in castrate male sheep. *Journal of Endocrinology*, 152: 329-337.
- Adam CL, Archer ZA, Miller DW, 2003.** Leptin actions on the reproductive neuroendocrine axis in sheep. *Reproduction*, 61: 283-297.
- Adams NR, Abordi JA, Briegel JR, Sanders MR, 1994.** Effect of diet on the clearance of estradiol- 17β in the ewe. *Biology of Reproduction*, 51: 668-674.
- Adams VL, Goodman RL, Salm AK, Coolen LM, Karsch FJ, Lehman MN, 2006.** Morphological plasticity in the neural circuitry responsible for seasonal breeding in the ewe. *Endocrinology* 147, 4843-4851.

- Ahima RS, 2005.** Central actions of adipocyte hormones. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 16: 307-313.
- Alexander B, Dowd AJ, Wolfson A, 1970.** Effects of prepuberal hypophysectomy and ovariectomy on hydroxyindole-0-methyltransferase activity in the female rat. *Endocrinology*, 86: 1166-1168.
- Allden WG, 1979.** Undernutrition of the Merino sheep and its sequelae: V. The influence of severe growth restriction during early post-natal life on reproduction and growth in later life. *Australian Journal of Agricultural Research*, 30: 939-948.
- Amsterdam A, Koch Y, Lieberman ME, Lindner HR, 1975.** Distribution of binding sites for human chorionic gonadotropin in the preovulatory follicle of the rat. *Journal of Cell Biology*, 67: 894-900.
- Anderson RA, Mitchell R, 1985.** Evidence for GABA_B autoreceptors in median eminence. *European Journal of Pharmacology*, 118: 355-358.
- Anderson ST, Walsh JP, Tillet Y, Clarke IJ, Curlewis JD, 2001.** Dopaminergic input to the ventromedial hypothalamus facilitates the oestrogen-induced luteinizing hormone surge in ewes. *Neuroendocrinology*, 73: 91-101.
- Araki T, Kiyama H, Tohyama M, 1992.** The GABA_A receptor γ_1 subunit is expressed by distinct neuronal populations. *Molecular Brain Research*, 15: 121-132.
- Arellano V, Aguilar J, Moreno S, Sánchez D, Duarte G, Malpaux S, Delgadillo JA, 2001.** El inicio de la estación sexual en las hembras caprinas de la comarca Lagunera se debe al establecimiento del estado fotorefractario a los días largos. XLIV Congreso Nacional de la Sociedad mexicana de Ciencias Fisiológicas, Monterrey, Nuevo León (México): A28.
- Arendt J, 1995.** Physiology of the pineal: Role in photoperiodic seasonal functions. En: Arendt J (ed), *Journal of Melatonin and the Mammalian Pineal Gland*. London, Ed. Chapman & Hall, pp. 110-158.
- Arendt J, Symons AM, Laud CA, 1981.** Pineal function and photoperiod in the ewe. En: *Photoperiodism and Reproduction in Vertebrates*. International Colloquium, INRA, Nouzilly, France, 24-25 September 1981, INRA, Versailles, France, pp. 219-229.
- Arendt J, Laud CA, Symons AM, Pryde SJ, 1983.** Plasma melatonin in ewes after ovariectomy. *Journal of Reproduction and Fertility*, 68: 213-218.

- Argo CM, Smith JS, Kay RNB, 1999.** Seasonal changes of metabolism and appetite in Soay rams. *Animal Science*, 69: 191-202.
- Armstrong DT, 1981.** Prostaglandins and follicular functions. *Journal of Reproduction and Fertility*, 62: 283-291.
- Armstrong SM, Redman JR, 1993.** Melatonin and circadian rhythmicity. En: Yu HS, Reiter RJ (eds), *Melatonin: Biosynthesis, physiological effects, and clinical applications*. Boca Raton, FL: CRC, pp. 187-224.
- Arslan M, Pohl CR, Plant TM, 1988.** DL-2-amino-5-phosphonopentanoic acid, a specific N-methyl-D-aspartic acid receptor antagonist, suppresses pulsatile LH release in rat. *Neuroendocrinology*, 47: 465-468.
- Attanasio A, Rager K, Gupta D, 1986.** Ontogeny of circadian rhythmicity for melatonin, serotonin, and N-acetylserotonin in humans. *Journal of Pineal Research*, 3: 251-256.
- Baird DT, Scaramuzzi RJ, 1976.** Changes in the secretion of ovarian steroids and pituitary luteinizing hormone in the peri-ovulatory period in the ewe: the effect of progesterone. *Journal of Endocrinology*, 70: 237-245.
- Baird DT, Land RB, Scaramuzzi RJ, Wheeler AG, 1976.** Endocrine changes associated with luteal regression in the ewe: the secretion of ovarian oestradiol, progesterone and androstenedione and uterine prostaglandin F₂ α throughout the oestrous cycle. *Journal of Endocrinology*, 69: 275-286.
- Baird DT, Swanston IA, McNeilly AS, 1981.** Relationship between LH, FSH, and prolactin concentration and the secretion of androgens and estrogens by the preovulatory follicle in the ewe. *Biology of Reproduction*, 24: 1013-1025.
- Baird DT, Campbell BK, Mann GE, McNeilly AS, 1991.** Inhibin and oestradiol in the control of FSH secretion in the sheep. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 43: 125-138.
- Banks WA, Kastin AJ, Huang W, Jaspan JB, Maness LM, 1996.** Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides*, 17: 305-311.
- Barenton B, Ravault JP, Chabanet C, Daveau A, Pelletier J, Ortavant R, 1988.** Photoperiodic control of growth hormone secretion on body weight. *Domestic Animal Endocrinology*, 5: 247-255.
- Baril G, Chemineau P, Cognié Y, Guérin Y, Leboeuf B, Orgeur P, Vallet JC, 1993.** Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins. En: FAO (ed) *Production et santé animales*. No. 83.

- Barker-Gibb ML, Scott CJ, Boublik JH, Clarke IJ, 1995.** The role of neuropeptide Y (NPY) in the control of LH secretion in the ewe with respect to season, NPY receptor subtype and the site of action in the hypothalamus. *Journal of Endocrinology*, 147: 565-579.
- Barrell GK, Moenter SM, Caraty A, Karsch FJ, 1992.** Seasonal changes of gonadotropin releasing hormone secretion in the ewe. *Biology of Reproduction*, 46: 1130-1135.
- Barrett P, Schuster C, Mercer J, Morgan PJ, 2003.** Sensitization: a mechanism for melatonin action in the *pars tuberalis*. *Journal of Neuroendocrinology*, 15: 415-421.
- Bartness TJ, Powers JB, Hastings MH, Bittman EL, Goldman BD, 1993.** The timed infusion paradigm for melatonin delivery: what has it taught us about the melatonin signal, its reception, and the photoperiodic control of seasonal responses? *Journal of Pineal Research*, 15: 161-190.
- Bartsch C, Bartsch H, 2006.** The anti-tumor activity of pineal melatonin and cancer enhancing life styles in industrialized societies. *Cancer Causes Control*, 17: 559-571.
- Bassett JM, 1974.** Diurnal patterns of plasma insulin, growth hormone, corticosteroid and metabolite concentrations in fed and fasted sheep. *Australian Journal of Biological Sciences*, 27: 167-181.
- Bechgaard E, Lindhardt K, Martinsen L, 1999.** Intranasal absorption of melatonin *in vivo* bioavailability study. *International Journal of Pharmaceutics*, 182: 1-5.
- Bergendahl M, Wiemann JN, Clifton DK, Huhtaniemi I, Steiner RA, 1992.** Short-term starvation decreases POMC mRNA but does not alter GnRH mRNA in the brain of adult male rats. *Neuroendocrinology*, 56: 913-920.
- Bertrand F, Thiéry J, Picard S, Malpoux B, 1999.** Implication of D2-like dopaminergic receptors in the median eminence during the establishment of long-day inhibition of LH secretion in the ewe. *Journal of Endocrinology*, 163: 243-254.
- Beverly JL, de Vries MG, Beverly MF, Arseneau LM, 2000.** Norepinephrine mediates glucoprivic-induced increase in GABA in the ventromedial hypothalamus of rats. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 279: 990-996.

- Bindon BM, Blanc MR, Pelletier J, Terqui M, Thimonier J, 1979.** Periovulatory gonadotrophin and ovarian steroid patterns in sheep of breeds with differing fecundity. *Journal of Reproduction and Fertility*, 55: 15-25.
- Bissonnette TH, 1941.** Experimental modification of breeding cycles on goats. *Physiological Zoology*, 14: 379-383.
- Bister JL, Paquay R, 1983.** Fluctuations in the plasma levels of the follicle-stimulating hormone during the oestrus cycle, gestation and lactation in the ewe: evidence for an endogenous rhythm of FSH release. *Theriogenology*, 19: 565-582.
- Bittman EL, 1993.** The sites and consequences of melatonin binding in mammals. *American Zoologist*, 33: 200-211.
- Bittman EL, Karsch FJ, 1984.** Nightly duration of melatonin secretion determines the reproductive response of inhibitory day length in the ewe. *Biology of Reproduction*, 30: 585-593.
- Bittman EL, Weaver DR, 1990.** Distribution of melatonin receptors in neuroendocrine tissues of the ewe. *Biology of Reproduction*, 43: 986-993.
- Bittman EL, Dempsey RJ, Karsch FJ, 1983.** Pineal melatonin secretion drives the reproductive response to daylength in the ewe. *Endocrinology*, 113: 2276-2283.
- Bittman EL, Kaynard AH, Olster DH, Robinson JE, Yellon SM, Karsch FJ, 1985.** Pineal melatonin mediates photoperiodic control of pulsatile luteinizing hormone secretion in the ewe. *Neuroendocrinology*, 40: 409-418.
- Bizelis JA, Deligeorgis SG, Rogdakis E, 1990.** Puberty attainment and reproductive characteristics in ewe lambs of Chios and Karagouniki breeds raised on two planes of nutrition. *Animal Reproduction Science*, 23: 197-212.
- Bjersing L, Hay MF, Kann G, Moor RM, Naftolin F, Scaramuzzi RJ, Short RV, Younglai EV, 1972.** Changes in gonadotrophins, ovarian steroids and follicular morphology in sheep at oestrus. *Journal of Endocrinology*, 52: 465-479.
- Blache D, Martin GB, 2009.** Focus feeding to improve reproductive performance in male and female sheep and goats – How it works and strategies for using it. *Nutritional and foraging ecology of sheep and goats. Options Méditerranéennes*, A/ n°85: 351-364.
- Blache D, Fabre-Nys CJ, Venier G, 1991.** Ventromedial hypothalamus as a target for oestradiol action on proceptivity, receptivity and luteinizing hormone surge of the ewe. *Brain Research*, 546: 241-249.

- Blache D, Chagas LM, Blackberry MA, Vercoe PE, Martin GB, 2000.** Metabolic factors affecting the reproductive axis in male sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*, 120: 1-11.
- Blache D, Adam CL, Martin GB, 2002.** The mature male sheep: A model to study the effects of nutrition on the reproductive axis. En: Skinner DC, Evans NP, Dberska C (eds), *Large Mammals as Neuroendocrine Models*, Society for Reproduction and Fertility, Cambridge, *Reproduction Supplement*, 59: 219-233.
- Blache D, Chagas LM, Martin GB, 2007.** Nutritional inputs into the reproductive neuroendocrine control system - A multidimensional perspective. En: Juengel JI, Murray JF, Smith MF (eds), *Reproduction in Domestic Ruminants VI*. Nottingham, UK: Nottingham University Press, pp. 123-139.
- Blake CA, 1974.** Effects of intravenous infusion of catecholamines on rat plasma luteinizing hormone and prolactin concentrations. *Endocrinology*, 98: 99-104.
- Blask DE, 1993.** Melatonin in oncology. En: Yu HS, Reiter RJ (eds), *Melatonin: Biosynthesis, physiological effects, and clinical applications*. Boca Raton, FL: CRC, pp. 447-476.
- Blazynski C, Dubocovich ML, 1991.** Localization of 2-[125I]iodomelatonin binding sites in mammalian retina. *Journal of Neurochemistry*, 56: 1873-1880.
- Boadle-Biber MC, 1993.** Regulation of serotonin synthesis. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 60: 1-15.
- Bocquier F, Leboeuf B, Rouel J, Chilliard Y, 1998.** Effet de l'alimentation et des facteurs d'élevage sur les performances de reproduction de chevrettes Alpines. *INRA Productions Animales*, 11: 311-320.
- Bodin L, Dion S, Malpoux B, Bouvier F, Caillat H, Baril G, Leboeuf B, Manfredi E, 2007.** Sexual seasonality of Alpine and Creole goats and maintained without reproduction. 58th Annual Meeting of the European Association for Animal Production, Dublin, Ireland, Session 25, Poster 21.
- Bogusz AL, Hardy SL, Lehman MN, Connors JM, Hileman SM, Sliwowska JH, Billings HJ, McManus CJ, Valent M, Singh SR, Nestor CC, Coolen LM, Goodman RL, 2008.** Evidence that γ -amino butyric acid is part of the neural circuit mediating estradiol negative *feedback* in anestrus ewes. *Endocrinology*, 149: 2762-2772.
- Bonavera JJ, Kalra SP, Kalra PS, 1993.** Evidence that luteinizing hormone suppression in response to inhibitory neuropeptides, β -endorphin, interleukin-1 β ,

- and neuropeptide-K, may involve excitatory amino acids. *Endocrinology*, 133: 178-182.
- Borjigin J, Li X, Snyder SH, 1999.** The pineal gland and melatonin: molecular and pharmacologic regulation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 39: 53-65.
- Borjigin J, Zhang LS, Calinescu AA, 2012.** Circadian regulation of pineal gland rhythmicity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 349: 13-19.
- Bourguignon JP, Gerard A, Franchimont P, 1989.** Direct activation of gonadotrophin-hormone releasing hormone secretion through different receptors to neuroexcitatory amino acids. *Neuroendocrinology*, 49: 402-408.
- Branca A, Santucci PM, Cabiddu A, Decandia M, Fruttero G, 1997.** Activité ovarienne des chèvres en élevage sur arcours: Etude de l'influence de l'époque de mise-bas et de la conduite des mâles en Sardaigne et en Corse. En: 4èmes Rencontres Recherches Ruminants, Vol. 4, Paris (France), 4-5 décembre 1997, pp. 161.
- Brooks AN, Lamming GE, Lees PD, Haynes NB, 1986.** Opioid modulation of LH secretion in the ewe. *Journal of Reproduction and Fertility*, 76: 693-708.
- Brooks J, McNeilly AS, 1996.** Regulation of gonadotrophin-releasing hormone receptor expression in the ewe. *Animal Reproduction Science*, 42: 89-98.
- Bubenik GA, 2002.** Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance. *Digestive Diseases and Sciences*, 47: 2336-2348.
- Burkhardt S, Tan DX, Manchester LC, Hardeland R, Reiter RJ, 2001.** Detection and quantification of the antioxidant melatonin in Montmorency and Balaton tart cherries (*Prunus cerasus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 4898-4902.
- Cajochen C, Krauchi K, Wirz-Justice A, 2003.** Role of melatonin in the regulation of human circadian rhythms and sleep. *Journal of Neuroendocrinology*, 15: 432-437.
- Caldani M, Batailler M, Thiéry JC, Dubois MP, 1988.** LHRH-immunoreactive structures in the sheep brain. *Histochemistry*, 89: 129-139.
- Caldani M, Caraty A, Pelletier J, Thiéry JC, Tillet Y, 1993.** LH pulsatile release and its control. En: Thibault C, Levasseur MC, Hunter RHF (eds), *Reproduction in Mammals and Man*. Ellipses, Paris.

- Caldani M, Antoine M, Batailler M, Duittoz A, 1995.** Ontogeny of GnRH systems. *Journal of Reproduction and Fertility*, 4: 147-162.
- Campbell BK, Dobson H, Scaramuzzi RJ, 1998.** Ovarian function in ewes made hypogonadal with GnRH antagonist and stimulated with FSH in the presence or absence of low amplitude LH pulses. *Journal of Endocrinology*, 156: 213-222.
- Campbell BK, Dobson H, Baird DT, Scaramuzzi RJ, 1999.** Examination of the relative role of FSH and LH in the mechanism of ovulatory follicle selection in sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*, 117: 355-367.
- Caraty A, Skinner DC, 1999.** Progesterone priming is essential for the full expression of the positive *feedback* effect of estradiol in inducing the preovulatory gonadotropin-releasing hormone surge in the ewe. *Endocrinology*, 140: 165-170.
- Caraty A, Locatelli A, Schanbacher B, 1987.** Augmentation par la naloxone de la fréquence et de l'amplitude des pulses de LHRH dans le sang porte hypothalamo-hypophysaire chez le bélier castré. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris*, 305: 369-374.
- Carcangiu V, Vacca GM, Parmeggiani A, Mura MC, Bini PP, 2005.** Blood melatonin levels relating to the reproductive activity of Sarda does. *Small Ruminant Research*, 59: 7-13.
- Cardinali DP, Rosner JM, 1971.** Metabolism of serotonin by the rat retina *in vitro*. *Journal of Neurochemistry*, 18: 1769-1770.
- Carreau S, Bourguiba S, Lambard S, Galeraud-Denis I, Genissel C, Levallet J, 2002.** Reproductive system: aromatase and estrogens. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 193: 137-143.
- Carrillo-Vico A, Calvo JR, Abreu P, Lardone PJ, García-Mauriño S, Reiter RJ, Guerrero JM, 2004.** Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18: 537-539.
- Chalivoix S, Bagnolini A, Caraty A, Cognié J, Malpoux B, Dufourny L, 2010.** Effects of photoperiod on kisspeptin neuronal populations of the ewe diencephalon in connection with reproductive function. *Journal of Neuroendocrinology*, 22: 110-118.
- Champier J, Claustrat B, Besançon R, Eymin C, Killer C, Jouvét A, Chamba G, Fèvre-Montange M, 1997.** Evidence for tryptophan hydroxylase and hydroxy-

- indol-O-methyl-transferase mRNAs in human blood platelets. *Life Sciences*, 60: 2191-2197.
- Chang DC, Reppert SM, 2001.** The circadian clocks of mice and men. *Neuron*, 29: 555-558.
- Chattoraj A, Liu T, Zhang LS, Huang Z, Borjigin J, 2009.** Melatonin formation in mammals: *in vivo* perspectives. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 10: 237-243.
- Chelikani PK, Glimm DR, Kennelly JJ, 2003.** Tissue distribution of leptin and leptin receptor mRNA in the bovine. *Journal Dairy Science*, 86: 2369-2372.
- Chemineau P, Delgadillo JA, 1994.** Neuroendocrinología de la reproducción en el caprino. *Revista Latinoamericana de Pequeños Rumiantes*, 1: 85-101.
- Chemineau P, Gauthier D, Poirier JC, Saumande J, 1982.** Plasma levels of LH, FSH, prolactin, oestradiol-17beta and progesterone during natural and induced oestrus in the dairy goat. *Theriogenology*, 17: 313-323.
- Chemineau P, Normant F, Ravault JP, Thimonier J, 1986.** Induction and persistence of pituitary and ovarian activity in the out-of-season lactating dairy goat after a treatment combining a skeleton photoperiod, melatonin and the male effect. *Journal of Reproduction and Fertility*, 78: 497-504.
- Chemineau P, Martin EB, Saumade J, Normant E, 1988.** Seasonal and hormonal control of pulsatile LH secretion in the dairy goat (*Capra hircus*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 83: 91-98.
- Chemineau P, Daveau A, Maurice F, Delgadillo JA, 1992a.** Seasonality of oestrus and ovulation is not modified by subjecting female Alpine goats to tropical photoperiod. *Small Ruminant Research*, 8: 299-312.
- Chemineau P, Malpoux B, Delgadillo JA, Guérin Y, Ravault JP, Thimonier J, Pelletier J, 1992b.** Control of sheep and goat reproduction: use of light and melatonin. *Animal Reproduction Science*, 30: 157-184.
- Chemineau P, Maurice F, Daveau A, 1993.** Re-initiation of ovulatory activity by melatonin given as a constant release implant longday treated Ile-de-France ewes, depends on endogenous secretion of melatonin. En: Touitou Y, Arendt J, Pévet P (eds), *Melatonin and the Pineal Gland-From Basic Science to Clinical Application*. París: Elsevier, pp. 247-50.

- Chemineau P, Beltrán de Heredia I, Daveau A, Bodin L, 1996.** High repeatability of the amplitude and duration of the nycthemeral rhythm of the plasma melatonin concentrations in Ile-de-France ewes. *Journal Pineal Research*, 21:1-6.
- Chemineau P, Guillaume D, Migaud M, Thiéry JC, Pellicer-Rubio MT, Malpaux B, 2008.** Seasonality of reproduction in mammals: intimate regulatory mechanisms and practical implications. *Reproduction in Domestic Animals*, 43: 40-47.
- Chemineau P, Bodin L, Migaud M, Thiéry JC, Malpaux B, 2010.** Neuroendocrine and genetic control of seasonal reproduction in sheep and goats. *Reproduction in Domestic Animals*, 45: 42-49.
- Chentouf M, Bister JL, Boulanouarc B, 2011.** Reproduction characteristics of North Moroccan indigenous goats. *Small Ruminant Research*, 98: 185-188.
- Chilliard Y, Bocquier F, Doreau M, 1998.** Digestive and metabolic adaptations of ruminants to undernutrition, and consequences on reproduction. *Reproduction, Nutrition and Development*, 38: 131-152.
- Chilliard Y, Delavaud C, Bonnet M, 2005.** Leptin expression in ruminants: Nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. *Domestic Animal Endocrinology*, 29: 3-22.
- Clarke IJ, 1988.** Gonadotrophin releasing hormone secretion (GnRH) in anoestrous ewes and the induction of GnRH surges by oestrogen. *Journal of Endocrinology*, 117: 355-360.
- Clarke IJ, 2002.** Two decades of measuring GnRH secretion. *Reproduction Supplement*, 59: 1-13.
- Clarke IJ, Cummins JT, 1982.** The temporal relationship between gonadotropin releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone (LH) secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinology*, 116: 2376-2383.
- Clarke IJ, Cummings JT, 1985.** GnRH pulse frequency determines LH pulse amplitude by altering the amount of releasable LH in the pituitary glands of ewes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 73: 425-431.
- Clarke IJ, Tilbrook AJ, 1992.** Influence of non-photoperiodic environmental factors on reproduction in domestic animals. *Animal Reproduction Science*, 28: 219-228.
- Clarke IJ, Henry BA, 1999.** Leptin and reproduction. *Reviews of Reproduction*, 4: 48-55.

- Clarke IJ, Smith JT, 2010.** The role of kisspeptin and gonadotropin inhibitory hormone (GnIH) in the seasonality of reproduction in sheep. *Society for Reproduction and Fertility Supplement*, 67: 159-169.
- Clarke IJ, Thomas GB, Yao B, Cummins JT, 1987.** GnRH secretion through the ovine estrous cycle. *Neuroendocrinology*, 46: 82-88.
- Clarke IJ, Scott CJ, Rao A, Ponpolo S, Barker-Gibb ML, 2000.** Seasonal changes in the expression of neuropeptide Y and pro-opiomelanocortin mRNA in the arcuate nucleus of the ovariectomized ewe: relationship to the seasonal appetite and breeding cycles. *Journal of Neuroendocrinology*, 12: 1105-1111.
- Clarke IJ, Smith JT, Caraty A, Goodman RL, Lehman MN, 2009.** Kisspeptin and seasonality in sheep. *Peptides*, 30: 154-163.
- Claustrat B, Brun J, Chazot G, 2005.** The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Medicine Reviews*, 9: 11-24.
- Collin J, Arendt J, Gern WA, 1988.** Le "Troisième Oeil". *La Recherche*, Vol 203, pp. 1154-1165.
- Collin J, Voisin P, Falcon J, Faure JP, Brisson P, Defaye JR, 1989.** Pineal transducers in the course of evolution: molecular organization, rhythmic metabolic activity and role. *Archives of Histology and Cytology*, 52: 441-449.
- Coon ST, Zarazaga LA, Malpaux B, Ravault J, Bodin L, Vosin P, Weller JL, Klein DC, Chemineau P, 1999.** Genetic variability in plasma melatonin in sheep is due to pineal weight, not to variations in enzyme activities. *Animal Journal of Physiology*, 277: 792-797.
- Cronin MJ, Roberts JM, Weiner RI, 1978.** Dopamine and dihydroergocryptine binding to the anterior pituitary and other brain areas of the rat and sheep. *Endocrinology*, 103: 302-309.
- Cunningham MJ, Clifton DK, Steiner RA, 1999.** Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. *Biology of Reproduction*, 60: 216-222.
- Currie DW, Cook SJ, Rawlings NC, 1991.** LH secretion in ovariectomized ewes: effects of morphine and ovarian steroid interactions with naloxone during the breeding season and anestrus. *Canadian Journal of Animal Science*, 71: 333-342.
- D'Occhio MJ, Suttie JM, 1992.** The role of the pineal gland and melatonin in reproduction in male domestic ruminants. *Animal Reproduction Science*, 30: 135-155.

- Da Silva P, Aitken RP, Brooks AN, Rhind SM, Wallace JM, 1998.** Perturbed pituitary gonadotrophin gene expression and gonadal development in growth restricted fetal lambs at day 128 of gestation. *Journal of Reproduction and Fertility. Abstract Series*, 22: 10.
- Daghigh Kia H, Mohamadi Chapdareh W, Hossein Khani A, Moghaddam G, Rashidi A, Sadri H, Alijani S, 2011.** Effects of *flushing* and hormonal treatment on reproductive performance of Iranian Markhoz goats. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition (Berl)*, doi: 10.1111/j.1439-0396.2011.01234.x.
- Dahl GE, Evans NP, Moenter SM, Karsch FJ, 1994.** The thyroid gland is required for reproductive neuroendocrine responses to photoperiod in the ewe. *Endocrinology*, 135: 10-15.
- Dahl GE, Evans NP, Thrun LA, Karsch FJ, 1995.** Thyroxine is permissive to seasonal transition in reproductive neuroendocrine activity in the ewe. *Biology of Reproduction*, 52: 690-696.
- Daya S, Potgieter B, 1982.** Effects of sex steroids on pineal enzymes. *South African Journal of Science*, 78: 174-174.
- De Castro T, Rubianes E, Menchaca A, Rivero A, 1999.** Ovarian dynamics, serum estradiol and progesterone concentrations during the interovulatory interval in goats. *Theriogenology*, 52: 399-411.
- De Santiago-Miramontes MA, Rivas-Muñoz R, Muñoz-Gutiérrez M, Malpaux B, Scaramuzzi RJ, Delgadillo JA, 2008.** The ovulation rate in anoestrous female goats managed under grazing conditions and exposed to the male effect is increased by nutritional supplementation. *Animal Reproduction Science*, 105: 409-416.
- De Santiago-Miramontes MA, Malpaux B, Delgadillo JA, 2009.** Body condition is associated with a shorter breeding season and reduced ovulation rate in subtropical goats. *Animal Reproduction Science*, 114: 175-182.
- De Santiago-Miramontes MA, Luna-Orozco JR, Meza-Herrera CA, Rivas-Muñoz R, Carrillo E, Véliz-Deras FG, Mellado M, 2011.** The effect of *flushing* and *stimulus* of estrogenized does on reproductive performance of anovulatory-range goats. *Tropical Animal Health and Production*, 43: 1595-1600.

- Deaver DR, Dailey RA, 1982.** Effects of dopamine and serotonin on plasma concentrations of luteinizing hormone and prolactin in ovariectomized ewes. *Biology of Reproduction*, 27: 624-632.
- Delgadillo JA, Malpaux B, Chemineau P, 1997.** La reproduction des caprins dans les zones tropicales et subtropicales. *INRA Productions Animales*, 10: 33-41.
- Delgadillo JA, Canedo GA, Chemineau P, Guillaume D, Malpaux B, 1999.** Evidence for an annual reproductive rhythm independent of food availability in male Creole goats in subtropical northern Mexico. *Theriogenology*, 52: 727-737.
- Delgadillo JA, Carrillo E, Morán J, Duarte G, Chemineau P, Malpaux B, 2001.** Induction of sexual activity of male creole goats in subtropical northern Mexico using long days and melatonin. *Journal of Animal Science*, 79: 2245-2252.
- Delgadillo JA, Cortés ME, Duarte G, Chemineau P, Malpaux B, 2004a.** Evidence that the photoperiod controls the annual changes in testosterone secretion, testicular and body weight in subtropical male goats. *Reproduction, Nutrition and Development*, 44: 183-193.
- Delgadillo JA, Fitz-González G, Duarte G, Véliz FG, Carrillo E, Flores JA, Vielma J, Hernández H, Malpaux B, 2004b.** Management of photoperiod to control caprine reproduction in the subtropics. *Reproduction, Fertility and Development*, 16: 471-478.
- Delgadillo JA, De La Torre-Villegas S, Arellano-Solis V, Duarte G, Malpaux B, 2011.** Refractoriness to short and long days determines the end and onset of the breeding season in subtropical goats. *Theriogenology*, 76: 146-1151.
- Delouis CL, Richard PH, 1993.** Lactation. En: Thibault C, Levasseur MC, Hunter RHF (eds), *Reproduction in Mammals and Man*. Ellipses, París.
- Demoulin A, Verstraelen-Proyard J, Bourguignon JP, Hustin J, Koulischer L, Bologne R, Franchimont P, 1980.** Origine et site d'action de l'inhibine. *Annual of Endocrinology*, 41: 291-302.
- Devenson SL, Arendt J, Forsyth IA, 1992.** The influence of the pineal gland and melatonin on the reproductive performance of domesticated female ungulates. *Animal Reproduction Science*, 30: 113-134.
- Djiane J, Kelly PA, 1993.** Prolactin. En: Thibault C, Levasseur MC, Hunter RHF (eds), *Reproduction in Mammals and Man*. Ellipses, París.
- Dollins AB, Zhdanova IV, Wurtman RJ, Lynch HJ, Deng MH, 1994.** Effect of inducing nocturnal serum melatonin concentrations in daytime on sleep, mood,

- body temperature, and performance. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 91: 1824-1828.
- Domanski E, Przekop F, Skubiszewski B, Wolinska E, 1975.** The effect and site of action of indoleamines on the hypothalamic centers involved in the control of LH release and ovulation in sheep. *Neuroendocrinology*, 17: 265-273.
- Domanski E, Chomicka LK, Ostrowska A, Gajewska A, Mateusiak K, 1991.** Release of luteinizing-hormone-releasing hormone, β -endorphin and noradrenaline by the nucleus infundibularis/median eminence during periovulatory period in the sheep. *Neuroendocrinology*, 54: 151-158.
- Dowell SF, Lynch GR, 1987.** Duration of the melatonin pulse in the hypothalamus controls testicular function in pinealectomized mice (*Peromyscus leucopus*). *Biology of Reproduction*, 36: 1095-1101.
- Downs SM, Longo FJ, 1983.** Effects of indomethacin on oocyte maturation in mice. En: Greenwald GS, Terranova PF (eds), *Factors Regulating Ovarian Function*. New York: Raven Press, pp. 65-69.
- Driancourt MA, Royère D, Hédon B, Levasseur MC, 1993.** Oestrus and menstrual cycle. En: Thibault C, Levasseur MC, Hunter RHF (eds), *Reproduction in Mammals and Man*. Ellipses, París.
- Duarte G, Flores JA, Malpaux B, Delgadillo JA, 2008.** Reproductive seasonality in female goats adapted to a subtropical environment persists independently of food availability. *Domestic Animal Endocrinology*, 35: 362-370.
- Duarte G, Nava-Hernández MP, Malpaux B, Delgadillo JA, 2010.** Ovulatory activity of female goats adapted to the subtropics is responsive to photoperiod. *Animal Reproduction Science*, 120: 65-70.
- Dubocovich ML, Takahashi JS, 1987.** Use of 2-[125I]iodomelatonin to characterize melatonin binding sites in chicken retina. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 84: 3916-3920.
- Dubois P, 1993.** The hypothalamic-pituitary axis. En: Thibault C, Levasseur MC, Hunter RHF (eds), *Reproduction in Mammals and Man*. Ellipses, París.
- Ducker MJ, Bowman JC, Temple A, 1973.** The effect of constant photoperiod on the expression of oestrus in the ewe. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 19: 143-150.

- Duncan MJ, Goldman BJ, 1984.** Hormonal regulation of the annual pelage color cycle in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). II. Role of prolactin. *Journal of Experimental Zoology*, 230: 97-103.
- Duncan MJ, Takahashi JS, Dubocovich ML, 1989.** Characteristics and autoradiographic localization of 2-[125I]iodomelatonin binding sites in Djungarian hamster brain. *Endocrinology*, 125: 1011-1018.
- Duvernoy HM, Parratte B, Tatu L, Vuillier F, 2000.** The human pineal gland: relationships with surrounding structures and blood supply. *Neurology Research*, 22: 747-790.
- Dyrmondsson OR, 1987.** Advancement of puberty in male and female sheep. En: Marai IFM, Owen JB (eds), *New techniques in Sheep Production*. Butterworths, London, pp. 65-76.
- Ebling FJP, 2010.** Photoperiodic regulation of puberty in seasonal species. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 324: 95-101.
- Ebling FJ, Lincoln GA, Wollnik F, Anderson N, 1988.** Effects of constant darkness and constant light on circadian organization and reproductive responses in the ram. *Journal of Biological Rhythms*, 3: 365-384.
- Ebling FJP, Schwartz ML, Foster DL, 1989.** Endogenous opioid regulation of pulsatile LH secretion during sexual maturation in the female sheep. *Endocrinology*, 125: 369-383.
- Ebling FJP, Wood RI, Karsch FJ, Vannerson LA, Suttie JM, Bucholtz DC, Scball RE, Foster DL, 1990.** Metabolic interfaces between growth and reproduction. 111. Central mechanisms controlling pulsatile luteinizing hormone secretion in the nutritionally growth-limited female lamb. *Endocrinology*, 126: 2719-2727.
- Eisermann JH, Bauman DE, Hogue DE, Tavis HF, 1984.** Evaluation of a role for prolactin in growth and the photoperiod-induced growth response in sheep. *Journal of Animal Science*, 59: 86-94.
- Emesih GC, Newton GR, Teh TH, Zia JH, 1993.** Effects of photoperiod and continuous administration of melatonin on plasma concentrations of prolactin in cashmere goats. *Small Ruminant Research*, 11: 247-256.
- English J, Arendt J, Poulton A, Symons AM, 1987.** Short-term variations of circulating melatonin in the ewe. *Journal of Pineal Research*, 4: 359-366.

- Eppig JJ, 1981.** Prostaglandin E₂, stimulates cumulus expansion and hyaluronic acid synthesis by cumuli oophori isolated from mice. *Biology of Reproduction*, 25: 191-195.
- Estienne MJ, Schillo KK, Hileman SM, Green MA, Hayes SH, Boling JA, 1990.** Effect of N-methyl-D,L-aspartate on luteinizing hormone secretion in ovariectomized ewes in the absence and presence of estradiol. *Biology of Reproduction*, 42: 126-130.
- Estienne MJ, Barb CR, Kraeling RR, 2000.** Neuroendocrine regulation of reproduction in male domestic animal species: Role of excitatory amino acids. *Journal of Animal Science*, 77: 1-10.
- Estrada KM, Clay CM, Pompolo S, Smith JT, Clarke IJ, 2006.** Elevated Kiss-1 expression in the arcuate nucleus prior to the cyclic preovulatory gonadotrophin-releasing hormone/lutenising hormone surge in the ewe suggests a stimulatory role for kisspeptin in oestrogen-positive *feedback*. *Journal of Neuroendocrinology*, 18: 806-809.
- Evans AC, 2003.** Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. *Reproduction of Domestic Animals*, 38: 240-246.
- Fabre-Nys C, Blache D, Hinton MR, Goode JA, Kendrick KM, 1994.** Microdialysis measurement of neurochemical changes in the mediobasal hypothalamus of ovariectomized ewes during oestrus. *Brain Research*, 649: 282-296.
- Fasanya OOA, Molokwu ECI, Eduvie LO, Dim NI, 1992.** Dietary supplementation in the Savanna Brown goat. 1. Effect on attainment of puberty in the doe. *Animal Reproduction Science*, 29: 157-166.
- Fatet A, Pellicer-Rubio M-T, Leboeuf B, 2010.** Reproductive cycle of goats. *Animal Reproduction Science*, 124: 211-219.
- Favit A, Wetsel WC, Negro-Vilar A, 1993.** Differential expression of γ -aminobutyric acid receptors in immortalized luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Endocrinology*, 133: 1983-1989.
- Feleder C, Jarry H, Leonhardt S, Wuttke W, Moguilevsky JA, 1996.** The GABAergic control of gonadotropin-releasing hormone secretion in male rats during sexual maturation involves effects on hypothalamic excitatory and inhibitory amino acid systems. *Neuroendocrinology*, 64: 305-312.
- Fernstrom JD, Wurtman RJ, 1972.** Brain serotonin content: physiological regulation by plasma neutral amino acids. *Science*, 178: 414-416.

- Ferreira SA, Scott CJ, Kuehl DE, Jackson GL, 1996.** Differential regulation of luteinizing hormone release by γ -aminobutyric acid receptor subtypes in the arcuate-ventromedial region of the castrated ram. *Endocrinology*, 137: 3453-3460.
- Ferreira SA, Hileman SM, Kuehl DE, Jackson GL, 1998.** Effects of dialyzing γ -aminobutyric acid receptor antagonists into the medial preoptic and arcuate ventromedial region on luteinizing hormone release in male sheep. *Biology of Reproduction*, 58: 1038-1046.
- Ferry G, Ubeaud C, Lambert PH, Bertin S, Cogé F, Chomarot P, Delagrance P, Serkiz B, Bouchet JP, Truscott RJ, Boutin JA, 2005.** Molecular evidence that melatonin is enzymatically oxidized in a different manner than tryptophan: investigations with both indoleamine 2,3-dioxygenase and myeloperoxidase. *Biochemical Journal*, 388: 205-215.
- Findlay JK, Clarke IJ, 1987.** Regulation of the secretion of FSH in domestic ruminants. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 34: 27-37.
- Findlay JK, Robertson DM, Clarke JJ, Klein R, Doughton BW, Xiao S, Russell DL, Shukovski L, 1992.** Hormonal regulation of reproduction. General concepts. *Animal Reproduction Science*, 28: 319-328.
- Fischer TW, Zmijewski MA, Zbytek B, Sweatman TW, Slominski RM, Wortsman J, Slominski A, 2006.** Oncostatic effects of the indole melatonin and expression of its cytosolic and nuclear receptors in cultured human melanoma cell lines. *International Journal of Oncology*, 29: 665-672.
- Fitz TA, Mayan MH, Sawyer HR, Niswender GD, 1982.** Characterization of two steroidogenic cell types in the ovine corpus luteum. *Biology of Reproduction*, 27: 703-711.
- Fitzgerald BP, Schmidt MJ, 1995.** Absence of association between melatonin and reproductive activity in mares during the nonbreeding season. *Biology of Reproduction*, 1: 425-34.
- Fletcher IC, 1974.** An effect of previous nutritional treatment on the ovulation rate of Merino ewes. *Proceedings of the Australian Society of Animal Production*, 10: 261-264.
- Folch J, Alabart JL, 1999.** Respuesta al efecto macho de ovejas Rasa Aragonesa según su estado cíclico tratadas o no con melatonina en primavera. *ITEA*, 20: 651-653.

- Foldes A, Maxwell CA, Rintoul AJ, Edols RW, 1984.** Sheep pineal β -adrenoceptor function-interaction with γ -aminobutyric acid. *Neuroendocrinology*, 38: 206-211.
- Forcada F, Abecia JA, Sierra I, 1992.** Seasonal changes in oestrus activity and ovulation rate in Rasa Aragonesa ewes maintained at two different body condition levels. *Small Ruminant Research*, 8: 313-324.
- Forcada F, Zarazaga LA, Abecia JA, 1995.** Effect of exogenous melatonin and plane of nutrition after weaning on estrus activity, endocrine status and ovulation rate in Rasa ewes lambing in the seasonal anoestrus. *Theriogenology*, 43: 1179-1193.
- Forcada F, Lozano JM, Abecia JA, Zarazaga LA, 1997.** Control of luteinized hormone secretion in ewes by endogenous opioids and the dopaminergic system during short seasonal anoestrus: role plan of nutrition. *Animal Science*, 65: 217-224.
- Forcada F, Abecia A, Zarazaga LA, Lozano, 2000.** Importancia del fotoperiodo en la regulación de la actividad reproductora. En: *Papel del fotoperiodo y la melatonina en la actividad reproductora. Monografía OVIS, n°71*, pp. 13-32.
- Forcada F, Zúñiga O, Abecia JA, 2002.** The role of nutrition in the regulation of LH secretion during anestrus by serotonergic and dopaminergic systems in Mediterranean ewes treated with melatonin. *Theriogenology*, 58: 1303-1313.
- Foster DL, Yellon SM, Olster DH, 1985.** Internal and external determinants of the timing of puberty in the female. *Journal of Reproduction and Fertility*, 75: 327-344.
- Foster DL, Karsch FJ, Olster DH, Ryan KD, Yellon SM, 1986.** Determinants of puberty in a seasonal breeder. *Recent Progress in Hormone Research*, 42: 331-384.
- Franchimont P, Verstraelen-Proyard J, Hazee-Hagelstein MT, Renard C, Demoulin A, Bourguignon JP, Hustin J, 1979.** Inhibin: from concept to reality. *Vitamins and Hormones*, 37: 243-302.
- Freitas VJF, Lopes-Junior ES, Rondita D, Salmito-Vanderley CSB, Salles HO, Simplicio AA, Baril G, Saumande J, 2004.** Puberty in Anglo-Nubian and Saanen female kids raised in the semi-arid of North-eastern Brazil. *Small Ruminant Research*, 53: 167-172.

- Fuentes VO, Arce C, Ponce H, 1990.** Efecto de la naloxona sobre la secreción pulsátil de LH en la cabra. Memorias del VII Congreso Nacional de la AZTECA 5-8 Dic. Culiacan (Sinaloa), México, 135-141.
- Fuentes VO, González H, Sánchez VM, Fuentes PI, 1997.** Effect of small doses of naloxone on the pulsatile secretion of prolactin in the crossbred ewe during the non-breeding season. *Animal Reproduction Science*, 100: 44-50.
- Fuentes VO, Fuentes P, García A, 1998a.** The effect of naloxone on plasma concentrations of testosterone in male goats. *Small Ruminant Research*, 27: 173-176.
- Fuentes VO, González H, Sánchez V, García A, Fuentes P, 1998b.** The effect of naloxone on the duration of oestrus ovulation rate and oestradiol 17 β in crossbred with induced oestrus during seasonal anoestrus. *Small Ruminant Research*, 29: 89-92.
- Gallegos-Sánchez J, Picard S, Delaleu B, Malpaux B, Thiéry JC, 1996.** Initiation of the estradiol-induced inhibition of pulsatile LH secretion in ewes under long days: comparison of peripheral versus central treatment and neurochemical correlates. *Journal of Endocrinology*, 151: 19-28.
- Gallegos-Sánchez J, Delaleu B, Caraty A, Malpaux B, Thiéry JC, 1997.** Estradiol acts locally within the retrochiasmatic area to inhibit pulsatile luteinizing-hormone release in the female sheep during anestrus. *Biology of Reproduction* 56: 1544-1549.
- Gay VL, Plant TM, 1982.** N-methyl-D,L-aspartate elicits gonadotropin releasing hormone release in prepubertal male rhesus monkeys (*Macaca mulata*). *Endocrinology*, 120: 2289-2296.
- Gayrard V, Malpaux B, Tillet Y, Thiéry JC, 1994.** Estradiol increases tyroxine hydroxylase activity of the A15 nucleus dopaminergic neurons during long days in the ewe. *Biology of Reproduction*, 50: 1168-1177.
- Gazal OS, Kouakou B, Amoah EA, Barb CR, Barrett JB, Gelaye S, 2002.** Effects of N-methyl-D,L-aspartate on LH, GH, and testosterone secretion in goat bucks maintained under long or short photoperiods. *Journal of Animal Science*, 80: 1623-1628.
- Gebbie FE, Forsyth IA, Arendt J, 1999.** Effects of maintaining solstice light and temperature on reproductive activity, coat growth, plasma prolactin and melatonin in goats. *Journal of Reproduction and Fertility*, 116: 25-33.

- Gibbs FP, Vriend J, 1981.** The half-life of melatonin elimination from rat plasma. *Endocrinology*, 109: 1796-1798.
- Ginther OJ, Kot K, 1994.** Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. *Theriogenology*, 42: 987-1001.
- Girou R, Theriez M, Molenat G, Aguer D, 1971.** Influence de la variation de l'apport d'aliments concentrés sur la fécondité de la brebis. *Annales de Zootechnie*, 20: 321-338.
- Gitler MS, Barraclough CA, 1988.** Stimulation of the medullary A1 noradrenergic system augments luteinizing hormone release induced by medial preoptic nucleus stimulation. Evaluation of A1 projections to the hypothalamus and of drugs which affect norepinephrine synthesis and adrenoceptors. *Neuroendocrinology*, 48: 351-359.
- Glass JD, Lynch GR, 1981.** Melatonin: identification of sites of antigonadal action in mouse brain. *Science*, 214: 821-823.
- Goldstein A, Naidu A, 1989.** Multiple opioid receptors: ligand selectivity profiles and binding site signatures. *Molecular Pharmacology*, 36: 265-272.
- Goldman BD, 2001.** Mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. *Journal of Biological Rhythms*, 16: 283-301.
- Gómez-Brunet A, Malpaux B, Chemineau P, 1999.** Genetic variability in plasma melatonin concentration is expressed as early as one week-of age in lambs. 8th Meeting of the European Pineal Society, 3-7 Julio, Tours (Francia).
- Gómez-Brunet A, Malpaux B, Daveau A, Taragnat C, Chemineau P, 2000.** Ontogeny of the genetic variability in plasma concentrations in lambs. Relationship between the number of pinealocytes and the secretion of melatonin. Proceedings ICHBB and SBN Joint Meeting, Madrid. August 5th-9th, pp. 133-135.
- Gómez-Brunet A, Santiago-Moreno J, Chemineau P, Malpaux B, Del Campo A, López-Sebastián A, 2001.** Effect of melatonin implantation at the winter solstice on the end of the breeding season in Mouflon (*Ovis gmelini musimon*) and Manchega sheep (*Ovis aries*). 8^a Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants, París, France. p. 375.

- Gómez-Brunet A, Malpaux B, Daveau A, Taragnat C, Chemineau P, 2002.** Genetic variability in melatonin secretion originates in the number of pinealocytes in sheep. *Journal of Endocrinology*, 172: 397-404.
- Gómez-Brunet A, Santiago-Moreno J, Micheo J, Sánchez A, Gonzáles-Bulnes A, López-Sebastián A, 2003.** Variación anual de la actividad ovulatoria en la cabra de raza Malagueña. *Producción Ovina y Caprina. SEOC*, 28: 178-180.
- Gómez-Brunet A, Santiago-Moreno J, Del Campo A, Malpaux B, Chemineau P, Tortonese DJ, González-Bulnes A, López-Sebastián A, 2008.** Endogenous circannual cycles of ovarian activity and changes in prolactin and melatonin secretion in wild and domestic female sheep maintained under a long-day photoperiod. *Biology of Reproduction* 78: 552-562.
- Gómez-Brunet A, Santiago-Moreno J, Toledano-Díaz A, López-Sebastián A, 2010.** Evidence that refractoriness to long and short daylengths regulates seasonal reproductive transitions in Mediterranean goats. *Reproduction in Domestic Animals*, 45: 338-343.
- Gong JG, Bramley T, Webb R, 1991.** The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: follicular populations and peripheral hormones. *Biology of Reproduction*, 45: 941-949.
- Goodman RL, 1989.** Functional organization of the catecholaminergic neural systems inhibiting luteinizing hormone secretion in anestrus ewes. *Neuroendocrinology*, 50: 406-412.
- Goodman RL, 1996.** Neural systems mediating the negative *feedback* actions of estradiol and progesterone in the ewe. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 6: 727-741.
- Goodman RL, Karsch FJ, 1980.** Pulsatile secretion of luteinizing hormone: differential suppression by ovarian steroids. *Endocrinology*, 107: 1286-1290.
- Goodman LS, Gilman AG, 1990.** *The pharmacological basis of therapeutics*. Pergamon Press. 8^{ava}. Edición.
- Goodman RL, Inskeep EK, 2006.** Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the sheep. En: Knobil E, Neill JD (eds), *Physiology of Reproduction*, 3nd edition, Vol. 2. Elsevier, Academic Press, USA, pp. 2389-2446.
- Goodman RL, Bittman EL, Foster DL, Karsch FJ, 1981.** The endocrine basis of the synergistic suppression of luteinizing hormone by estradiol and progesterone. *Endocrinology*, 109: 1414-1417.

- Goodman R L, Bittman EL, Foster DL, Karsch FJ, 1982.** Alterations in the control of luteinizing hormone pulse frequency underlie the seasonal variation in estradiol negative *feedback* in the ewe. *Biology of Reproduction*, 27: 580-589.
- Goodman RL, Jansen HT, Billings HJ, Coolens LM, Lehman MN, 2010.** Neural systems mediating seasonal breeding in the ewe. *Journal of Neuroendocrinology* 22, 674-681.
- Gordon I, 1997.** *Controlled Reproduction in Sheep and Goats*. Cambridge University Press, Wallingford, UK.
- Gore-Langton RE, Armstrong DT, 1988.** Follicular steroidogenesis and its control. En: Knobil E, Neill JD (eds), *The Physiology of Reproduction*, 2nd edition. Raven Press, New York, pp. 331-385.
- Gougeon A, Testart J, 1990.** Influence of human menopausal gonadotropin on the recruitment of human ovarian follicles. *Fertility and Sterility*, 54: 848-852.
- Gow CB, McDowell GH, Jenkin G, 1983.** The importance of prolactin for initiation of lactation in the pregnant ewe. *Australian Journal of Biological Sciences*, 36: 357-367.
- Greenwald GS, Terranova PF, 1988.** Follicular selection and its control. En: Knobil E, Neill JD (eds), *The Physiology of Reproduction*, 2nd edition. Raven Press, New York, pp. 397-445.
- Greyling JPC, 1988.** Reproductive physiology in the Boer goat doe. Ph.D. Thesis, University of Stellenbosch, South Africa.
- Guerin MV, Deed JR, Matthews CD, 2000.** The coincidence of light and melatonin with a specific phase of the circadian pacemaker is important for the timing of seasonal breeding. *Journal of Biological Rhythms*, 15: 514-523.
- Guerra JC, Thwaites CJ, Edey TN, 1972.** The effects of components of body weight on reproductive efficiency in Merino ewes. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*, 78: 245-249.
- Gunn RG, 1983.** Sheep production. En: Haresign W (ed). *Proceedings of the 35th Easter School in Agricultural Science*. University of Nottingham, London, Butterworths, pp. 99-110.
- Gunn RG, 1986.** A note on the comparative reproductive performance of Friesland X North Country Cheviot and North Country Cheviot ewes on two levels of pasture prior to mating. *Animal Production*, 42: 287-289.

- Gunn RG, Smith WF, Senior AJ, Barthrama E, Sima DA, Hunter EA, 1991.** Pre-mating herbage intake and the reproductive performance of North Country Cheviot ewes in different levels of body condition. *Animal Production*, 52: 149-156.
- Gunn RG, Sim DA, Hunter EA, 1995.** Effects of nutrition in utero and early life on the subsequent lifetime reproductive performance of Scottish Blackface ewes on two management systems. *Animal Science*, 60: 223-230.
- Gutiérrez ME, 2009.** Mecanismos celulares y moleculares de acción del sistema kiss1/kiss1r en la hipófisis. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba, España, pp. 193.
- Hafez ESE, 1952.** Studies on breeding season and reproduction of the ewe. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*, 42: 182-265.
- Han SS, Rajaniemi HJ, Cho MI, Hirshfield AN, Midgley AR Jr, 1974.** Gonadotropin receptors in rat ovarian tissue. II. Subcellular localization of LH binding sites by electron microscopic radioautography. *Endocrinology*, 95: 589-598.
- Hardeland R, 2005.** Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine*, 27: 119-130.
- Hardeland R, Reiter RJ, Poeggeler B, Tan DX, 1993.** The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 17: 347-357.
- Hardie LH, Rayner DV, Holmes S, Trayhurn P, 1996.** Circulating leptin levels are modulated by fasting, cold exposure and insulin administration in lean but not Zucker (*fa/fa*) rats as measured by ELISA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 223: 660-665.
- Hardy SL, Anderson GM, Valent M, Connors JM, Goodman RL, 2003.** Evidence that estrogen receptor alpha, but not beta, mediates seasonal changes in the response of the ovine retrochiasmatic area to estradiol. *Biology of Reproduction*, 68: 846-852.
- Haresign W, 1981.** The influence of nutrition on reproduction in the ewe. The effects of undernutrition on pituitary responsiveness to luteinizing hormone-releasing hormone stimulation. *Animal Production*, 32: 257-260.

- Hauger RL, Karsch FJ, Foster DL, 1977.** A new concept for control of the estrous cycle of the ewe based on the temporal relationships between luteinizing hormone, estradiol and progesterone in peripheral serum and evidence that progesterone inhibits tonic LH secretion. *Endocrinology*, 101: 807-817.
- Havern RL, Whisnant CS, Goodman RL, 1991.** Hypothalamic sites of catecholamine inhibition of luteinizing hormone in the anestrous ewe. *Biology of Reproduction*, 44: 476-482.
- Havern RL, Whisnant CS, Goodman RL, 1994.** Dopaminergic structures in the ovine hypothalamus mediating estradiol negative *feedback* in anestrous ewes. *Endocrinology*, 134: 1905-1914.
- Haynes NB, Laming GE, Yang KP, Brooks AN, Finnie AD, 1989.** Endogenous opioid peptides and farm animal reproduction. *Oxford Reviews of Reproductive Biology*, 11: 111-145.
- Hazlerigg DG, Hastings MN, Morgan PJ, 1994.** The recovery of ovine *pars tuberalis* cells from melatonin-induced sensitization is slow, protein synthesis-dependent phenomenon. *Journal of Endocrinology*, 142: 127-138.
- Heckert LL, Griswold MD, 2002.** The expression of the follicle-stimulating hormone receptor in spermatogenesis. *Recent Progress in Hormone Research*, 57: 129-148.
- Heideman PD, Bronson FH, 1994.** An endogenous circannual rhythm of reproduction in a tropical bat, *Anoura geoffroyi*, is not entrained by photoperiod. *Biology of Reproduction*, 50: 607-614.
- Helliwell RJA, Williams LM, 1992.** Melatonin binding sites in the ovine brain and pituitary: characterization during the oestrus cycle. *Journal of Neuroendocrinology*, 4: 287-294.
- Henniawati H, Fletcher I C, 1986.** Reproduction in Indonesian sheep and goats at two levels of nutrition. *Animal Reproduction Science*, 12: 77-84.
- Henniawati H, Restall BJ, Scaramuzzi RJ, 1995.** Effect of season on LH secretion on ovariectomized Australian cashmere does. *Journal of Reproduction and Fertility*, 103: 349-356.
- Henry BA, Goding JW, Tilbrook AJ, Dunshea FR, Clarke IJ, 2001.** Intracerebroventricular infusion of leptin elevates the secretion of luteinising hormone without affecting food intake in long-term food-restricted sheep, but

- increases growth hormone irrespective of body weight. *Journal of Endocrinology*, 168: 67-77.
- Herbison AE, Heavens RP, Dye S, Dyer RG, 1991.** Acute action of oestrogen on medial preoptic γ -aminobutyric acid neurons: correlation with oestrogen negative *feedback* on luteinizing hormone secretion. *Journal of Neuroendocrinology*, 3: 101-106.
- Herbison AE, Robinson JE, Skinner DC, 1993.** Distribution of estrogen receptorimmunoreactive cells in the preoptic area of the ewe: co-localization with glutamic acid decarboxylase but not luteinizing hormone-releasing hormone. *Neuroendocrinology*, 57: 75-59.
- Hervieu J, Colomer-Rocher F, Branca A, Delfa R, Morand-Fehr P, 1989.** Définition des notes d'état corporel des caprins. Réseaux de recherches. AGRIMED, pp. 5.
- Hickey R, Sloan T, 1996.** Protecting the injured brain and spinal cord. *Anesthesiology Clinics of North America: Trauma* 14: 39-58.
- Hillier SG, 2001.** Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development. *Molecular Cellular Endocrinology*, 179: 39-46.
- Hubel DH, Wiesel TN, 1959.** Receptive fields of single neurones in the cat's striate cortex. *Journal of Physiology*, 148: 574-591.
- Hubel DH, Wiesel TN, 1962.** Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *Journal of Physiology*, 160: 106-154.
- Huether G, 1993.** The contribution of extrapineal sites of melatonin synthesis to circulating melatonin levels in higher vertebrates. *Experientia*, 49: 665-670.
- Hughes J, Smith TW, Kosterlitz HW, Fothergill LA, Morgan BA, Morris HR, 1975.** Identification on two related pentapeptides from de brain with opiate agonis activity. *Nature (London)*, 258: 577-579.
- Hunzicker-Dunn M, Mayo K, 2006.** Gonadotropin signaling in the Ovary. En: Knobil E, Neill JD (eds), *Physiology of Reproduction*, 3nd edition. Elsevier, Academic Press, USA, pp. 2389-2446.
- Hutchinson JSM, Robertson HA, 1966.** The growth of the follicle and corpus luteum in the ovary of the sheep. *Research in Veterinary Science*, 7: 17-24.
- Ichimaru T, Mori Y, Okamura H, 2001.** A possible role of neuropeptide Y as a mediator of undernutrition to the hyphotalamic gonadotrophin-releasing hormone pulse generator in goats. *Endocrinology*, 142: 2489-2498.

- Irwig MS, Fraley GS, Smith JT, Acohido BV, Popa SM, Cunningham MJ, Gottsch ML, Clifton DK, Steiner RA, 2004.** Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology*, 80: 264-272.
- Ito K, Tanaka T, Mori Y, 1993.** Opioid peptidergic control of gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity in the ovariectomized goat. *Neuroendocrinology*, 57: 634-639.
- Jackson GL, Gibson M, Kuehl DE, 1988.** Photoperiodic disruption of photorefractoriness in the ewe. *Biology of Reproduction*, 38: 127-134.
- Jackson GL, Kuehl D, 2002.** Gamma-aminobutyric acid (GABA) regulation of GnRH secretion in sheep. *Reproduction Supplement*, 59: 15-24.
- Jansen HT, Jackson GL, 1993.** Circannual rhythms in the ewe: patterns of ovarian cycles and prolactin secretion under two different constant photoperiods. *Biology of Reproduction*, 49: 627-634.
- Jiménez-Jorge S, Jiménez-Caliani AJ, Guerrero JM, Naranjo MC, Lardone PJ, Carrillo-Vico A, Osuna C, Molinero P, 2005.** Melatonin synthesis and melatonin-membrane receptor (MT1) expression during rat thymus development: role of the pineal gland. *Journal of Pineal Research*, 39: 77-83.
- Johnson MD, Crowley WR, 1983.** Acute effects of estradiol on circulating luteinizing hormone and prolactin concentrations and on serotonin turnover on individual brain nuclei. *Endocrinology*, 113: 1935-1941.
- Johnson RF, Morin LP, Moore RY, 1988.** Retinohypothalamic projections in the hamster and rat demonstrated using cholera toxin. *Brain Research*, 462: 301-312.
- Johnson ML, Murdoch J, Van Kirk EA, Kaltenbach JE, Murdoch WJ, 1999.** Tumor necrosis factor α regulates collagenolytic activity in preovulatory ovine follicles: relationship to cytokine secretion by the oocyte-cumulus cell complex. *Biology of Reproduction* 61: 1581-1585.
- Jones RL, McGeer PL, Greiner AC, 1969.** Metabolism of exogenous melatonin in schizophrenic and non-schizophrenic volunteers. *Clinica Chimica Acta*, 26: 281-285.
- Kalra SP, Crowley WR, 1984.** Norepinephrine-like effects of neuropeptide Y on LH release in the rat. *Life Sciences*, 35: 1173-1176.
- Kalra SP, Kalra PS, 1984.** Opioid-adrenergic-steroid connection in regulation of luteinizing hormone secretion in the rat. *Neuroendocrinology*, 38: 418-426.

- Kalra SP, Dube MG, Sahu A, Phelps CP, Kalra PS, 1991.** Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 88: 10931-10935.
- Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL, Kalra PS, 1999.** Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocrine Reviews*, 20: 68-100.
- Kalsbeek A, Drijfhout WJ, Westerink BHC, Van Heerikhuize IJ, Van Der Woude T, Van Der Vliet J, Buijs RM, 1996.** GABA receptors in the region of the dorsomedial hypothalamus of rats are implicated in the control of melatonin. *Neuroendocrinology*, 63: 69-78.
- Kalsbeek A, Garidou ML, Palm IF, Van Der Vliet J, Simonneaux V, Pévet P, Buijs RM, 2000.** Melatonin sees the light: blocking GABAergic transmission in the paraventricular nucleus induces daytime secretion of melatonin. *European Journal of Neuroscience*, 12: 3146-3154.
- Kandiel MM, Watanabe G, Li JY, Manabe N, El Azab AE, Taya K, 2008.** Physiological roles of inhibin in regulation of FSH secretion and follicular development during early pregnancy in goats. *Domestic Animal Endocrinology* 35, 157-163.
- Kang SH, Seong JG, Cho S, Cho H, Kim K, 1995.** Acute increase of GABAergic neuro-transmission exerts a stimulatory effect on GnRH gene expression in the preoptic/anterior hypothalamic area of ovariectomized, estrogen - and progesterone - treated adult female rats. *Neuroendocrinology*, 61: 486-492.
- Kao C, Schaeffer DJ, Jackson GL, 1992.** Different neuroendocrine system modulate pulsatile luteinizing hormone secretion in photosuppressed and photorefractory ewes. *Biology of Reproduction*, 46: 425-434.
- Karsch FJ, Dierschke DK, Weick RF, Yamaji T, Hotchkiss J, Knobil E, 1973.** Positive and negative *feedback* control by estrogen of luteinizing hormone secretion in the rhesus monkey. *Endocrinology*, 92: 799-804.
- Karsch FJ, Foster DL, Legan SJ, Ryan KD, Peter GK, 1979.** Control of the preovulatory endocrine events in the ewe: interrelationship of estradiol, progesterone, and luteinizing hormone. *Endocrinology*, 105: 421-426.
- Karsch FJ, Goodman RL, Legan SJ, 1980.** *Feedback* basis of seasonal breeding: test of a hypothesis. *Journal of Reproduction and Fertility*, 58: 521-535.

- Karsch FJ, Foster DL, Bittman EL, Goodman RL, 1983.** A role for estradiol in enhancing luteinizing hormone pulse frequency during the follicular phase of the oestrus cycle of sheep. *Endocrinology*, 113: 1333-1339.
- Karsch FJ, Bittman EL, Foster DL, Goodman RL, Legan SJ, Robinson JE, 1984.** Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. *Recent Progress in Hormone Research*, 40: 185-232.
- Karsch FJ, Wayne NL, Bittman EL, 1985.** Importance of the duration of the nocturnal increase in melatonin secretion in determining the reproductive response to photoperiod. En: Labrie F, Proulx L (eds), *Proceedings VII International Congress of Endocrinology*, Quebec. Elsevier, Amsterdam, pp. 139.
- Karsch FJ, Cummins JT, Thomas GB, Clarke IJ, 1987.** Steroid *feedback* inhibition of pulsatile secretion of gonadotropin releasing hormone in the ewe. *Biology of Reproduction*, 36: 1207-1218.
- Karsch FJ, Robinson JE, Woodfill CJ, Brown MB, 1989.** Circannual cycles of luteinizing hormone and prolactin secretion in ewes during prolonged exposure to a fixed photoperiod: evidence for endogenous reproductive rhythm. *Biology of Reproduction* 34, 265-274.
- Karsch FJ, Dahl GE, Evans NP, Manning JM, Mayfield KP, Moenter SM, Foster DL, 1993.** Seasonal changes in gonadotropin releasing hormone secretion in the ewe: alteration in response to the negative *feedback* action of estradiol. *Biology of Reproduction*, 49: 1377-1383.
- Karsch FJ, Dahl GE, Hachigian TM, Thrun LA, 1995.** Involvement of thyroid hormones in seasonal reproduction. *Journal of Reproduction and Fertility*, 49: 409-422.
- Karsch FJ, Bowen JM, Caraty A, Evans NP, Moenter SM, 1997.** Gonadotrophin-releasing hormone requirements for ovulation. *Biology of Reproduction*, 56: 303-309.
- Kaufman JM, Kesner JS, Wilson RC, Knobil E, 1985.** Electrophysiological manifestation of luteinizing hormone-releasing hormone pulse generator activity in the rhesus monkey: influence of alpha-adrenergic and dopaminergic blocking agents. *Endocrinology*, 116: 1327-1333.

- Kawate N, Morita N, Tsuji M, Tamada H, Inaba T, Sawada T, 2000.** Roles of pulsatile release of LH in the development and maintenance of corpus luteum function in the goat. *Theriogenology*, 54: 1133-1143.
- Keane MG, 1974.** Effect of bodyweight on attainment of puberty and reproductive performance in Suffolk X ewe lambs. *Irish Journal of Agricultural Research*, 13: 263-274.
- Kennaway DJ, Matthews CD, Seamark RF, Phillipou G, Schilthuis M, 1977.** On the presence of melatonin in pineal glands and plasma of foetal sheep. *Journal of Steroid Biochemistry*, 8: 559-563.
- Kennaway DJ, Gilmore TA, Seamark RF, 1982a.** Effects of melatonin implants on the circadian rhythm of plasma melatonin and prolactin in sheep. *Endocrinology*, 110: 2186-2188.
- Kennaway DJ, Gilmore TA, Seamark RF, 1982b.** Effect of melatonin feeding on serum prolactin and gonadotropin levels and the onset of seasonal estrous cyclicity in sheep. *Endocrinology*, 110: 1766-1772.
- Kesner JS, Convey EM, Anderson CR, 1981.** Evidence that estradiol induces the preovulatory LH surge in cattle by increasing pituitary sensitivity to LHRH and then increasing LHRH release. *Endocrinology*, 108: 1386-1391.
- Khorram O, Pau K-YF, Spies HG, 1987.** Bimodal effects of neuropeptide Y on hypothalamic release of gonadotrophin-releasing hormone in conscious rabbits. *Neuroendocrinology*, 45: 290-297.
- Klein DC, 1979.** Circadian rhythms in the pineal gland. En: Kreiger D (ed) *Endocrine rhythms*. Raven Press, New York, pp. 203-223.
- Klein DC, 1999.** Serotonin N-acetyltransferase. A personal historical perspective. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 460: 5-16.
- Klein DC, Weller JL, 1970.** Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in N-acetyltransferase. *Science*, 169: 1093-1095.
- Knight TW, Hockey HUP, 1982.** Ovulation rate in Marshall Romney ewes: effects of body size and condition score. *Proceedings of New Zealand Society of Animal Production*, 42: 25-27.
- Knight TW, Hall DRH, Wilson LD, 1983.** Effects of teasing and nutrition on the duration of the breeding season in Romney ewes. *Proceedings of New Zealand Society of Animal Production*, 43: 17-19.

- Knight PG, Feist SA, Tannetta DS, Bleach ECL, Fowler PA, O'Brien M, Groome NP, 1998.** Measurement of inhibin-A (α β A dimer) during the oestrous cycle, after manipulation of ovarian activity and during pregnancy in ewes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 113: 159-166.
- Ko CH, Takahashi JS, 2006.** Molecular components of the mammalian circadian clock. *Human Molecular Genetics*, 15 (2): 271-277.
- Kopin IJ, Pare CMB, Axelrod J, Weissback H, 1961.** The fate of melatonin in animals. *Journal of Biological Chemistry*, 236: 3072-3075.
- Kouakou B, Gazal OS, Terrill TH, Kannana G, Gelaye S, Amoaha EA, 2008.** Digestibility, hormones and blood metabolites in dairy bucks subjected to underfeeding and refeeding. *Small Ruminant Research*, 75: 171-176.
- Kuchel GA, Zigmund RE, 1991.** Functional recovery and collateral neuronal sprouting examined in young and aged rats following a partial neural lesion. *Brain Research*, 540: 195-203.
- Kuiper GGJM, Enmark E, Pelto-Huikko MP, Nilsson S, Gustafsson J-A, 1996.** Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 93: 5925-5930.
- Kumar V, Lincoln GA, 1995.** Effects of a one-hour light pulse on the timing of the circadian rhythm in melatonin secretion in rams. *Journal of Pineal Research*, 18: 21-27.
- Lahiri DK, Davis D, Nurnberger JI Jr, 1999.** Detection of specific protein bands with melatonin-like immunoreactivity in different cell lines and human brain regions. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, 48: 127-132.
- Land RB, Pelletier J, Thimonier J, Mauleón P, 1973.** A quantitative study of genetic differences in the incidence of oestrus, ovulation and plasma luteinizing hormone concentration in the sheep. *Journal of Endocrinology*, 58: 305-317.
- Landau S, Molle G, 1997.** Nutrition effects on fertility in small ruminants with an emphasis on Mediterranean sheep breeding systems. *Séminaires Méditerranéens; Seminar of the FAO-CIHEAM Network of Cooperative Research on Sheep and Goats, Subnetwork on Nutrition*, 34: 203-209.
- LaVoie HA, King SR, 2009.** Transcriptional Regulation of Steroidogenic Genes: STARD1, CYP11A1 and HSD3B. *Experimental Biology and Medicine*, 234: 880-907.

- Le Corre S, Chemineau P, 1993.** Control of photoperiodic inhibition of luteinizing hormone secretion by dopaminergic and serotonergic systems in ovariectomized Ile-de-France ewes supplemented with estradiol. *Journal of Reproduction and Fertility*, 97: 367-373.
- Legait H, Roux M, Sirjean D, Contet-Audonneau JL, Burlet C, 1973.** Volumetric study of the hypothalamus, epiphysis and subfornical organ in several rodents. *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de Ses Filiales*, 167: 1436-1439.
- Legan SJ, Karsch FJ, 1980.** Photoperiod control of seasonal breeding in ewes: modulation of the negative *feedback* action of estradiol. *Biology of Reproduction*, 23: 1061-1068.
- Legan SJ, Karsch FJ, Foster DL, 1977.** The endocrine control of seasonal reproductive function in the ewe: a marked change in response to the negative *feedback* action of estradiol on luteinizing hormone secretion. *Endocrinology*, 101: 818-824.
- Lehman MN, Karsch FJ, 1993.** Do gonadotropin-releasing hormone, tyrosine-hydroxylase, and b-endorphin-immunoreactive neurons contain estrogen receptors? A double-label immunocytochemical study in the Suffolk ewe. *Endocrinology*, 133: 887-895.
- Lehman MN, Durham DM, Jansen HT, Adrian B, Goodman RL, 1996.** Dopaminergic A14/A15 neurons are activated during estradiol negative *feedback* in anestrous, but not breeding season, ewes. *Endocrinology*, 137: 4443-4450.
- Lehman MN, Goodman RL, Karsch FJ, Jackson GL, Berriman SJ, Jansen HT, 1997.** The GnRH system of seasonal breeders: anatomy and plasticity. *Brain Research Bulletin*, 44: 445-457.
- Lehman MN, Coolen LM, Goodman RL, Viguié C, Billings HJ, Karsch FJ, 2002.** Seasonal plasticity in the brain: the use of large animal models for neuroanatomical research. *Reproduction Supplement*, 59: 149-165.
- Lehman MN, Ladha Z, Coolen LM, Hileman SM, Connors JM, Goodman RL, 2010.** Neuronal plasticity and seasonal reproduction in sheep. *European Journal of Neuroscience*, 32: 2152-2164.
- Lemon M, Mauleón P, 1982.** Interaction between two luteal cell types from the corpus luteum of the sow in progesterone synthesis *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 64: 315-323.

- Leone RM, Silman RE, 1984.** Melatonin can be differentially metabolized in the rat to produce N-acetylserotonin in addition to 6-hydroxy-melatonin. *Endocrinology*, 114: 1825-1832.
- Leonhardt S, Seong JY, Kim K, Thorun Y, Wuttke W, Jarry H, 1995.** Activation of central GABA_A-but not of GABA_B-receptors rapidly reduces pituitary LH release and GnRH gene expression in the preoptic/anterior hypothalamic area of ovariectomized rats. *Neuroendocrinology*, 61: 655-662.
- Leranth C, Sakamoto H, MacLusky NJ, Shanabrough M, Naftolin F, 1985a.** Estrogen responsive cells in the arcuate nucleus of the rat contain glutamic acid decarboxylase (GAD): an electron microscopic immunocytochemical study. *Brain Research*, 331: 376-381.
- Leranth C, MacLusky NJ, Sakamoto H, Shanabrough M, Naftolin F, 1985b.** Glutamic acid decarboxylase-containing axons synapse on LHRH neurons in the rat medial preoptic area. *Neuroendocrinology*, 40: 536-539.
- Leranth C, MacLusky NJ, Shanabrough M, Naftolin F, 1988.** Catecholaminergic innervation of luteinizing hormone-releasing hormone and glutamic acid decarboxylase immunopositive neurons in the rat medial preoptic area. An electron-microscopic double immunostaining and degeneration study. *Neuroendocrinology*, 48: 591-602.
- Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W, 1958.** Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *Journal of Animal Chemistry Society*, 80: 2587-2587.
- LeSauter J, Silver R, 1998.** Output signals of the SCN. *Chronobiology International*, 15: 535-550.
- Lincoln, G.A. 1988.** Endogenous opioids and the control of LH secretion during the reproductive cycle in the ram induced by treatment with melatonin. *Reproduction, Nutrition and Development*, 28: 527-539.
- Lincoln GA, 1990.** Correlation with changes in horns and pelage, but not reproduction, of seasonal cycles in the secretion of prolactin in rams of wild, feral and domesticated breeds of sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*, 90: 285-296.
- Lincoln GA, 1992.** Photoperiod-pineal-hypothalamic relay in sheep. *Animal Reproduction Science*, 28: 203-207.

- Lincoln GA, 1999.** Melatonin modulation of prolactin and gonadotrophin secretion. Systems ancient and modern. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 460: 137-153.
- Lincoln GA, 2002.** Neuroendocrine regulation of seasonal gonadotrophin and prolactin rhythms: lessons from the Soay ram model. *Reproduction Supplement*, 59: 131-147.
- Lincoln GA, Wu FCW, 1991.** Luteinizing hormone responses to N-methyl-D,L-aspartate during a photoperiodically-induced reproductive cycle in the ram. *Journal of Neuroendocrinology* 3, 309-317.
- Lincoln GA, Maeda KI, 1992.** Reproductive effect of placing microimplants of melatonin in the mediobasal hypothalamus and preoptic area in rams. *Journal of Endocrinology*, 132: 201-215.
- Lincoln GA, Clarke IJ, 1994.** Photoperiodically-induced cycles in the secretion of prolactin in the hypothalamo-pituitary disconnected rams: evidence for translocation of the melatonin signal in the pituitary gland. *Journal of Endocrinology*, 6: 251-260.
- Lincoln GA, Klandorf H, Anderson N, 1980.** Photoperiodic control of thyroid function and wool and horn growth in rams and the effect of cranial sympathectomy. *Endocrinology*, 107: 1543-1548.
- Lincoln GA, Ebling FJP, Martin GB, 1987.** Endogenous opioid control of pulsatile LH secretion in rams: modulation by photoperiod and gonadal steroids. *Journal of Endocrinology*, 115: 425-438.
- Lincoln GA, Andersson H, Loudon A, 2003.** Clock genes in calendar cells as the basis of annual timekeeping in mammals – a unifying hypothesis. *Journal of Endocrinology*, 179: 1-13.
- Lincoln GA, Johnston JD, Anderson H, Wagner G, Hazlerigg DG, 2005.** Photorefractoriness in mammals: dissociating a seasonal timer from the circadian-based photoperiod response. *Endocrinology*, 146: 3782-3790.
- Lindsay DR, 1996.** Environment and reproductive behaviour. *Animal Reproduction Science*, 42: 1-12.
- Liu YX, 2007.** Interaction and signal transduction between oocyte and somatic cells in the ovary. *Frontiers in Bioscience*, 12: 2782-2796.

- Lumey LH, 1992.** Decreased birthweights in infants after maternal in utero exposure to the Dutch famine of 1944-1945. *Paediatric and Perinatal Epidemiology*, 6: 240-253.
- Maeda KI, Mori Y, Kano Y, 1986.** Superior cervical ganglionectomy prevents gonadal regression and increases plasma prolactin concentrations induced by long days in goats. *Journal of Endocrinology*, 110: 137-144.
- Maeda KI, Mori Y, Kano Y, 1988.** Involvement of melatonin in the seasonal changes of the gonadal function and prolactin secretion in female goats. *Reproduction, Nutrition and Development*, 28: 487-497.
- Maestroni GJM, Conti A, 1993.** Melatonin in relation to the immune system. En: Yu HS, Reiter RJ (eds), *Melatonin: Biosynthesis, physiological effects, and clinical applications*. Boca Raton, FL: CRC, pp. 289-310.
- Malpaux B, 2001.** Environnement et rythmes de reproduction. En: Thibault C, Levasseur MC (eds), *La Reproduction chez les mammifères et L'Homme*. Ellipse Editions (París) – INRA Editions, pp. 699-724.
- Malpaux B, 2006.** Seasonal regulation of reproduction in mammals. En: Knobil E, Neill JD (eds), *Physiology of Reproduction*, 3rd edition, Elsevier, Amsterdam, pp. 2231-2281.
- Malpaux B, Robinson JE, Brown MB, Karsch FJ, 1987.** Reproductive refractoriness of the ewe to inductive photoperiod is not caused by inappropriate secretion of melatonin. *Biology of Reproduction*, 36: 1333-1341.
- Malpaux B, Wayne N, Karsch FJ, 1988.** Termination of the breeding season in the Suffolk ewe: involvement of an endogenous rhythm of reproduction. *Biology of Reproduction* 39, 254-263.
- Malpaux B, Robinson JE, Wayne NL, Karsch FJ, 1989.** Regulation of the onset of the breeding season of the ewe: importance of long days and of an endogenous reproductive rhythm. *Journal of Endocrinology*, 122: 269-278.
- Malpaux B, Daveau A, Maurice F, Gayrard V, Thiéry JC, 1993.** Short-day effects of melatonin on luteinizing hormone secretion in the ewe: Evidence for central sites of action in the mediobasal hypothalamus. *Biology of Reproduction*, 48: 752-760.
- Malpaux B, Skinner DC, Maurice F, 1995.** The ovine pars tuberalis does not appear to be targeted by melatonin to modulate luteinizing hormone secretion, but may be important for prolactin release. *Journal of Endocrinology*, 7: 199-206.

- Malpaux B, Viguié C, Skinner DC, Thiéry JC, Pelletier J, Chemineau P, 1996.** Seasonal breeding in sheep: Mechanism of action of melatonin. *Animal Reproduction Science*, 42: 109-117.
- Malpaux B, Viguié C, Skinner DC, Thiéry JC, Chemineau P, 1997.** Control of the circannual rhythm of reproduction by melatonin in the ewe. *Brain Research Bulletin*, 44: 431-438.
- Malpaux B, Daveau A, Maurice-Mandon F, Duarte G, Chemineau P, 1998.** Evidence that melatonin acts in the premammillary hypothalamic area to control reproduction in the ewe: presence of binding sites and stimulation of luteinizing hormone secretion by *in situ* microimplant delivery. *Endocrinology*, 139: 1508-1516.
- Malpaux B, Thiéry JC, Chemineau B, 1999.** From the eye to the pituitary: pathways controlling seasonal reproduction. Annual ESDAR Conference, Plenary sessions, pp. 8-14.
- Malpaux B, Migaud M, Tricoire H, Chemineau P, 2001.** Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. *Journal of Biological Rhythms* 16, 336-347.
- Malven PV, 1993.** Neuroendocrine morphology. En: Yu HS, Reiter RJ (eds), *Mammalian Neuroendocrinology*. Boca Ratón CRC. Press, Inc., Florida, pp. 7-18.
- Malven PV, Stanisiewsky EP, Haglof SA, 1990.** Ovine brain areas sensitive to naloxone-induced stimulation of luteinizing hormone release. *Neuroendocrinology*, 52: 373-381.
- Mani AU, McKelvey WAC, Watson ED, 1992.** The effects of low level of feeding on response to synchronization of estrus, ovulation rate and embryo loss in goats. *Theriogenology*, 38: 1013-1022.
- Mani AU, McKelvey WAC, Watson ED, 1996.** Effect of undernutrition on gonadotropin profiles in nonpregnant, cycling goats. *Animal Reproduction Science*, 43: 25-33.
- Mann GE, Campbell BK, McNeilly AS, Baird DT, 1992.** The role of inhibin and oestradiol in the control of FSH secretion in the sheep. *Journal of Endocrinology*, 133: 381-391.

- Marie M, Findlay PA, Thomas L, Adam CL, 2001.** Daily patterns of plasma leptin in sheep: effects of photoperiod and food intake. *Journal of Endocrinology*, 170: 277-286.
- Maronde E, Stehle JH, 2007.** The mammalian pineal gland: known facts, unknown facets. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 18: 142-149.
- Martin GB, 1984.** Factors affecting the secretion of luteinizing hormone in the ewe. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 59: 1-87.
- Martin GB, Price CA, Thiéry JC, Webb R, 1988.** Interactions between inhibin, oestradiol and progesterone in the control of gonadotrophin secretion in the ewe. *Journal of Reproduction and Fertility*, 82: 319-328.
- Martin GB, Hötzel MJ, Blache D, Walkden-Brown SW, Blackberry MA, Boukhliq R, Fisher JS, Miller DW, 2002.** Determinants of the annual pattern of reproduction in mature male Merino and Suffolk sheep: modification of responses to photoperiod by an annual cycle in food supply. *Reproduction, Fertility and Development*, 14: 165-175.
- Martínez de la Escalera G, Choi AL, Weiner RI, 1994.** Biphasic GABAergic regulation of GnRH secretion in GT₁ cell lines. *Neuroendocrinology*, 59: 420-425.
- Masotto C, Negro-Vilar, 1987.** Activation of γ -aminobutyric acid B-receptors abolishes naloxone-stimulated luteinizing hormone release. *Endocrinology*, 121: 2251-2255.
- Masotto C, Wisniewski G, Negro-Vilar A, 1989.** Different γ -aminobutyric acid receptor subtypes are involved in the regulation of opiate-dependent and independent luteinizing hormone-releasing hormone secretion. *Endocrinology*, 125: 548-553.
- Masruha MR, De Souza Vieira DS, Minett TS, Cipolla-Neto J, Zukerman E, Vilanova LC, 2008.** Low urinary 6-sulphatoxymelatonin concentrations in acute migraine. *Journal of Headache and Pain*, 9: 221-224.
- Matton P, Bhéreur J, Dufour JJ, 1977.** Morphology and responsiveness of the two largest ovarian follicles in anestrus ewes. *Canadian Journal of Animal Science*, 57: 459-464.
- Mauleón P, 1973.** Kinetics of oogenesis in mammals. *Archives d'anatomie microscopique et de morphologie expérimentale*, 56: 125-150.

- Mauleón P, Rougeot J, 1962.** Regulation des saisons sexuelles chez des brebis de races différentes au moyen de divers rythmes lumineux. *Annual biology of biochemistry and biophysics*, 2: 209-222.
- Mayer ML, Westbrook CL, 1987.** The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Progress in Neurobiology*, 28: 197-276.
- McClellan MC, Diekman MA, Abel JH, Niswender GD, 1975.** Luteinizing hormone, progesterone and the morphological development of normal and superovulated corpora lutea in sheep. *Cell and Tissue Research*, 164: 291-307.
- McClung CR, Fox BA, Dunlap JC, 1989.** The *Neurospora* clock gene *frequency* shares a sequence element with the *Drosophila* clock gene *period*. *Nature*, 339: 558-562.
- McDonald LE, 1989.** *Veterinary Endocrinology and Reproduction*. Ed. Lee & Febiper, Philadelphia, pp. 569.
- McDonald MC, Wilkinson M, 1991.** Characterization and ontogenesis N-metil-D,L-aspartate-evoked luteinizing hormone secretion in immature female rats. *Journal of Endocrinology*, 4: 223-229.
- McMillen IC, Parkington HC, McCance I, 1989.** Effect of isoprenaline on the output of melatonin from fetal and newborn lamb pineal glands *in vitro*. *Acta Endocrinology*, 121: 773-776.
- McNeilly AS, Swanston IA, Crow W, Tsonis CG, Baird DT, 1989.** Changes in the plasma concentrations of inhibin throughout the normal sheep oestrous cycle and after the infusion of FSH. *Journal of Endocrinology*, 120: 295-305.
- McNeilly AS, Tay CC, Glasier A, 1994.** Physiological mechanisms underlying lactational amenorrhea. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 709: 145-155.
- McShane TM, Keisler DH, 1991.** Effects of dietary energy on ovarian function, estrogen suppression of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone, and competency of the gonadotropin surge. *Biology of Reproduction*, 45: 486-492.
- McShane TM, May T, Miner JL, Keisler DH, 1992.** Central actions of neuropeptide Y may provide a neuromodulatory link between nutrition and reproduction. *Biology of Reproduction*, 46: 1151-1157.
- McShane TM, Petersen SL, McCrone S, Keisler DH, 1993.** Influence of food restriction on neuropeptide-Y, proopiomelanocortin, and luteinizing hormone-

- releasing hormone gene expression in sheep hypothalami. *Biology of Reproduction*, 49: 831-839.
- Meczekalski B, Podfigurna-Stopa A, Warenik-Szymankiewicz A, Genazzani AR, 2008.** Functional hypothalamic amenorrhea: current view on neuroendocrine aberrations. *Gynecological Endocrinology*, 24: 4-11.
- Medan MS, Watanabe G, Sasaki K, Sharawy S, Groome NP, Taya K, 2003.** Ovarian dynamics and their associations with peripheral concentrations of gonadotropins, ovarian steroids, and inhibin during the estrous cycle in goats. *Biology of Reproduction*, 69: 57-63.
- Medan MS, Arai KY, Watanabe G, Taya K, 2007.** Inhibin, regulation of reproductive function and practical use in animals. *Journal of Animal Science*, 78: 16-27.
- Mellado M, Foote RH, Gómez A, 1991.** Reproductive efficiency of Nubian goats throughout the year in northern Mexico. *Small Ruminant Research*, 6: 151-157.
- Mellado M, Vera A, Loera H, 1994.** Reproductive performance of crossbred goats in good or poor body condition exposed to bucks before breeding. *Small Ruminant Research*, 14: 45-48.
- Menassol JB, Tautou C, Collet A, Chesneau D, Lomet D, Dupont J, Malpoux B, Scaramuzzi RJ, 2011.** The effect of an intracerebroventricular injection of metformin or AICAR on the plasma concentrations of melatonin in the ewe: potential involvement of AMPK? *BMC Neuroscience*, 12: 76.
- Messenger S, Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Thresher RR, Malinge I, Lomet D, Carlton MB, Colledge WH, Caraty A, Aparicio SA, 2005.** Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 102: 1761-1766.
- Meyer SL, Goodman RL, 1985.** Neurotransmitters involved in mediating the steroid-dependent suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion in anestrus ewes: effects of receptors antagonist. *Endocrinology*, 116: 2054-2061.
- Meyer SL, Goodman RL, 1986.** Separate neural systems mediate the steroid-dependent and steroid-independent suppression of tonic luteinizing hormone secretion in the anestrus ewe. *Biology of Reproduction*, 35: 562-571.
- Meza-Herrera CA, López-García MA, López-Medrano JI, Torres-Moreno M, Salinas-González H, 2007a.** Excitatory aminoacids, body condition, scrotal

- circumference and LH serie concentrations in male goats under long photoperiods. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, 6: 205-210.
- Meza-Herrera CA, López-Medrano JI, Torres-Moreno M, Tinajero Pérez K, Mellado-Bosque M, González -Bulnes A, 2007b.** Excitatory amino acid effects upon the onset of puberty in goats: quantification of progesterone as endocrine marker of puberty. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, 6: 197-203.
- Meza-Herrera CA, Hallford D, Ortiz JA, Cuevas RA, Sánchez JM, Salinas H, Mellado M, González-Bulnes A, 2008.** Body condition and protein supplementation positively affect periovulatory ovarian activity by non LH-mediated pathways in goats. *Animal Reproduction Science*, 106: 412-420.
- Miller JD, Becker DP, Ward JD, Sullivan HG, Adams WE, Rosner MJ, 1977.** Significance of intracranial hypertension in severe head injury. *Journal of Neurosurgery*, 47: 503-516.
- Miller DW, Blache D, Boukhliq R, Curlewis DJ, Martin GB, 1998.** Central metabolic messengers and the effects of nutrition on gonadotrophin secretion in sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*, 112: 347-356.
- Minton JE, 1990.** Role of photorefractoriness in onset of anoestrus in Rambouillet x Dorset ewes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 89: 261-268.
- Misztal T, Romanowicz K, 2005.** Effective stimulation of daily LH secretion by the combined treatment with melatonin and naloxone in luteal-phase ewes. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 65: 1-9.
- Misztal T, Romanowicz K, Barcikowski B, 2004.** Effects of melatonin on luteinizing hormone secretion in anestrous ewes following dopamine and opiate receptor blockade. *Animal Reproduction Science*, 81: 245-259.
- Moenter SM, Caraty A, Karsch FJ, 1990.** The estradiol-induced surge of gonadotropin-releasing hormone in the ewe. *Endocrinology*, 127: 1375-1384.
- Moenter SM, Caraty A, Locatelli A, Karsch FJ, 1991.** Pattern of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion leading up to ovulation in the ewe: existence of a preovulatory GnRH surge. *Endocrinology*, 129: 1175-1182.
- Mogi K, Yonezawa T, Chena D-S, Li J-Y, Sawasaki T, Nishihara M, 2003.** Correlation between spontaneous feeding behavior and neuropeptide Y profile in the third ventricular cerebrospinal fluid of goats. *Domestic Animal Endocrinology*, 25: 175-182.

- Moguilevsky JA, Carbone S, Szwarcfarb B, Rondina D, 1991.** Sexual maturation modifies the GABAergic control of gonadotrophin secretion in female rats. *Brain Research*, 563: 12-16.
- Moore RY, 1995.** Organization of the mammalian circadian system. *Ciba Found Symposium* 183: 88-99; discussion: 100-106.
- Moore RY, Lenn NJ, 1972.** A retinohypothalamic projection in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 146: 1-14.
- Morgan PJ, Barrett P, Howell HE, Helliwell R, 1994.** Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochemistry International*, 24: 101-146.
- Morgan PJ, Ross AW, Graham ES, Adam C, Messenger S, Barrett P, 1998.** *oPer1* is an early response gene under photoperiodic regulation in the ovine *pars tuberalis*. *Journal of Neuroendocrinology*, 103: 19-323.
- Morin LP, Cummings LA, 1981.** Effect of surgical or photoperiodic castration, testosterone replacement or pinealectomy on male hamster running rhythmicity. *Physiology Behavior*, 26: 825-838.
- Mori Y, Maeda K, Sawasaki T, Kano Y, 1984.** Effects of long days and short days on estrous cyclicity in two breeds of goats with different seasonality. *Japanese Journal of Animal Reproduction*, 30: 239-245.
- Mori Y, Maeda KI, Sawasaki T, Kano Y, 1985.** Photoperiodic control of prolactin secretion in the goat. *Japanese Journal of Animal Reproduction*, 31: 9-15.
- Morreale de Escobar G, Obregón MJ, Calvo R, Escobar del Rey F, 1993.** Effects of iodine deficiency on thyroid hormone metabolism and the brain in fetal rats: the role of the maternal transfer of thyroxin. *American Journal of Clinical Nutrition*, 57: 280-285.
- Morrison CD, Daniel JA, Holmberg BJ, Djiane J, Raver N, Gertler A, Keisler DH, 2001.** Central infusion of leptin into well-fed and undernourished ewe lambs: effects on feed intake and serum concentrations of growth hormone and luteinizing hormone. *Journal of Endocrinology*, 168: 317-324.
- Muñoz-Gutiérrez M, Blache D, Martin GB, Scaramuzzi RJ, 2002.** Folliculogenesis and ovarian expression of mRNA encoding aromatase in anoestrous sheep after 5 days of glucose or glucosamine infusion or supplementary lupin feeding. *Reproduction*, 124: 721-731.

- Murdoch WJ, Myers DA, 1983.** Effect of treatment of oestrous ewes with indomethacin on the distribution of ovarian blood to the periovulatory follicle. *Biology of Reproduction*, 29: 1229-1232.
- Murdoch WJ, Cavender JL, 1987.** Mechanisms of ovulation. *Advances in Contraception Delivery Systems*, 3: 353-367.
- Murdoch WJ, Ferris ML, 1988.** Prostaglandin E₂-9-keto-reductase activity of preovulatory ovine follicles. *Journal of Animal Science*, 66: 2924-2929.
- Murdoch WJ, Cavender JL, 1989.** Effect of indomethacin on the vascular architecture of preovulatory ovine follicles: Possible implication in the luteinized unruptured follicle syndrome. *Fertility and Sterility*, 51: 153-155.
- Murdoch WJ, Lund SA, 1999.** Prostaglandin-independent anovulatory mechanism of indomethacin action: Inhibition of tumor necrosis factor alpha-induced sheep ovarian cell apoptosis. *Biology of Reproduction*, 61: 1655-1659.
- Murdoch WJ, Nix KJ, Dunn TG, 1983.** Dynamics of ovarian blood supply to periovulatory follicles of the ewe. *Biology of Reproduction*, 28: 1001-1006.
- Murdoch WJ, Peterson TA, Van Kirk EA, Vincent DL, Inskoop EK, 1986.** Interactive roles of progesterone, prostaglandins, and collagenase in the ovulatory mechanism of the ewe. *Biology of Reproduction*, 35: 1187-1194.
- Murdoch WJ, Slaughter RG, Ji TH, 1991.** *In situ* hybridization analysis of ovarian endoperoxide synthase mRNA throughout the periovulatory period of the ewe. *Domestic Animal Endocrinology*, 8: 455-457.
- Murdoch WJ, Colgin DC, Ellis JA, 1997.** Role of tumor necrosis factor- α in the ovulatory mechanism of ewes. *Journal of Animal Science*, 75: 1601-1605.
- Naftolin F, García-Segura LM, Horvath TL, Zsarnovszky A, Demir N, Fadiel A, Leranath C, Vondracek-Klepper S, Lewis C, Chang A, Parducz A, 2007.** Estrogen-induced hypothalamic synaptic plasticity and pituitary sensitization in the control of the estrogen-induced gonadotrophin surge. *Reproductive Sciences*, 14: 101-116.
- Nagatani S, Zeng Y, Keisler DH, Foster DL, Jaffe CA, 2000.** Leptin regulates pulsatile luteinizing hormone and growth hormone secretion in the sheep. *Endocrinology*, 141: 3965-3975.
- Nicholls TJ, Jackson GL, Follett BK, 1989.** Reproductive refractoriness in the Welsh Mountain ewe induced by a short photoperiod can be overridden by exposure to a shorter photoperiod. *Biology of Reproduction*, 40: 81-86.

- Nishida S, 2005.** Metabolic effects of melatonin on oxidative stress and diabetes mellitus. *Endocrine*, 27: 131-136.
- Nishihara M, Kimura F, 1987.** Roles of γ -aminobutyric acid and serotonin in the arcuate nucleus in the control of prolactin and luteinizing hormone secretion. *Japanese Journal of Physiology*, 37: 955-961.
- Norgren RB, Lehman MN, 1989.** A double-label pre-embedding immunoperoxidase technique for electron microscopy using diaminobenzidine and tetramethylbenzidine as markers. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 37: 1283-1289.
- Notter DR, Chemineau P, 2001.** Nocturnal melatonin and prolactin plasma concentrations in sheep selected for fertility in autumn lambing. *Journal of Animal Science*, 79: 2895-2901.
- O'Callaghan D, Karsch FJ, Boland MP, Hanrahan JP, Roche JP, 1992.** Variation in the timing of the reproductive season among breeds of sheep in relation to differences in photoperiod synchronization of and endogenous rhythm. *Journal of Reproduction and Fertility*, 96: 443-452.
- O'Shea JD, Cran DG, Hay MF, 1980.** Fate of the theca interna following ovulation in the ewe. *Cell and Tissue Research*, 210: 305-319.
- Ohkura S, Ichimaru T, Itoh F, Matsuyama S, Okamura H, 2004.** Further evidence for the role of glucose as a metabolic regulator of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity in goats. *Endocrinology*, 145: 3239-3246.
- Okamura H, Ohkura S, 2007.** Neuroendocrine control of reproductive function in ruminants. *Animal Science Journal*, 78: 105-111.
- Ortavant R, Bocquier F, Pelletier J, Ravault JP, Thimonier J, Volland-Nail P, 1988.** Seasonality of reproduction in sheep and its control by photoperiod. *Australian Journal of Biological Sciences*, 41: 69-85.
- Pääkkönen T, Mäkinen TM, Leppäluoto J, Vakkuri O, Rintamäki H, Palinkas LA, Hassi J, 2006.** Urinary melatonin: a noninvasive method to follow human pineal function as studied in three experimental conditions. *Journal of Pineal Research*, 40: 110-115.
- Padmanabhan V, Karsch FJ, Lee J S, 2002.** Hypothalamic, pituitary and gonadal regulation of FSH. *Reproduction Supplement*, 59: 67-82.

- Page RB, 2006.** Anatomy of the hypothalamo-hypophysial complex. En: Knobil E, Neill JD (eds), Physiology of Reproduction. Elsevier, pp. 1309-1413.
- Pang SF, Lee PPN, Chan YS, Ayre EA, 1993.** Melatonin secretion and its rhythms in biological fluids. En: Yu HS, Reiter RJ (eds), Melatonin: Biosynthesis, physiological effects and clinical applications. CRC, Press, pp. 129-153.
- Pardridge WM, Mietus LJ, 1980.** Transport of albumin-bound melatonin through the blood-brain barrier. Journal of Neurochemistry, 34: 1761-1763.
- Parmeggiani A, Di Palo R, Zicarelli L, Campanile G, Esposito L, Seren E, Accorsi PA, Soflai SM, 1994.** Melatonina e stagionalità riproduttiva della bufala. Agricoltura Ricerca, 153: 41-48.
- Pautler EL, Hall FL, 1987.** Movement of melatonin across the retinal pigment epithelium. Experimental Eye Research, 45: 351-356.
- Peart JN, 1967.** The effect of different levels of nutrition during late pregnancy on the subsequent milk production on blackface ewes and in the growth of their lambs. Journal of Agriculture Science (Cambridge), 68: 365-371.
- Pelletier J, 1973.** Evidence of photoperiodic control of prolactin release in rams. Journal of Reproduction and Fertility, 35: 143-147.
- Pelletier J, Almeyda G, 1987.** Short light cycles induce persistent reproductive activity in Ile-de-France rams. Journal of Reproduction and Fertility Supplement, 34: 215-226.
- Pelletier J, Auzan C, Daveau A, Clauser E, and Chemineau P, 1999.** Sheep 5HT_{2A} receptors: Partial cloning of the coding sequence and mRNA localization by *in situ* hybridization in the ewe hypothalamus. Cell and Tissue Research, 295: 231-239.
- Pelligrino DA, 1993.** Saying NO to cerebral ischemia. Journal of Neurosurgical Anesthesiology, 5: 221-223.
- Perrot-Sinal TS, Davis AM, Gregerson KA, Kao JP, McCarthy MM, 2001.** Estradiol enhances excitatory γ -aminobutyric acid-mediated calcium signaling in neonatal hypothalamic neurons. Endocrinology, 142: 2238-2243.
- Peschke E, Muhlbauer E, 2010.** New evidence for a role of melatonin in glucose regulation. Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism, 24: 829-841.
- Picazo RA, González-Bulnes A, Gómez-Brunet A, Del Campo A, Granados B, Tresgueres J, López-Sebastián A, 2000.** Effects of bromocriptine

- administration during the follicular phase of the oestrous cycle on prolactin and gonadotrophin secretion and follicular dynamics in Merino monovular ewes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 120: 177-186.
- Picton HM, Tsonis CG, McNeilly AS, 1990.** FSH causes a time dependent stimulation of preovulatory follicles growth in the absence of pulsatile LH secretion in ewes chronically treated with gonadotrophin releasing hormone agonist. *Journal of Endocrinology*, 126: 297-307.
- Pinsky MR Dhainaut JF, 1993.** Pathophysiologic foundations of critical care. Baltimore: Williams and Wilkins, 738-752.
- Plant TM, Shahab M, 2002.** Neuroendocrine mechanisms that delay and initiate puberty in higher primates. *Physiology and Behavior*, 77: 717-722.
- Plotka ED, Seal US, Verme IJ, 1982.** Morphologic and metabolic consequences of pinealectomy in deer. En: Yu HS, Reiter RJ (eds), *The pineal gland. Extra-reproductive effects*. Boca Raton, FL: CRC Vol II, pp. 153-168.
- Poggioli R, Genedani S, Castelli M, Bertolini A, 1978.** Behavioral effects of 2-Br-a-ergocryptine (bromocriptine) in the male rat. *Rivista di Farmacologia e Terapia*, 9: 213-220.
- Poindron P, Schaal B, 1993.** Parent-infant relationships in mammals: factors of control and psychobiological implications. En: Thibault C, Levasseur MC, Hunter RHF (eds), *Reproduction in Mammals and Man*. Ellipses, París.
- Prandi A, Romagnoli G, Chiesa F, Tamanini C, 1987.** Plasma prolactin variations and onset of ovarian activity in lactating anestrous goats given melatonin. *Animal Reproduction Science*, 13: 291-297.
- Prandi A, Motta M, Chiesa F, Tamanini C, 1988.** Circannual rhythm of plasma prolactin concentration in the goat. *Animal Reproduction Science*, 17: 85-94.
- Prevot V, Bellefontaine N, Baroncini M, Sharif A, Hanchate NK, Parkash J, Campagne C, de Seranno S, 2010.** Gonadotrophin releasing hormone nerve terminals, tanycytes and neurohaemal junction remodelling in the adult median eminence: functional consequences for reproduction and dynamic role of vascular endothelial cells. *Journal of Neuroendocrinology*, 22: 639-649.
- Price CA, Webb R, 1988.** Steroid control of gonadotropin secretion and ovarian function in heifers. *Endocrinology*, 122: 2222-2231.
- Provencio I, Rodríguez IR, Jiang G, Hayes WP, Moreira EF, Rollag MD, 2000.** A novel human opsin in the inner retina. *Journal of Neuroscience*, 20: 600-605.

- Przekop F, 1978.** Effect of anterior differentiation of the hypothalamus on the release of luteinizing (LH) and reproduction in sheep. *Acta Physiologica Polonica*, 29: 293-307.
- Przekop F, 1981.** Role of the hypothalamus in the regulation of luteinizing hormone secretion and in the ovulation process. *Acta Physiologica Polonica*, 32: 87-128.
- Przekop F, Skubiszewski B, Wolińska E, Domański E, 1975.** The role of catecholamines in stimulating the release of pituitary ovulating hormones in sheep. *Acta Physiologica Polonica*, 26: 433-437.
- Quirke JF, Hanrahan JP, Gosling JP, 1979.** Plasma progesterone levels throughout the oestrous cycle and release of LH at oestrus in sheep with different ovulation rates. *Journal of Reproduction and Fertility*, 55: 37-44.
- Rahe CH, Owens RE, Fleeger JL, Newton HJ, Harms PG, 1980.** Pattern of plasma luteinizing hormone in the cyclic cow: Dependence upon the period of the cycle. *Endocrinology*, 107: 498-503.
- Raikhlin NT, Kvetnoy IM, 1976.** Melatonin and enterochromaffine cells. *Acta Histochemica*, 55: 19-24.
- Raikhlin NT, Kvetnoy IM, Tolkachev VN, 1975.** Melatonin may be synthesised in enterochromaffin cells. *Nature*, 255: 344-345.
- Ralph MR, Menaker M, 1988.** A mutation of the circadian system in golden hamster. *Science*, 241: 1225-1227.
- Ralph MR, Foster RG, Davis FC, Menaker M, 1990.** Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*, 247: 975-978.
- Rattray PV, Jagush KTQ, Smith JF, Winn GW, McLean KS, 1980.** *Flushing* responses from heavy and light ewes. *Proceedings New Zealand Society of Animal Production*, 40: 30-34.
- Ravault JP, Chesneau D, 1999.** The onset of increased melatonin secretion after the onset of darkness in sheep depends on the photoperiod. *Journal of Pineal Research*, 27: 1-8.
- Recabarren SE, Zapata P, Parilo J, 1990.** Disappearance of opioidergic tone of LH secretion in underfed prepubertal sheep. *Hormone Metabolism Research*, 22: 225-228.
- Reddy P, Zehring WA, Wheeler DA, Pirrotta V, Hadfield C, Hall JC, Robash M, 1984.** Molecular analysis of the *period* locus in *Drosophila melanogaster* and identification of a transcript involved in biological rhythms. *Cell*, 38: 701-710.

- Regisford EGC, Katz LS, 1994.** Effects of bromocriptine treatment on the expression of sexual behavior in male sheep (*Ovis aries*). *Journal of Animal Science*, 72: 591-597.
- Reiter RJ, 1980.** The pineal gland and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocrinology Reviews*, 1: 109-131.
- Reiter RJ, Tan DX, Korkmaz A, Erren TC, Piekarski C, Tamura H, Manchester LC, 2007.** Light at night, chronodisruption, melatonin suppression, and cancer risk: a review. *Critical Reviews in Oncogenesis*, 13: 303-328.
- Revel FG, Masson-Pevet M, Pevet P, Mikkelsen JD, Simonneaux V, 2009.** Melatonin controls seasonal breeding by a network of hypothalamic targets. *Neuroendocrinology*, 90: 1-14.
- Rhind SM, 1992.** Nutrition: its effects on endocrine profiles and reproductive performance in female sheep and goats. En: Speedy A (ed), *Progress in sheep and goat research*. CAB International, Oxford, pp. 25-51.
- Rhind SM, McNeilly AS, 1998.** Effects of level of food intake on ovarian follicle number, size and steroidogenic capacity in the ewe. *Animal Reproduction Science*, 52: 131-138.
- Rhind SM, McKelvey WAC, McMillen SR, Gunn RG, Elston DA, 1989.** Effect of restricted food intake, before and/or after mating, on the reproductive performance of greyface ewes. *Animal Production*, 48: 149-155.
- Rhind SM, Wetherill GZ, Gunn RG, 1991.** Diurnal profiles of LH, prolactin and progesterone and their inter-relationships in ewes in high or moderate levels of body condition. *Animal Reproduction Science*, 24: 119-126.
- Rhind SM, McMillen SR, Duff E, Hirst D, Wright S, 1998.** Seasonality of meal patterns and hormonal correlates in red deer. *Physiology and Behavior*, 65: 295-302.
- Rhind SM, Rae MT, Brooks AN, 2001.** Effects of nutrition and environmental factors on the fetal programming of the reproductive axis. *Reproduction*, 122: 205-214.
- Richards MW, Wettemann RP, Schoenemann HM, 1989.** Nutritional anestrus in beef cows: body weight change, body condition, luteinizing hormone in serum and ovarian activity. *Journal of Animal Science*, 67: 1520-1526.
- Ripperger JA, Schibler U, 2001.** Circadian regulation of gene expression in animals. *Current Opinion in Cell Biology*, 13: 357-362.

- Rivera GM, Alanis GA, Chaves MA, Ferrero SB, Morello HH, 2003.** Seasonality of oestrus and ovulation in Creole goats of Argentina. *Small Ruminant Research*, 48: 109-117.
- Rivera-Lozano MT, Escobar-Medina FJ, Aréchiga-Flores CF, Díaz-Gómez MO, Urrutia-Morales J, Gámez-Vázquez HG, Vera-Ávila H, 2006.** Estacionalidad reproductiva de la cabra. *Revista Veterinaria Zacatecas*, 2: 217-228.
- Robel P, 1993.** Steroid hormone receptors involved in reproduction: mechanism of action. En: Thibault C, Levasseur MC, Hunter RHF (eds), *Reproduction in Mammals and Man*. Ellipses, París.
- Robinson JJ, 1981.** Photoperiodic and nutritional influences on the reproductive performance of ewes in accelerated lambing systems. *Proceedings of the 32nd Annual Meeting of the European Association for Animal Production*, Vol. III-2. Zagreb, 31 August, 3rd September, pp. 1-10.
- Robinson JJ, 1996.** Nutrition and reproduction. *Animal Reproduction Science*, 42: 25-34.
- Robinson JE, Karsch FJ, 1984.** Refractoriness to inductive day lengths terminates the breeding season of the Suffolk ewe. *Biology of Reproduction*, 31: 656-663.
- Robinson JE, Karsch FJ, 1987.** Photoperiodic history and a changing melatonin pattern can determine the neuroendocrine response of the ewe to daylength. *Journal of Reproduction and Fertility*, 80: 159-165.
- Robinson JE, Karsch FJ, 1988.** Timing the breeding season of the ewe: what is the role of daylength? *Reproduction, Nutrition and Development*, 28: 365-374.
- Robinson JE, Radford HM, Karsch FJ, 1985.** Seasonal changes in pulsatile luteinizing hormone (LH) secretion in the ewe, relationship of frequency of LH pulses to the day length and response to estradiol negative *feedback*. *Biology of Reproduction*, 33: 324-334.
- Robinson JJ, Wigzell S, Aitken RP, Wallace JM, Ireland S, Robertson IS, 1991.** The modifying effects of melatonin, exposure and plane of nutrition on the onset of ovarian activity, ovulation rate and the endocrine status of ewes. *Animal Reproduction Science*, 26: 73-91.
- Robinson JJ, Ashworth CJ, Rooke JA, Mitchell LM, McEvoy TG, 2006.** Nutrition and fertility in ruminant livestock. *Animal Feed Science and Technology*, 126: 259-276.

- Rollag MD, Morgan RJ, Niswender GD, 1978.** Route of melatonin secretion in sheep. *Endocrinology*, 102: 1-8.
- Romanowicz K, Misztal T, Barcikowski B, 2004.** The effects of intracerebroventricular infusion of prolactin in luteinizing hormone, testosterone and growth hormone secretion in male sheep. *Animal Reproduction Science*, 81: 261-271.
- Rondina D, Freitas VJF, Spinaci M, Galeati G, 2005.** Effect of nutrition on plasma progesterone levels, metabolic parameters and small follicles development in unstimulated goats reared under constant photoperiod regimen. *Reproduction in Domestic Animals*, 40: 548-552.
- Rondón Z, Forcada F, Zarazaga LA, Abecia JA, Lozano JM, 1996.** Oestrus activity, ovulation rate and plasma melatonin concentrations in Rasa Aragonesa ewes maintained at two different and constant body condition score levels and implanted or reimplanted with melatonin. *Animal Reproduction Science*, 41: 225-236.
- Rosa HJD, Bryant MJ, 2003.** Seasonality of reproduction in sheep. *Small Ruminant Research*, 48: 155-171.
- Rotten D, 1993.** Regulation of FSH synthesis and secretion. En: Thibault C, Levasseur MC, Hunter RHF (eds), *Reproduction in Mammals and Man*. Ellipses, París.
- Russel AFJ, Doney JM, Gunn RG, 1969.** Subjective assessment of body fat in live sheep. *Journal of Agricultural Science (Cambridge)*, 72: 451-454.
- Sachs BD, Meisel RL, 1988.** The physiology of male sexual behavior. En: Knobil E, Neill JD (eds), *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, pp. 1393.
- Sahu A, Crowley WR, Kalra SP, 1990.** An opioid-neuropeptide-Y transmission line to luteinizing hormone (LH)-releasing hormone neurons: a role in the induction of LH surge. *Endocrinology*, 126: 876-883.
- Saitoh Y, Silverman AJ, Gibson MJ, 1991.** Norepinephrine neurons in mouse locus coeruleus express c-fos protein after N-methyl- D,L-aspartic acid (NMDA) treatment: relation to LH release. *Brain Research*, 561: 11-19.
- Sánchez F, 1981.** Pubertad y actividad sexual de los caprinos. *Memorias Caprinas*. 1^{er} Encuentro Nacional para la Producción Ovina y Caprina. Metepec, Ed. de México. FES-Cuautitlán, UNAM. México.

- Sánchez VM, 2003.** Mecanismos que controlan la secreción de la hormona luteinizante durante las épocas de actividad sexual y anestro en la cabra Saanen. Tesis de Maestría en Ciencias Pecuarias. Universidad de Colima, México, pp. 53.
- Santa María A, Cox J, Muñoz E, Rodríguez R, Caldera L, 1990.** Estudio del ciclo sexual, estacionalidad reproductiva y control del estro en la cabra Criolla en Chile. *Livestock Reproduction in Latin America*. En: Proceedings of the final research co-ordination meeting, Bogotá, 19-23 September 1988, International Atomic Energy Agency, Vienna, pp. 363-385.
- Santiago-Moreno J, López-Sebastián A, González-Bulnes A, Gómez-Brunet A, Chemineau P, 2000.** Seasonal changes in ovulatory activity, plasma prolactin, and melatonin concentrations, in Mouflon (*Ovis gmelini musimon*) and Manchega (*Ovis aries*) ewes. *Reproduction, Nutrition and Development*, 40: 421-430.
- Santiago-Moreno J, Gómez-Brunet A, González-Bulnes A, Malpoux B, Chemineau P, Pulido-Pastor A, López-Sebastián A, 2003.** Seasonal ovulatory activity and plasma prolactin concentrations in the Spanish ibex (*Capra pyrenaica hispanica*) maintained in captivity. *Reproduction, Nutrition and Development*, 43: 217-224.
- Santiago-Moreno J, López-Sebastián A, Del Campo A, González-Bulnes A, Picazo R, Gómez-Brunet A, 2004.** Effect of constant-release melatonin implants and prolonged exposure to a long day photoperiod on prolactin secretion and hair growth in mouflon (*Ovis gmelini musimon*). *Domestic Animal Endocrinology*, 26: 303-314.
- Santiago-Moreno J, Gómez-Brunet A, González-Bulnes A, Toledano-Díaz A, Malpoux B, López-Sebastián A, 2005.** Differences in reproductive pattern between wild and domestic rams are not associated with inter-specific annual variations in plasma prolactin and melatonin concentrations. *Domestic Animal Endocrinology*, 28: 416-429.
- Santiago-Moreno J, Gómez-Brunet A, Toledano-Díaz A, Picazo R, González-Bulnes A, López-Sebastián A, 2006.** Seasonal endocrine changes and breeding activity in Mediterranean wild ruminants. *Reproduction in Domestic Animals*, 41: 72-81.
- Scaramuzzi RJ, Martín GB, 2008.** The importance of interactions among nutrition, seasonality and socio-sexual factors in development of hormone-free methods for controlling fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, 23: 129-136.

- Scaramuzzi RJ, Campbell BK, Downing JA, Kendall NR, 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 and Development*, 46: 339-354.
- Schall RE, Ebling FJP, Karsch FJ, Foster DL, 1991.** Postpubertal maturation of endogenous opioid regulation of luteinizing hormone secretion in the female sheep. *Biology of Reproduction*, 44: 760-768.
- Schoenemann HM, Humphrey WD, Crowder ME, Nett TM, Reeves JJ, 1985.** Pituitary luteinizing hormone-releasing hormone receptors in ovariectomized cows after challenge with ovarian steroids. *Biology of Reproduction*, 3: 574-583.
- Schwanzel-Fukuda M, Pfaff DW, 1989.** Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature*, 338: 161-164.
- Scott CJ, Clarke IJ, 1993a.** Inhibition of luteinizing hormone secretion in ovariectomized ewes during the breeding season by γ -aminobutyric acid (GABA) is mediated by GABA_A receptors, but not GABA_B receptors. *Endocrinology*, 132: 1789-1796.
- Scott CJ, Clarke IJ, 1993b.** Evidence that changes in the function of the subtypes of the receptors for γ -aminobutyric acid may be involved in the seasonal changes in the negative *feedback* effects of estrogen on gonadotropin-releasing hormone secretion and plasma luteinizing hormone levels in the ewe. *Endocrinology*, 133: 2904-2912.
- Scott CJ, Cummings JT, Clarke IJ, 1991.** Effects on plasma luteinizing hormone levels of microinjection of noradrenaline and adrenaline into the septo-preoptic area of the brain of the ovariectomized ewe: changes with season and chronic oestrogen treatment. *Journal of Endocrinology*, 4: 131-141.
- Scott CJ, Tilbrook AJ, Rawson JA, Clarke IJ, 2000.** Gonadal steroid receptors in the regulation of GnRH secretion in farm animals. *Animal Reproduction Science*, 60-61: 313-326.
- Shaar CJ, Clemens JA, 1974.** The role of catecholamines in the release of anterior pituitary prolactin *in vitro*. *Endocrinology*, 95: 1202-1212.
- Sharpe RM, Franks S, 2002.** Environment, lifestyle and infertility--an intergenerational issue. *Nature Cell Biology Supplement*, 4: 33-40.

- Shaw PF, Kennaway DJ, Seamark RF, 1989.** Evidence of high concentrations of melatonin in lateral ventricular cerebrospinal fluid of sheep. *Journal of Pineal Research*, 6: 201-208.
- Sheldrick EL, Ricketts AP, Flint AP, 1981.** Placental production of 5 beta-pregnane-3 alpha,20 alpha-diol in goats. *Journal of Endocrinology*, 90: 151-158.
- Shi ZD, Barrell GK, 1992.** Requirement of thyroid function for the expression of seasonal reproductive and related changes in red deer (*Cervus elaphus*) stags. *Journal of Reproduction and Fertility*, 94: 251-259.
- Shimomura K, Lowrey PL, Vitaterna MH, Buhr ED, Kumar V, Hanna P, Omura C, Izumo M, Low SS, Barrett RK, LaRue SI, Green CB, Takahashi JS, 2010.** Genetic suppression of the circadian clock mutation by the melatonin biosynthesis pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 107: 8399-8403.
- Signoret JP, Balthazart J, 1993.** Sexual behavior. En: Thibault C, Levasseur MC, Hunter RHF (eds), *Reproduction in Mammals and Man*. Ellipses, París.
- Silver R, LeSauter J, Tresco PA, Lehman MN, 1996.** A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms. *Nature*, 382: 810-813.
- Simonneaux V, Ribelayga C, 2003.** Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacological Reviews*, 55: 325-395.
- Singh B, Dixit VD, Singh P, Georgie GC, Dixit VP, 2000.** Effect of naloxone on the plasma levels of LH, FSH, prolactin and testosterone in Beetal bucks. *Small Ruminant Research*, 37: 51-55.
- Skinner DC, Malpaux B, 1999.** High melatonin concentrations in third ventricular cerebrospinal fluid are not due to Galen vein blood recirculating through the choroids plexus. *Endocrinology*, 140: 4399-4405.
- Slominski A, Pisarchik A, Semak I, Sweatman T, Wortsman J, Szczesniewski A, Slugocki G, McNulty J, Kauser S, Tobin DJ, Jing C, Johansson O, 2002.** Serotonergic and melatonergic systems are fully expressed in human skin. *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16: 896-898.

- Smith MS, 1978.** The relative contribution of suckling and prolactin to the inhibition of gonadotropin secretion during lactation in the rat. *Biology of Reproduction*, 19: 77-83.
- Smith JF, 1991.** A review of recent developments on the effect nutrition on ovulation rate. *Proceedings New Zealand Society of Animal Production*, 51: 15-23.
- Smith JF, Stewart RD, 1990.** Reproductive Physiology of Merino Sheep: Concepts and Consequences. Oldham CM, Martin GB, Purvis IW (eds), University of Western Australia, Perth, pp. 85-101.
- Smith JT, Clarke IJ, 2010.** Seasonal breeding as a neuroendocrine model for puberty in sheep. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 324: 102-109.
- Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK, Steiner RA, 2005.** Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology*, 146: 3686-3692.
- Smith JT, Coolen LM, Kriegsfeld LJ, Sari IP, Jaafarzadehshirazi MR, Maltby M, Bateman K, Goodman RL, Tilbrook AJ, Ubuka T, Bentley GE, Clarke IJ, Lehman MN, 2008.** Variation in kisspeptin and RFamide-related peptide (RFRP) expression and terminal connections to gonadotropin-releasing hormone neurons in the brain: a novel medium for seasonal breeding in the sheep. *Endocrinology*, 149: 5770-5782.
- Smith JT, Li Q, Pereira A, Clarke IJ, 2009a.** Kisspeptin neurons in the ovine arcuate nucleus and preoptic area are involved in the preovulatory luteinizing hormone surge. *Endocrinology*. 150: 5530-5538.
- Smith JT, Saleh SN, Clarke IJ, 2009b.** Seasonal and cyclical change in the luteinizing hormone response to kisspeptin in the ewe. *Neuroendocrinology*, 90: 283-291.
- Snyder SH, Axelrod J, 1964.** A sensitive assay for 5-hydroxytryptophan decarboxylase. *Biochemical Pharmacology*, 13: 805-806.
- Souza CJH, Campbell BK, Webb R, Baird DT, 1997.** Secretion of inhibin A and follicular dynamics throughout the estrous cycle in the sheep with and without the Booroola gene (*Fec^B*). *Endocrinology*, 138: 5333-5340.
- Spencer TE, Bazer FW, 1995.** Temporal and spatial alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe. *Biology of Reproduction*, 53: 1527-1543.
- Speroff L, Glass RH, Kase NG, 2006.** *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*, 7^a Edición, Ed. Baltimore, Williams and Wikins.

- Stanley BG, Leibowitz SF, 1985.** Neuropeptide Y injection in the paraventricular hypothalamus: a powerful stimulant of feeding behavior. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 82: 3940-3943.
- Stankov B, Cozzi B, Lucini V, Fumagalli P, Scaglione F, Fraschini F, 1991.** Characterization and mapping of melatonin receptors in the brain of three mammalian species: rabbit, horse and sheep. A comparative *in vitro* binding study. Neuroendocrinology, 53: 214-221.
- Stehle JH, Von Gall C, Schomerus C, Korf HW, 2001.** Of rodents and ungulates and melatonin: creating a uniform code for darkness by different signaling mechanisms. Journal of Biological Rhythms, 16: 312-325.
- Stirland JA, Johnston JD, Cagampang FR, Morgan PJ, Castro MG, White MR, Davis JR, Loudon AS, 2001.** Photoperiodic regulation of prolactin gene expression in the Syrian hamster by a *pars tuberalis*-derived factor. Journal of Neuroendocrinology, 13: 147-157.
- Stokkan KA, Vaughan MK, Reiter RJ, Folkow LP, Matersson PE, Sager G, Lydersen C, Blix AS, 1995.** Pineal and thyroid functions in newborn seals. General and Comparative Endocrinology, 98: 321-331.
- Suganuma C, Kuroiwa T, Tanaka T, Kamomae H, 2007.** Changes in the ovarian dynamics and endocrine profiles in goats treated with a progesterone antagonist during the early luteal phase of the estrous cycle. Animal Reproduction Science, 101: 285-294.
- Sweeney T, Donovan A, Roche JF, O'Callaghan D, 1997.** Variation in the ability of a long day followed by a short day photoperiod signal to initiate reproductive activity in ewes at different times of the year. Journal of Reproduction and Fertility, 109: 121-127.
- Szmuszkowicz AM, Heinzelman RV, 1960.** Synthesis of N-acetyl-5-methoxytryptamine. Journal of Organic Chemistry, 25: 857-859.
- Szymanski LA, Schneider JE, Friedman MI, Ji H, Kurose Y, Blache D, Rao A, Dunshea FR, Clarke IJ, 2007.** Changes in insulin, glucose and ketone bodies, but not leptin or body fat content precede restoration of luteinising hormone secretion in ewes. Journal of Neuroendocrinology, 19: 449-460.
- Tagliamonte A, Fratta W, Del Fracco M, Gessa GL, 1973.** Evidence that brain dopamine stimulates copulatory behavior in male rats. Rivista di Farmacologia e Terapia, 4: 177-181.

- Tamanini C, Prandi A, Biacchessi D, De Rensis F, 1987.** Effects of melatonin treatment on the onset of ovarian activity, reproductive parameters and prolactin plasma levels of immature ewes. *Animal Reproduction Science*, 13: 283-290.
- Tamarkin L, Baird CJ, Almeida F, 1985.** Melatonin: a coordinating signal for mammalian reproduction? *Science*, 227: 714-720.
- Tan DX, Manchester LC, Hardeland R, Lopez-Burillo S, Mayo JC, Sainz RM, Reiter RJ, 2003.** Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. *Journal of Pineal Research*, 34: 75-78.
- Tanaka T, Akaboshi N, Inoue Y, Kamomae H, Kaneda Y, 2002.** Fasting-induced suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion in related to body energy status in ovariectomized goats. *Animal Reproduction Science*, 72: 185-196.
- Tappaz M, Aguera M, Belin MF, Pujol JF, 1980.** Autoradiography of GABA in the rat hypothalamic median eminence. *Brain Research*, 186: 379-381.
- Tasker JG, Di S, Boudaba C, 2002.** Functional synaptic plasticity in hypothalamic magnocellular neurons. *Progress in Brain Research*, 139: 113-119.
- Tessonnaud A, Locatelli A, Caldani M, Viguiet-Martínez MC, 1995.** Bilateral lesions of the suprachiasmatic nuclei alter the nocturnal melatonin secretion in sheep. *Journal of Neuroendocrinology*, 7: 145-152.
- Theodosis DT, Piet R, Poulain DA, Oliet SH, 2004.** Neuronal, glial and synaptic remodeling in the adult hypothalamus: functional consequences and role of cell surface and extracellular matrix adhesion molecules. *Neurochemistry International*, 45: 491-501.
- Theriez M, 1984.** Influence d'alimentation sur les performances de reproduction des ovins. 9èmes Jour Rech Ovi Cap, INRA, 294-326.
- Thibault C, Levasseur MC, 1979.** La fonction ovarienne chez les mammifères. En: *Actualités Scientifiques et Agronomiques de l'INRA*. Ed. Masson. Paris.
- Thiéry JC, Malpaux B, 2003.** Seasonal regulation of reproductive activity in sheep: modulation of access of sex steroids to the brain. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1007: 169-175.
- Thiéry JC, Martin GB, Tillet Y, Caldani M, Quentin M, Jamain C, Ravault JP, 1989.** Role of hypothalamic catecholamines in the regulation of luteinizing hormone and prolactin secretion in the ewe during seasonal anoestrus. *Neuroendocrinology*, 49: 80-87.

- Thiéry JC, Gayrard V, Le Corre S, Vigié C, Martin GB, Chemineau P, Malpaux B, 1995.** Dopaminergic control of LH secretion by the A15 nucleus in anestrus ewes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 49: 285-296.
- Thiéry JC, Chemineau P, Hernandez X, Migaud M, Malpaux B, 2002.** Neuroendocrine interactions and seasonality. *Domestic Animal Endocrinology*, 23: 87-100.
- Thiéry JC, Lomet D, Schumacher M, Liere P, Tricoire H, Locatelli A, Delagrangé P, Malpaux B, 2006.** Concentrations of estradiol in ewe cerebrospinal fluid are modulated by photoperiod through pineal-dependent mechanisms. *Journal of Pineal Research*, 41: 306-312.
- Thimonier J, 1989.** Contrôle photopériodique de l'activité ovulatoire chez la brebis. Existence de rythmes endogènes. Doctoral Thesis. University of Tours, France, pp. 116.
- Thomas GB, Cummins JT, Hammond JM, Horton RJ, Clarke IJ, 1986.** Prolonged secretion of prolactin in response to thyrotrophin-releasing hormone after hypothalamo-pituitary disconnection in the ewe. *Journal of Endocrinology*, 111: 433-438.
- Thomas GB, Cummins JT, Doughton BW, Griffin N, Smythe GA, Gleeson RM, Clarke IJ, 1989.** Direct pituitary inhibition of prolactin secretion by dopamine and noradrenaline in sheep. *Journal of Endocrinology*, 123: 393-402.
- Tijmes M, Pedraza R, Valladaraes LE, 1996.** Melatonin in the rat testis: evidence for the local synthesis. *Steroids*, 61: 65-68.
- Toda K, Shizuta Y, 1993.** Molecular cloning of a cDNA showing alternative splicing of the 5'-untranslated sequence of mRNA for human aromatase P-450. *European Journal of Biochemistry*, 213: 383-389.
- Todini L, Malfatti A, Valbonesi A, Trabalza-Marinucci M, Debenedetti A, 2007.** Plasma total T3 and T4 concentrations in goats at different physiological stages, as affected by the energy intake. *Small Ruminant Research*, 68: 285-290.
- Tortonese DJ, 1999.** Interaction between hypothalamic dopaminergic and opioidergic systems in the photoperiodic regulation of pulsatile luteinizing hormone secretion in sheep. *Endocrinology*, 140: 750-757.
- Tortonese DJ, Brooks J, Ingleton P, McNeilly JR, McNeilly AS, 1996.** Prolactin receptor gene expression and specific translation of the signal in the ovine

- anterior hypothalamus and pituitary gonadotrophs. Programme 78th Annual Meeting of the Endocrine Society, San Francisco, CA, pp. 1-673,
- Tosini G, Menaker M, 1998.** The clock in the mouse retina: melatonin synthesis and photoreceptor degeneration. *Brain Research*, 789: 221-228.
- Tosini G, Dirden JC, 2000.** Dopamine inhibits melatonin release in the mammalian retina: *in vitro* evidence. *Neuroscience Letters*, 286: 119-122.
- Tricoire H, 2002.** La Mélatonine du liquide céphalorachidien: voie de libération et rôle dans l'intégration de la photopériode. Doctoral Thesis. University of Tours, Francia, pp. 166.
- Tricoire H, Locatelli A, Chemineau P, Malpoux B, 2002.** Melatonin enters the cerebrospinal fluid through the pineal recess. *Endocrinology*, 143: 84-90.
- Trout WE, Malven PV, 1987.** Effects of exogenous estradiol-17 β and progesterone on naloxone-reversible inhibition of the release of luteinizing hormone in ewes. *Journal of Animal Science*, 65: 1602-1609.
- Tsonis CG, McNeilly AS, Baird DT, 1988.** Inhibin secretion by the sheep ovary during the luteal and follicular phases of the oestrous cycle and following stimulation with FSH. *Journal of Endocrinology*, 117: 283-291.
- Tsuruo Y, Kawano H, Kagotani Y, Hisano S, Diakuko S, Chihara K, Zhang T, Yanaihara N, 1990.** Morphological evidence for neuronal regulation of luteinizing hormone-releasing hormone-containing neurons by neuropeptide Y in the rat septopreoptic area. *Neuroscience Letters*, 110: 261-266.
- Tucker HA, Ringer RK, 1982.** Controlled photoperiodic environments for food animals. *Science* 216:1381-1386.
- Turek FW, Swann J, Earnest DJ, 1984.** Role of the circadian system in reproductive phenomena. *Recent Progress in Hormone Research*, 40: 143-183.
- Valencia M, Sánchez F, 1984.** Características de la reproducción de los caprinos. *Memorias I Congreso de AZTECA*. Querétaro, México, pp. 260-265.
- Valencia J, Bustamante G, 1986.** Reproducción de los animales domésticos. *Ovinos y Caprinos*. Ed. Limusa. México: 347-361
- Valencia J, Zarco L, Ducoing A, Murcia C, Navarro R, 1990.** Breeding season of creole and granadina goats under constant nutritional level in the mexican highlands. En: *Livestock Reproduction in Latin America*. International Atomic Energy Agency (Vienna), pp. 321-333.

- Vanecek J, Pavlík A, Illnerová H, 1987.** Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography. *Brain Research*, 435: 359-362.
- Véliz FG, Poindron P, Malpoux B, Delgadillo JA, 2006.** Positive correlation between the body weight of anestrus goats and their response to the male effect with sexually active bucks. *Reproduction, Nutrition and Development*, 46: 657-661.
- Viguié C, Caraty A, Locatelli A, Malpoux B, 1995.** Regulation of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) secretion by melatonin in the ewe. II. Changes in N-methyl-D,L-aspartic acid-induced LHRH release during the stimulation of luteinizing hormone secretion by melatonin. *Biology of Reproduction*, 52: 1156-1161.
- Viguié C, Thibault J, Thiéry JC, Tillet Y, Malpoux B, 1997.** Characterization of the short day-induced decrease in median eminence tyrosine hydroxylase activity in the ewe: temporal relationship with the changes in LH and prolactin secretion and short day-like effect of melatonin. *Endocrinology*, 138: 499-506.
- Viguié C, Jansen HT, Glass JD, Watanabe M, Billings HJ, Coolen L, Lehman MN, Karsch FJ, 2001.** Potential for polysialylated form of neural cell adhesion molecule-mediated neuroplasticity within the gonadotropin-releasing hormone neurosecretory system of the ewe. *Endocrinology*, 142: 1317-1324.
- Vijayan E, McCann SM, 1978.** The effects of intraventricular injection of gamma-aminobutyric acid (GABA) on prolactin and gonadotrophin release in conscious female rats. *Brain Research*, 155: 35-43.
- Vincent SR, Hökfelt T, Wu JY, 1982.** GABA neuron systems in hypothalamus and the pituitary gland. Immunohistochemical demonstration using antibodies against glutamate decarboxylase. *Neuroendocrinology*, 34: 117-125.
- Viñoles C, 2003.** Effect of nutrition on follicle development and ovulation rate in the ewe. Doctoral Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, pp. 56.
- Viñoles C, Forsberg M, Martin GB, Cajarville C, Repetto J, Meikle A, 2005.** Short-term nutritional supplementation of ewes in low body condition affects follicle development due to an increase in glucose and metabolic hormones. *Reproduction*, 129: 299-309.
- Vivien-Roels B, Pévet P, Zarazaga L, Malpoux B, Chemineau P, 1999.** Daily and light-at-night induced variations of circulating 5-methoxytryptophol (5-ML) in

- ewes with respectively high and low nocturnal melatonin secretion. *Journal of Pineal Research*, 27: 230-236.
- Vollrath L, 1981.** The Pineal Organ. En: Okscheand A, Vollrath L (eds), *Handbuch der mikroskopischen anatomie des menchen*. Berlín, Springer-Verlag. Vol.VI/7.
- Vriend J, 1983.** Pineal-thyroid interactions. *Pineal Research Reviews*, 1: 183-206.
- Wade GN, Schneider JE, Li HY, 1996.** Control of fertility by metabolic cues, *American Journal of Physiology*, 270: 1-19.
- Wagner S, Castel M, Gainer H, Yarom Y, 1997.** GABA in the mammalian suprachiasmatic nucleus and its role in diurnal rhythmicity. *Nature*, 387: 598-603.
- Wagner GC, Johnston JD, Clarke IJ, Lincoln GA, Hazlerigg DG, 2008.** Redefining the limits of day length responsiveness in a seasonal mammal. *Endocrinology*, 149: 32-39.
- Walkden-Brown SW, Bocquier F, 2000.** Nutritional regulation of reproduction in goats. *Proceedings of the 7th International Conference on Goats, France, 15-21 May*, pp. 389-395.
- Walkden-Brown SW, Restall BJ, Norton BW, Scaramuzzi RJ, Martin GB, 1994a.** Effect of nutrition on seasonal patterns of LH, FSH and testosterone concentration, testicular mass, sebaceous gland volume and odour in Australian cashmere goats. *Journal of Reproduction and Fertility*, 102: 351-360.
- Walkden-Brown SW, Restall BJ, Norton BW, Scaramuzzi RJ, 1994b.** The 'female effect' in Australian cashmere goats: effect of season and quality of diet on the LH and testosterone response of bucks to oestrous does. *Journal of Reproduction and Fertility*, 100: 521-531.
- Walkden-Brown SW, Restall BJ, Scaramuzzi RJ, Martin GB, Blackberry MA, 1997.** Seasonality in male Australian cashmere goats: Long term effects of castration and testosterone or oestradiol treatment on changes in LH, FSH and prolactin concentrations, and body growth. *Small Ruminant Research*, 26: 237-250.
- Walton JS, McNeilly JR, McNeilly AS, Cunningham FJ, 1977.** Changes in concentrations of follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, prolactin and progesterone in the plasma of ewes during the transition from anestrus to breeding activity. *Journal of Endocrinology*, 75: 127-136.

- Warren MP, Voussoughian F, Geer EB, Hyle EP, Adberg CL, Ramos RH, 1999.** Functional hypothalamic amenorrhea: hypoleptinemia and disordered eating. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84: 873-877.
- Watson RR, 2011.** Melatonin in the promotion of health. 2^{da} Edición. Ed Taylor y Francis, pp. 350.
- Watson J, Shepherd TS, Dodson KS, 1979.** Prostaglandin E-2-9-ketoreductase in ovarian tissues. *Journal of Reproduction and Fertility*, 57: 489-496.
- Wayne NL, Malpaux B, Karsch FJ, 1990.** Photoperiodic requirements for timing the onset and duration of the breeding season of the ewe: synchronization of an endogenous rhythm of reproduction. *Journal of Comparative Physiology*, 166: 835-842.
- Webb R, Gauld IK, 1985.** Genetics and physiology of follicle recruitment and maturation during seasonal anoestrus. En: Ellendorff F, Elsaesser F (eds), *Endocrine Causes of Seasonal and Lactational Anestrus in Farm Animals*. Martinus Nijhoff, Lancaster, pp. 19-28.
- Webster GM, Haresign W, 1983.** Seasonal changes in LH and prolactin concentrations in ewes of two breeds. *Journal of Reproduction and Fertility*, 67: 465-471.
- Welsh DK, Logothetis DE, Meister M, Reppert SM, 1995.** Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron*, 14: 697-706.
- Welsh DK, Takahashi JS, Kay SA, 2010.** Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. *Annual Review of Physiology*, 72: 551-577.
- Wetteman RP, Tucker HA, 1974.** Relationship of ambient temperature to serum prolactin in heifers. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 146: 908-911.
- Wheeler AG, Land RB, 1977.** Seasonal variation in oestrus and ovarian activity of Finnish Landrace, Tasmanian Merino and Scottish Blackface ewes. *Animal Production*, 24: 363-376.
- Whisnant CS, Goodman RL, 1988.** Effects of an opioid antagonist on pulsatile luteinizing hormone secretion in the ewe vary with changes in steroid negative *feedback*. *Biology of Reproduction*, 39:1032-1038.

- Whisnant CS, Goodman RL, 1990.** Further evidence that serotonin mediates the steroid-independent inhibition of luteinizing hormone secretion in anestrus ewes. *Biology of Reproduction*, 42: 656-661.
- Wiechmann AF, 1986.** Melatonin: parallels in pineal gland and retina. *Experimental Eye Research*, 42: 507-528.
- Wolde-Michael T, Miller HM, Holmes JH, McGregor BA, Galloway DB, 1989.** Effect of supplementary feeding and zeranol on puberty in feral Cashmere goats. *Australian Veterinary Journal*, 66: 124-126.
- Woodfill CJ, Robinson JE, Malpaux B, Karsch FJ, 1991.** Synchronization of the circannual reproductive rhythm of the ewe by discrete photoperiodic signal. *Biology of Reproduction*, 45: 110-121.
- Woodruff TK, Meunier H, Jones PB, Hsueh AJ, Mayo KE, 1987.** Rat inhibin: molecular cloning of alpha and beta-subunit complementary deoxyribonucleic acids and expression in the ovary. *Molecular Endocrinology*, 1: 561-568.
- Worthy K, Haresign W, Dodson S, McLeod BJ, Foxcroft GR, Haynes NB, 1985.** Evidence that the onset of the breeding season in the ewe may be independent of decreasing plasma prolactin concentrations. *Journal of Reproduction and Fertility*, 75: 237-246.
- Wright PJ, Geytenbeek PE, Clarke IJ, 1990.** The influence of nutrient status of post-partum ewes on ovarian cyclicity and on the oestrous and ovulatory responses to ram introduction. *Animal Reproduction Science*, 23: 293-303.
- Xia Orong, Zhang, 1996.** Opioid modulation of reproductive endocrine activity in female goats. 3. Effects of morphine and naloxone on the secretion of gonadotrophins. *Chinese Journal Veterinary Science*, 16: 50-54.
- Yang K, Haynes NB, Lamming GE, Brooks AN, 1988.** Ovarian steroid hormone involvement in endogenous opioid modulation of LH secretion immature ewes during the breeding and non-breeding season. *Journal of Reproduction and Fertility*, 83: 129-139.
- Yang KP, Lamming GE, Haynes NB, Brooks AN, 1989.** Failure of melatonin to influence endogenous opioid effects on LH secretion in the anoestrous ewe. *Journal of Reproduction and Fertility*, 85: 397-403.
- Yeates NTM, 1949.** The breeding season of the ewe with particular reference to its modification by artificial light. *Journal of Agriculture Science, Cambridge*, 39: 1-43.

- Yeleswaram K, McLaughlin LG, Knipe JO, Schabdach D, 1997.** Pharmacokinetics and oral bioavailability of exogenous melatonin in preclinical animal models and clinical implications. *Journal of Pineal Research*, 22: 45-51.
- Yellon SM, Longo LD, 1988.** Effect of maternal pinealectomy and reverse photoperiod on the circadian melatonin rhythm in the sheep and fetus during the last trimester of pregnancy. *Biology of Reproduction*, 39: 1093-1099.
- Yoshikawa T, Yamazaki S, Menaker M, 2005.** Effects of preparation time on phase of cultured tissues reveal complexity of circadian organization. *Journal of Biological Rhythms*, 20: 500-512.
- Young IM, Leone RM, Francis P, Stovell P, Silman RE, 1985.** Melatonin is metabolized to N-acetyl serotonin and 6-hydroxymelatonin in man. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 60: 114-119.
- Yu HS, Pang SF, Tang PL, 1981.** Increase in the level of retinal melatonin and persistence of its diurnal rhythm in rats after pinealectomy. *Journal of Endocrinology*, 91: 477-482.
- Yu HS, Reiter RJ, 1993.** Melatonin. Biosynthesis, physiological effects and clinical applications. Salem, CRC Press.
- Zarazaga LA, 1994.** Reactivación de la actividad ovárica e hipofisaria tras el parto en ovejas de reducida estacionalidad sexual: influencia de la aplicación de melatonina exógena y del plano de alimentación tras el destete. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza, España, pp. 304.
- Zarazaga LA, Malpoux B, Chemineau P, 1996a.** Characteristics of the plasma melatonin rhythm are not modified by steroids during the estrous cycle in Ile-de-France ewes. *Journal of Pineal Research*, 21: 114-120.
- Zarazaga LA, Malpoux B, Chemineau P, 1996b.** The characteristics of the melatonin secretory rhythm are not modified by the stage of pregnancy in ewes. *Reproduction, Nutrition and Development*, 36: 105-112.
- Zarazaga LA, Malpoux B, Locatelli A, Todini L, Maurice-Mandon F, Chemineau P, 1997.** Comparación de las concentraciones plasmáticas de melatonina en ambas venas yugulares de ovejas Ile-de-France. *ITEA Vol Extra* 18: 493-495.
- Zarazaga LA, Malpoux B, Guillaume D, Bodin L, Chemineau P, 1998a.** Genetic variability in melatonin concentrations in ewes originates in its synthesis, not in its catabolism. *Animal Journal of Physiology*, 274: 1086-1090.

- Zarazaga LA, Malpaux B, Bodin L, Chemineau P, 1998b.** The large variability in melatonin blood levels in ewes is under strong genetic influence. *American Journal of Physiology*, 274: 607-610.
- Zarazaga LA, Chemineau P, Todini L, Malpaux B, 1999.** Melatonin concentrations vary dramatically between the two jugular veins of most individuals in sheep. 8th Meeting of the European Pineal Society, 3-7 Julio, Tours (France). C03.
- Zarazaga LA, Chemineau P, Malpaux B, Forcada F, 2000.** La melatonina: síntesis, ritmo de secreción y catabolismo. En: *Papel del fotoperiodo y la melatonina en la actividad reproductora*. Monografía OVIS, n°71, pp. 35-58.
- Zarazaga LA, Malpaux B, Chemineau P, 2003.** Amplitude of the plasma melatonin nycthemeral rhythms is not associated with the dates of onset and offset of the seasonal ovulatory activity in the Ile-de-France ewe. *Reproduction, Nutrition and Development*, 43: 167-177.
- Zarazaga LA, Guzmán JL, Domínguez MC, Pérez MC, Prieto R, 2005.** Effect of plane of nutrition on seasonality of reproduction in Spanish Payoya goats. *Animal Reproduction Science*, 87: 253-267.
- Zarazaga LA, Gatica MC, Celi I, Guzmán JL, Malpaux B, 2009a.** Effect of melatonin implants on sexual activity in Mediterranean goat females without separation from males. *Theriogenology*, 72: 910-918.
- Zarazaga LA, Gatica MC, Celi I, Guzmán JL, Malpaux B, 2009b.** Utilización de fotoperiodo y melatonina en el control de la reproducción en la especie caprina. *Proceedings XVIII Congresso de Zootecnia. II Congreso Iberoamericano de Zootecnia*, 6 a 9 de Maio de 2009, Utad, Vila Real, Portugal. ISBN: 978-989-96219-1-6.
- Zarazaga LA, Guzmán JL, Domínguez C, Pérez MC, Prieto R, Sánchez J, 2009c.** Nutrition level and season of birth do not modify puberty of Payoya goat kids. *Animal*, 3: 79-86.
- Zarazaga LA, Todini L, Chemineau P, Marnet P-G, Locatelli A, Malpaux B, 2010.** Nocturnal melatonin concentrations vary dramatically between the two jugular veins in most individual sheep maintained under mimicked or natural photoperiod. *Research in Veterinary Science*, 88: 233-238.
- Zarazaga LA, Celi I, Guzmán JL, Malpaux B, 2011.** Enhancement of the male effect on reproductive performance in female Mediterranean goats with long day

and/or melatonin treatment. The Veterinary Journal, Nov 10
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.09.012>

- Zarjevski N, Cusin I, Vetter R, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B, 1993.** Chronic intracerebroventricular neuropeptide-Y administration to normal rats mimics hormonal and metabolic changes of obesity. *Endocrinology*, 133: 1753-1758.
- Zavala AMP, Galina HM, Valencia J, Fuentes HVO, Ortiz MR, 1998.** Effect of naloxone in male Polypay sheep during mating, synchronized outside the reproductive season. *Advances in Agricultural Research*, 7: 203-207.
- Zeleznik AJ, Midgley AR Jr, Reichert LE Jr, 1974.** Granulosa cell maturation in the rat: increased binding of human chorionic gonadotropin following treatment with follicle-stimulating hormone *in vivo*. *Endocrinology*, 95: 818-825.
- Zemdegs IZ, McMillen IC, Walker DW, Thorburn GD, Nowak R, 1988.** Diurnal rhythms in plasma melatonin concentrations in the fetal sheep and pregnant ewe during late gestation. *Endocrinology*, 123: 284-289.
- Zhang S, Blache D, Blackberry MA, Martin GB, 2004.** Dynamics of the responses in secretion of LH, leptin and insulin following an acute increase in nutrition in mature male sheep. *Reproduction, Fertility and Development*, 16: 823-829.
- Zhang S, Blache D, Blackberry MA, Martin GB, 2005.** Body reserves affect the reproductive endocrine responses to an acute change in nutrition in mature male sheep. *Animal Reproduction Science*, 88: 257-269.
- Zieba D, Klocek B, Williams G, Romanowicz K, Boliglowska L, Wozniak M, 2007.** *In vitro* evidence that leptin suppresses melatonin secretion during long days and stimulates its secretion during short days in seasonal breeding ewes. *Domestic Animal Endocrinology*, 33: 358-365.
- Zigmond RE, Baldwin C, Bowers CW, 1981.** Rapid recovery of function after partial denervation of the rat pineal gland suggests a novel mechanism for neural plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 78: 3959-3963.
- Zigmond RE, Baldwin C, Bowers CW, 1985.** Rapid recovery of pineal function after partial denervation: a possible role for heteroneuronal uptake of transmitter in modulating synaptic efficacy. *Journal of Neuroscience*, 5: 142-150.

Zúniga O, 2002. Mecanismos de actuación de la melatonina en ovinos mediterráneos: implicación dopaminérgica, serotoninérgica y del plano de alimentación. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza, España, pp. 251.

OTRAS PUBLICACIONES DERIVADAS

OTRAS PUBLICACIONES DERIVADAS

Publicación 1. Se corresponde con el objetivo 2.

Tipo de publicación: Póster.

Implicación nutricional y neuroendocrinológica en el control de la secreción de la hormona luteinizante en hembras caprinas Mediterráneas durante el inicio de la estación reproductiva.

Nutritional and neuroendocrinological involvement in the control of luteinizing hormone secretion of Mediterranean female goats during the onset of the breeding season.

Luis Ángel Zarazaga, Irma Celi, José Luis Guzmán, Benoît Malpoux

Actas del 60th Annual Meeting of the European Federation of Animal Science (EAAP)
24-26 de Agosto (2009). Barcelona (España).

Nutritional and neuroendocrinological involvement in the control of luteinizing hormone secretion of Mediterranean female goats during the onset of the breeding season

Zarazaga, L.A.¹, Celi, I.¹, Guzmán, J.L.¹ and Maipaux, B.², ¹University of Huelva, E.P.S. La Rabida, 21819, Palos de la Frontera, Spain, ²Physiologie de la Reproduction et des Comportements, INRA, 37380 Nouzilly, France; zarazaga@uhu.es

The role of nutrition and different neuroendocrinological systems (opioidergic, dopaminergic and serotonergic systems) on LH secretion was investigated in Mediterranean goats during the onset of the breeding season. At the onset of the experiment, the animals were allocated to two experimental groups differing on the level of nutrition. The control nutrition group (C, n=9) received their maintenance requirements and the low nutrition group (L, n=9) received 0.7 times their maintenance requirements. Both groups were balanced for live weight (LW) and body condition score (BCS) at the beginning of the study. All animals were ovariectomized, treated with an oestradiol implant, and subjected to a series of 3 months of short (8L:16D) and long days (16L:8D) to stimulate or inhibit their LH secretion. The effects of intravenous injections of the opiate receptor antagonist naloxone (2 mg/kg), the dopaminergic D₂ receptor antagonist pimozide (0.75 mg/kg) and the 5-hydroxytryptamine receptor antagonist cyproheptadine (0.75 mg/kg) on LH pulsatility were assessed during the onset of the breeding season. Blood samplings were done from 3 h before treatment until 3 h after treatment at 10 min intervals. A clear effect of level of nutrition was observed on mean LH concentrations before injection of the different antagonist (0.95±0.04 ng/ml vs 0.57±0.03 ng/ml, respectively, $P < 0.001$). In comparison with the pre-injection period, naloxone significantly increased the mean LH concentrations in C group. These results provide evidence that dopaminergic or serotonergic systems seems to be not involved in the inhibition of LH secretion at the onset of the breeding season, however the ability of naloxone to increase LH concentrations at this period could be enhanced by a higher plane of nutrition in Mediterranean goat females.



Nutritional and neuroendocrinological involvement in the control of luteinizing hormone secretion of Mediterranean goat females during the onset of the breeding season

Zarazaga, L.A., Celi, I., Guzmán, J.L., Malpoux, B.*

Universidad de Huelva, E.P.S. La Rábida, Carretera de Palos de la Frontera s/n, 21819, Huelva, Spain.
*Physiologie de la Reproduction et des Comportements, INRA, 37380 Nouzilly, France.



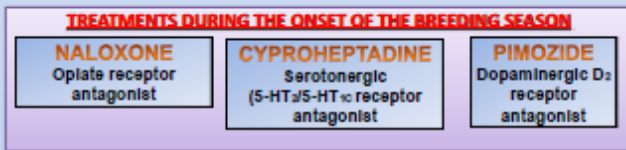
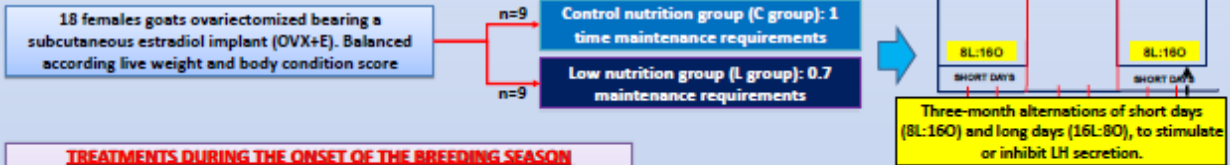
INTRODUCTION

- Mediterranean female goats shows a clear seasonality of their reproductive activity. This seasonality is controlled by photoperiod but it is strongly influenced by different factors, like level of nutrition and neuroendocrinological systems.
- There are very few studies on goats about the role of the different neuroendocrinological mechanisms on the seasonal variations of the reproductive activity of female goats.

AIMS

- Determine the role of different neuroendocrinological systems (opioidergic, dopaminergic, and serotonergic systems) in the control of LH secretion in Mediterranean goat females and whether such role could be modified by nutrition during the onset of the breeding season.

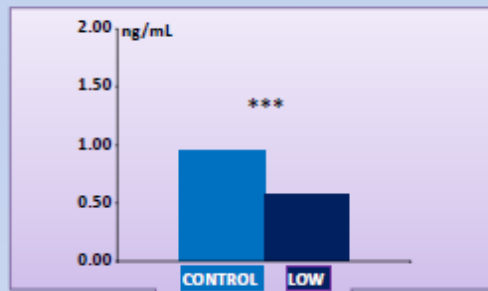
MATERIAL AND METHODS



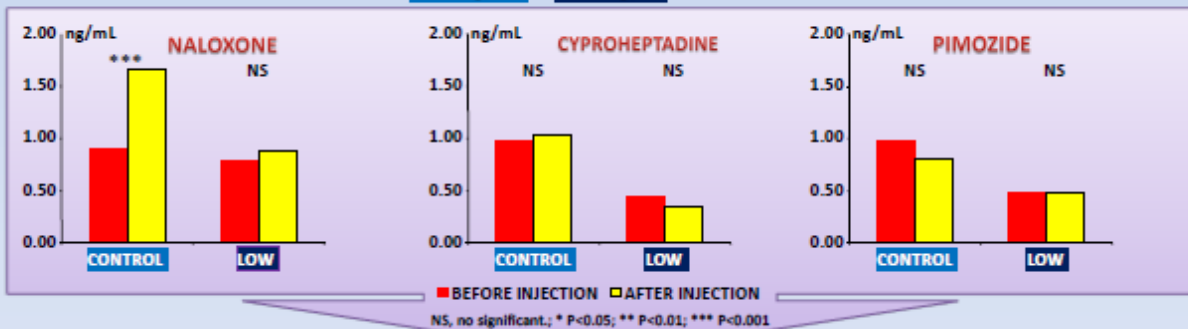
6 hours of yugular blood sampling at 10 mins intervals
3 h (vehicle) + 3 h (treatment)

LH concentrations before and after treatment.

RESULTS



A clear effect of level of nutrition was observed on mean LH concentrations before injection of the different antagonist (0.95 ng/mL vs 0.57 ng/mL, respectively, P<0.001).



In comparison with the pre-injection period, **naloxone** significantly increased the mean LH concentrations in the C group.

CONCLUSIONS

Results provide evidence that dopaminergic or serotonergic systems seems to be not involved in the inhibition of LH secretion at the onset of the breeding season, however the ability of naloxone to increase LH concentrations at this period could be enhanced by a higher plane of nutrition in Mediterranean goat females.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Grant AGL2006-01426 from C.I.C.Y.T. (Spain).

Publicación 2. Se corresponde con el objetivo 2.

Tipo de publicación: Póster.

Implicación nutricional y neuroendocrinológica en el control de la secreción de la hormona luteinizante en hembras caprinas Mediterráneas durante el anestro estacionario.

Nutritional and neuroendocrinological involvement in the control of luteinizing hormone secretion of Mediterranean female goats during the seasonal anoestrous.

Luis Ángel Zarazaga, Irma Celi, José Luis Guzmán, Benoît Malpoux

Actas del 60th Annual Meeting of the European Federation of Animal Science (EAAP)
24-26 de Agosto (2009). Barcelona (España).

Nutritional and neuroendocrinological involvement in the control of luteinizing hormone secretion of Mediterranean female goats during the seasonal anoestrous

Zarazaga, L.A.¹, Celi, I.¹, Guzmán, J.L.¹ and Maipaux, B.², ¹University of Huelva, E.P.S. La Rabida, 21819, Palos de la Frontera, Spain, ²Physiologie de la Reproduction et des Comportements, INRA, 37380 Nouzilly, France; zarazaga@uhu.es

The role of nutrition and different neuroendocrinological systems (opioidergic, dopaminergic and serotonergic systems) on LH secretion was investigated in Mediterranean goats during the seasonal anoestrous. At the onset of the experiment, the animals were allocated to two experimental groups differing on the level of nutrition. The control nutrition group (C, n=10) received their maintenance requirements and the low nutrition group (L, n=10) received 0.7 times their maintenance requirements. Both groups were balanced for live weight (LW) and body condition score (BCS) at the beginning of the study. All animals were ovariectomized, treated with an oestradiol implant, and subjected to a series of 3 months of short (8L:16D) and long days (16L:8D) to stimulate or inhibit their LH secretion. The effects of intravenous injections of the opiate receptor antagonist naloxone (2 mg/kg), the dopaminergic D₂ receptor antagonist pimozide (0.75 mg/kg) and the 5-hydroxytryptamine receptor antagonist cyproheptadine (0.75 mg/kg) on LH pulsatility were assessed during the seasonal anoestrous. Blood samplings were done from 3 h before treatment until 3 h after treatment at 10 min intervals. A clear effect of level of nutrition was observed on mean LH concentrations before injection of the different antagonist (0.23±0.02 ng/ml vs 0.09±0.01 ng/ml, for C and L group, respectively, $P < 0.001$). In comparison with the pre-injection period, pimozide significantly increased the mean LH concentrations in C group. These results provide evidence that endogenous opioid or the dopaminergic system do not seem to be involved in the inhibition of LH secretion in late anoestrous in Mediterranean goat females. That ability of pimozide to increase LH concentrations in deep anoestrous could be enhanced by a higher plane of nutrition in Mediterranean goat females.



Nutritional and neuroendocrinological involvement in the control of luteinizing hormone secretion of Mediterranean goat females during the seasonal anoestrus



Zarazaga, L.A., Celi, I., Guzmán, J.L., Malpoux, B.*

Universidad de Huelva, E.P.S. La Rábida, Carretera de Palos de la Frontera s/n, 21819, Huelva, Spain.
*Physiologie de la Reproduction et des Comportements, INRA, 37380 Nouzilly, France.



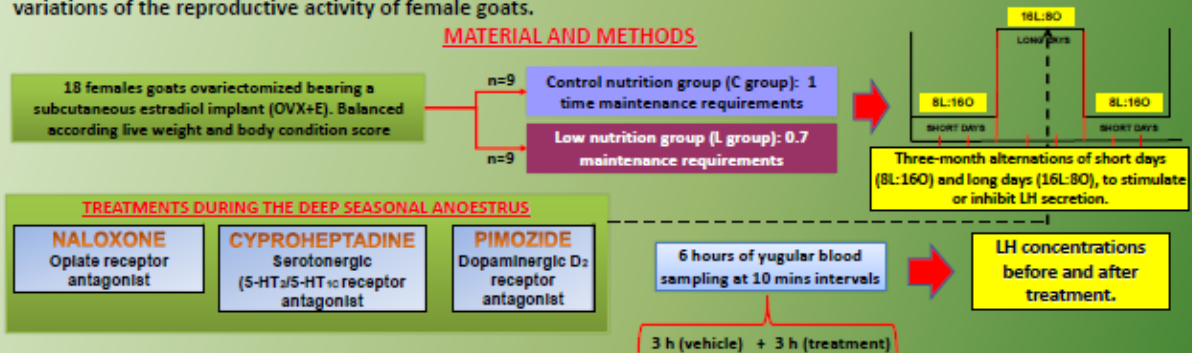
INTRODUCTION

- Mediterranean female goats show a clear seasonality of their reproductive activity. This seasonality is controlled by photoperiod, but is strongly affected by certain factors, such as level of nutrition and neuroendocrinological systems.
- There are very few studies on the role of the different neuroendocrinological mechanisms in the seasonal variations of the reproductive activity of female goats.

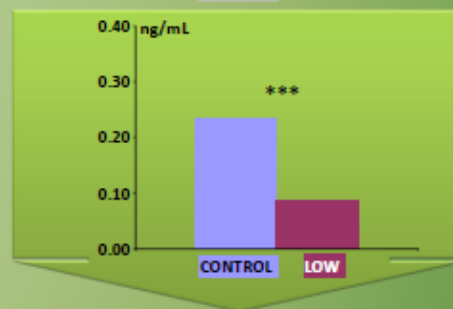
AIMS

- Determine the role of different neuroendocrinological systems (opioidergic, dopaminergic, and serotonergic systems) in the control of LH secretion and whether such role could be modified by nutrition in Mediterranean goat females during the deep seasonal anoestrus.

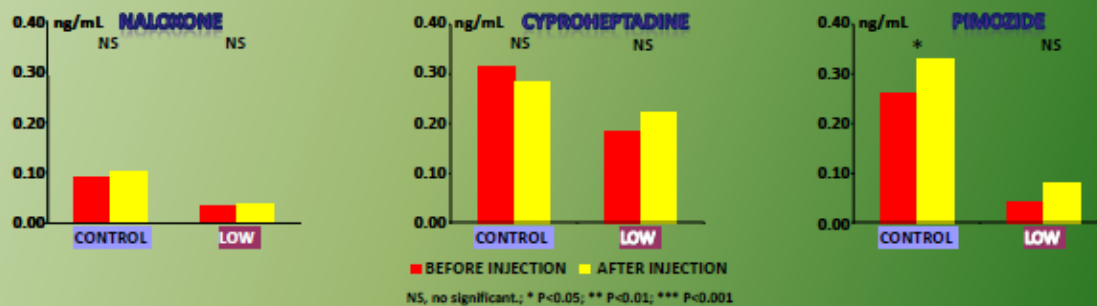
MATERIAL AND METHODS



RESULTS



A clear effect of level of nutrition was observed on mean LH concentrations before injection of the different antagonist used (0.23 ng/mL vs 0.09 ng/mL, respectively, $P < 0.001$).



In comparison with the pre-injection period, PIMOZIDE significantly increased the mean LH concentrations in the C group.

CONCLUSIONS

Results provide evidence that opioidergic or serotonergic systems seems to be not involved in the inhibition of LH secretion during the deep seasonal anoestrus, however the ability of pimozide to increase LH concentrations during the deep anoestrus in the control group indicates that the inhibitory effect on LH secretion of the dopaminergic system could be reduced by a higher plane of nutrition in Mediterranean goat females.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Grant AGL2006-01426 from C.I.C.Y.T. (Spain).

Publicación 3. Se corresponde con el objetivo 2.

Tipo de publicación: Póster.

Implicación nutricional y neuroendocrinológica en el control de la secreción de la hormona luteinizante en hembras caprinas Mediterráneas durante el inicio del anestro estacionario.

Nutritional and neuroendocrinological involvement in the control of luteinizing hormone secretion of Mediterranean female goats during the onset of the seasonal anoestrous.

Luis Ángel Zarazaga, Irma Celi, José Luis Guzmán, Benoît Malpoux

Actas del 60th Annual Meeting of the European Federation of Animal Science (EAAP)

24-26 de Agosto (2009). Barcelona (España).

Nutritional and neuroendocrinological involvement in the control of luteinizing hormone secretion of Mediterranean female goats during the onset of the seasonal anoestrous season

Zarazaga, L.A.¹, Celi, I.¹, Guzman, J.L.¹ and Malpica, B.², ¹University of Huelva, E.P.S. La Rabida, 21819, Palos de la Frontera, Spain, ²Physiologie de la Reproduction et des Comportements, INRA, 37380, Nouzilly, France; zarazaga@uhu.es

The role of nutrition and different neuroendocrinological systems (opioidergic, dopaminergic and serotonergic systems) on LH secretion was investigated in Mediterranean goats during the onset of the seasonal anoestrous. At the onset of the experiment, the animals were allocated to two experimental groups differing on the level of nutrition. The control nutrition group (C, n=10) received their maintenance requirements and the low nutrition group (L, n=10) received 0.7 times their maintenance requirements. Both groups were balanced for live weight (LW) and body condition score (BCS) at the beginning of the study. All animals were ovariectomized, treated with an oestradiol implant, and subjected to a series of 3 months of short (8L:16D) and long days (16L:8D) to stimulate or inhibit their LH secretion. The effects of intravenous injections of the opiate receptor antagonist naloxone (2 mg/kg), the dopaminergic D₂ receptor antagonist pimozide (0.75 mg/kg) and the 5-hydroxytryptamine receptor antagonist cyproheptadine (0.75 mg/kg) on LH pulsatility were assessed during the onset of the seasonal anoestrous. Blood samplings were done from 3 h before treatment until 3 h after treatment at 10 min intervals. A clear effect of level of nutrition was observed on mean LH concentrations before injection of the different antagonist (0.33±0.03 ng/ml vs 0.16±0.02 ng/ml, respectively, $P < 0.001$). In comparison with the pre-injection period, pimozide significantly increased the mean LH concentrations in C group. These results provide evidence that opioidergic or serotonergic systems seems to be not involved in the inhibition of LH secretion at the onset of the seasonal anoestrous. However, the ability of pimozide to increase LH concentrations could be enhanced by a higher plane of nutrition in Mediterranean goat females.



Zarazaga, L.A., Celi, I., Guzmán, J.L., Malpoux, B.*

Universidad de Huelva, E.P.S. La Rábida, Carretera de Palos de la Frontera s/n, 21819, Huelva, Spain.
*Physiologie de la Reproduction et des Comportements, INRA, 37380 Nouzilly, France.



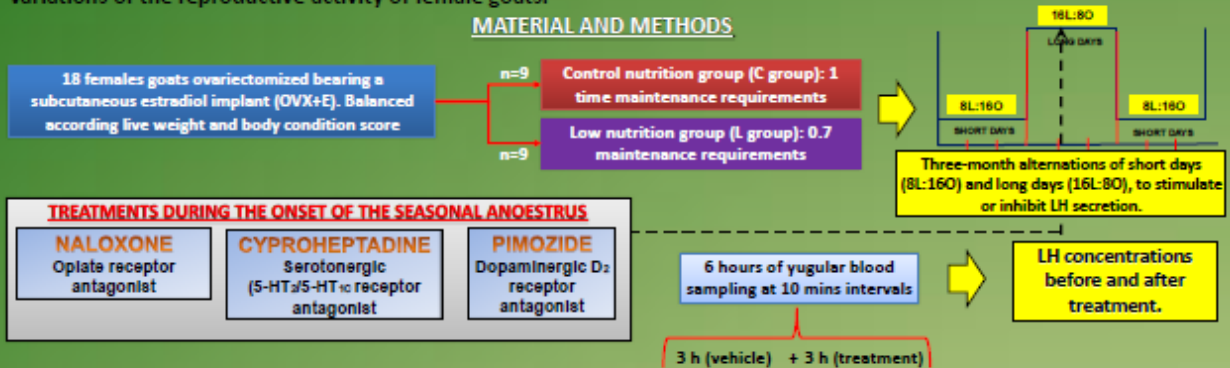
INTRODUCTION

- Mediterranean female goats shows a clear seasonality of their reproductive activity. This seasonality is controlled by photoperiod but it is strongly influenced by different factors, like level of nutrition and neuroendocrinological systems.
- There are very few studies on goats about the role of the different neuroendocrinological mechanisms on the seasonal variations of the reproductive activity of female goats.

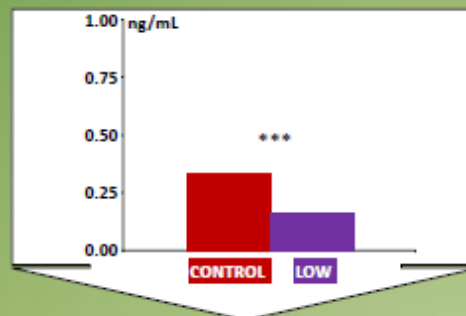
AIMS

- Determine the role of different neuroendocrinological systems (opioidergic, dopaminergic, and serotonergic systems) in the control of LH secretion in Mediterranean goat females and whether such role could be modified by nutrition during the onset of the seasonal anoestrus.

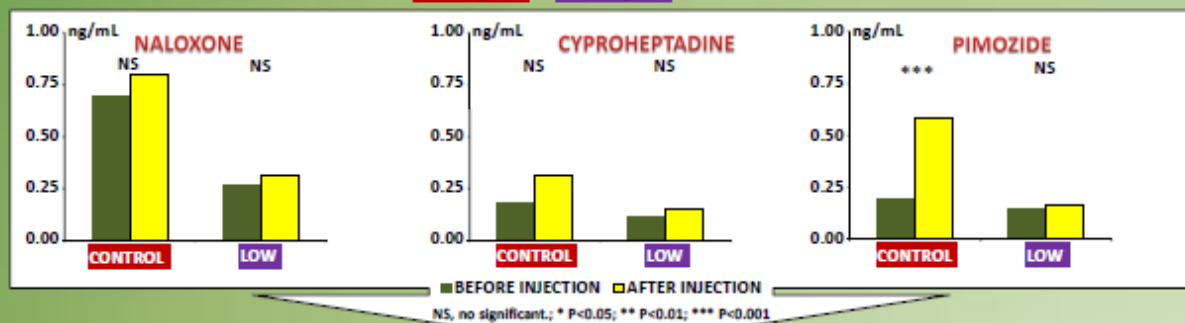
MATERIAL AND METHODS



RESULTS



A clear effect of level of nutrition was observed on mean LH concentrations before injection of the different antagonist (**0.33 ng/mL** vs **0.16 ng/mL**, respectively, $P < 0.001$).



In comparison with the pre-injection period, **pimozide** significantly increased the mean LH concentrations in the C group.

CONCLUSIONS

Results provide evidence that opioidergic or serotonergic systems seems to be not involved in the inhibition of LH secretion at the onset of the seasonal anoestrus. However, the ability of pimozide to increase LH concentrations could be enhanced by a higher plane of nutrition in Mediterranean goat females.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Grant AGL2006-01426 from C.I.C.Y.T. (Spain).